

"Zbornik radova", Sveska 40, 2004.

## ***MOLEKULARNI MARKERI U OPLEMENJIVANJU SUNCOKRETA***

***Panković, Dejana, Sakač, Z., Jocić, S., Škorić, D.<sup>1</sup>***

### **IZVOD**

U radu je dat prikaz rezultata koji odslikavaju savremeno stanje u primeni molekularnih markera u oplemenjivanju uopšte, i posebno u oplemenjivanju suncokreta. U drugom delu rada autori daju pregled sopstvenih rezultata, koji se odnose na primenu molekularnih markera u ispitivanju: tolerantnosti na sušu, diversiteta samooplodnih linija i divljih vrsta suncokreta, kao i pri identifikaciji interspecies hibrida. Detaljnije su prikazani rezultati koji se odnose na primenu molekularnih markera u ispitivanju tolerantnosti prema plamenjači. Primenom HAP3 prajmera pokazano je da je otpornost u ispitivanom materijalu vezana za prisustvo Pl6 gena. Polimorfizam DNK izolovane iz različitih genotipova suncokreta je ispitivan primenom RAPD i SSR markera. Iz dobijenih podataka izračunata je genetička udaljenost između svih parova ispitivanih genotipova, koja je varirala između 7% i 67%, i konstruisan je dendrogram. Potvrđeno je da su dve ispitivane linije, otporna (Ha-26 A+) i osetljiva (Ha-26 A) prema plamenjači, vrlo slične.

**KLJUČNE REČI:** oplemenjivanje suncokreta, molekularni markeri, selekcija uz pomoć markera

### **Oplemenjivanje uz pomoć markera**

Potencijalna korist od korištenja molekularnih markera u oplemenjivačkim programima je očigledna već više desetina godina. Međutim realizacija ovih potencijala je bila ograničena nedostatkom markera. Krajem 70-ih godina se započelo sa identifikacijom velikog broja markera raspoređenih po celom genomu različitih biljnih vrsta. Ovo je preduslov za korištenje markera, koji su povezani sa osobinama od interesa, odnosno selekciju uz pomoć markera (Marker Assisted

---

1 Dr Dejana Panković, viši naučni saradnik, mr Zvonimir Sakač, istraživač saradnik, dr Siniša Jocić, naučni saradnik, dr Dragan Škorić, naučni savetnik, Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad

Selection - MAS). Tako je došlo do novog polja akademskih istraživanja, međutim nasuprot velikom potencijalu MAS još uvek nije pružila očekivani napredak u komercijalnim oplemenjivačkim programima ratarskih biljnih vrsta.

Koji su uslovi potrebni da se od markera stigne do primene MAS? Prvi preduslov su mape DNK markera visoke gustine, što znači mnogo markera čija se lokacija zna, a koji su rasprostranjeni na relativno kratkim intervalima kroz ceo genom. Sledeći korak je definisanje gena za koje se predpostavlja da regulišu osobine od interesa i testiranje statističkih odnosa između markera i osobine od interesa. Kada je definisan marker koji je fizički lociran pored (ili čak u) genu od interesa, moguć je sledeći korak, tj. MAS poželjne osobine. Poželjne osobine mogu biti kontrolisane jednim ili nekoliko gena, kao što su major geni za otpornost na bolesti kod biljaka (Young, 1999), ili su to kompleksne kvantitativne osobine, kontrolisane minor genima (tzv. *Quantitative trait loci* - QTL ili lokusi za kvantitativne osobine) i pod uticajem spoljne sredine. Većina ekonomski važnih agronomskih osobina spadaju upravo u drugu kategoriju. Babu i saradnici (2003) su koristeći 280 molekularnih markera (134 RFLP, 131 AFLP, 15 mikrosatelita) i merenjem različitih parametara- indikatora vodnog stresa ispitivali populacije pirinča u uslovima navodnjavanja i vodnog stresa, i otkrili veći broj potencijalnih QTL-a za osobine otpornosti prema suši.

Uspeh MAS je pod uticajem odnosa između markera i gena od interesa. Dekkers (2003) navodi tri vrste odnosa:

1. Molekularni marker je lociran u genu. Ovo je najpovoljnija situacija jer praćenjem nasleđivanja markera ujedno pratimo i nasleđivanje gena. Međutim ovakvu vrstu markera je najteže pronaći.
2. Marker je u linkage neravnoteži (linkage disequilibrium- LD) sa genom u celoj populaciji. LD označava tendenciju da se određena kombinacija alela nasleđuje zajedno. Ovo se dešava kada markeri i geni nisu fizički udaljeni.
3. Marker je u linkage ravnoteži sa genom. Ovo je ujedno i najteža situacija za primenu MAS.

Veliki deo istraživačkih programa je usmeren na konstrukciju mapa za molekularne markere i otkrivanje QTL-ova koji su potrebni za potencijalnu primenu MAS u raznim biljnim i životinjskim vrstama. Pored toga MAS se primenjuje kao podrška konvencionalnim programima oplemenjivanja: u rekurentnoj selekciji, u stvaranju hibrida, i introgresiji (Dekkers and Hospital, 2002). Što se tiče uspešnosti MAS, kada se radi o poznatim genima MAS se masovno i uspešno koristi, naročito u okviru privatnih selekcionerskih kompanija. Međutim introgresija nepoznatih gena primenom MAS se pokazala manje uspešnom (Young, 1999). Primena MAS je različita kod različitih biljnih vrsta, na primer kod kukuruza se mnogo više primenjuje nego kod pšenice i ječma (Koebner, 2003). Kod njivskih kultura progres je mnogo veći nego kod voća. Na primer, kod jabuka i krušaka, je razvoj mapa molekularnih markera vrlo spor, i samo nekoliko QTL-ova je detektovano (Tartini, 2003) iako je potencijal MAS za genetsko poboljšanje ovakvih biljaka sa dugačkim životnim ciklusom značajan.

## Oplemenjivanje suncokreta uz pomoć markera u svetu

Značaj molekularnih markera u genetičkim analizama suncokreta je istaknut od strane mnogih istraživača. Od savremenih tehnika molekularnih markera dve se najviše koriste. AFLP tehnika (Amplified Fragment Length Polymorphism) se smatra efikasnim sistemom zbog svoje višestruke primenjivosti npr. genetsko mapiranje, fingerprinting, analize diversiteta. Hongtrakul et al. (1997) su prvi put ukazali na efikasnost ove metode kod suncokreta. Nedavno je na suncokretu uz pomoć te metode konstruisano nekoliko molekularnih mapa visoke gustine što omogućava mapiranje kvantitativnih osobina. Rachid Al Chaarani i saradnici (2002) su identifikovali QTL-ove za otpornost prema crnoj pegavosti stabla. Kusterer i saradnici (2003b) su identifikovali QTL-ove za oleinsku i linoleinsku kiselinu.

Primenom AFLP i RAPD markera i strategije kloniranja zasnovanog na linkage mapi (map-based cloning) izolovan je Rf1 gen za restauraciju fertilitnosti (Kusterer et al, 2003a). Ovi istraživači su izolovali Rf1 gen da bi proučavali njegovu funkciju u budućem radu, međutim pronašli su PCR markere, koji se nalaze u blizini Rf1 gena i konvertovali ih u SCAR markere, koji sada mogu da se koriste u programima povratnog ukrštanja uz pomoć markera.

Jednostavni kratki ponovci (Simple Sequences Repeats- SSR), ili mikrosateliti, se najviše koriste danas. Zbog visokog polimorfizma i efikasnosti koriste se za genetičko mapiranje, za populacione i evolucione studije (Vischi et al., 2003), kao i za analize pedigreea i fingerprinting.

Nedavni razvoj nekoliko stotina mikrosatelitskih markera za suncokret (Tang et al., 2002; Yu et al., 2002) i istovremeno neuporediva osetljivost mikrosatelita su otvorili mogućnost za ponovnu analizu molekularno genetičkog diversiteta kod suncokreta. Tang i Knapp (2003) su analizom diversiteta alela 122 mikrosatelitska lokusa kod gajenog suncokreta i njegovih divljih srodnika, po prvi put postavili mogućnost više centara porekla domestikacije suncokreta. Njihovi rezultati takođe ukazuju da bi ubuduće za povećanje gustine molekularno genetičkih linkage mapa trebalo koristiti potomstvo iz ukrštanja divlja vrsta x inbred linija.

U ispitivanju bolesti najviše su istraživane otpornost prema *Sclerotinia sclerotiorum* i prema *Plasmopara halstedii*. Mapiranje QTL-a za otpornost prema *Sclerotinia sclerotiorum* je u toku i to primenom SSR markera (Hahn et al., 2003; Baldini et al., 2003) i AFLP markera (Ronicke et al., 2003).

Što se tiče otpornosti prema *P. halstedii*, pretpostavlja se da postoji 11 gena koji obezbeđuju otpornost prema jednoj ili više rasa (Rahim et al., 2002). P11 i P12 obezbeđuju otpornost prema rasama 1 i 2 (Putt i Sackston, 1957). Gen P15 iz *H. tuberosus*-a je nosilac otpornosti prema rasi 3 (Leclercq et al., 1970; Pustovoit, 1966). Otpornost prema rasama 1, 2, 3 i 4 je uvedena iz tri divlje suncokreta, *H. annuus* (P16), *H. praecox* ssp. *runyonii* Heiser (P17) i *H. argophyllus* (P18) (Miller i Gulya, 1988, 1991). Iako ovi dominantni geni obezbeđuju potpunu otpornost na jednu ili više rasa *P. halstedii*, nove rase se kontinuirano pojavljuju. Postoje

genetički dokazi da su najmanje tri gena za otpornost prema plamenjači, PI1, PI2 i PI6, u klasteru u genomu suncokreta (Mouzeyar et al., 1995; Roeckel-Drevet et al., 1996; Vear et al., 1997). Ovi geni su smešteni u linkage grupu 1 (LG1) na RFLP mapi (Gentzittel et al., 1995) na približno istoj udaljenosti od prethodno mapiranih RFLP markera. PI6 se sastoji od najmanje dva vezana (0.6 cM) genetska faktora (Vear et al., 1997). Nedavno je pronađena i druga linkage grupa koja sadrži dva gena otpornosti u klasteru a to su PI5 i PI8 (Bert et al., 2001). Međutim ni molekularna struktura ni delovanje ovih gena nije za sada poznata.

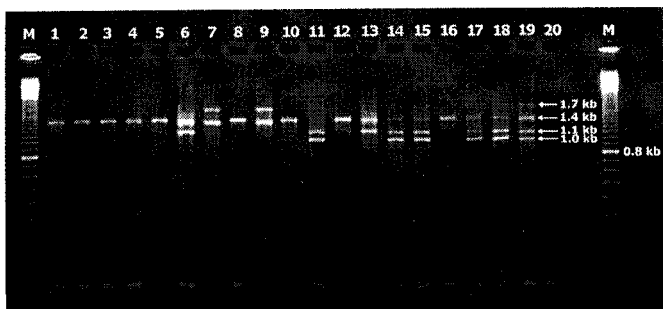
Mapiranje gena kandidata za otpornost (RGC Resistance Gene Candidates) je potvrdilo grupisanje gena otpornosti na bolesti u regionu PI1-PI2-PI6. Gedil i sarad. (2001) su pozicionirali PI1 i 6 RGC iz tipa NBS-LRR, a pokazali su da je RGC iz TIR-NBS-LRR podklase (Toll-IL-1 receptor/nucleotide-binding site/leu-cine-rich repeat), pod imenom HaRGC1, povezan sa PI1 na u linkage grupi 8, koja odgovara linkage grupi 1 na RFLP mapi. Slabaugh et al. (2003) su mapirali 24 HaRGC1 lokusa na segmentu od 2-4 cM na linkage grupi 8, i identifikovali IFLP markere (Intron Fragment Length Polymorphism) i SSR markere, koji mogu da se koriste za identifikaciju poznatih gena otpornosti prema plamenjači ili za introgresiju novih gena otpornosti iz divljih vrsta suncokreta.

### **Primena molekularnih markera u programu oplemenjivanja suncokreta kod nas**

U okviru projekata na oplemenjivanju suncokreta u Naučnom institutu za ratarstvo i povrtarstvo, molekularni markeri se primenjuju: u ispitivanju tolerantnosti na sušu (Panković et al., 2000a), u ispitivanju diversiteta samooplodnih linija (Panković i sarad., 1997; Panković i sarad., 2000b) i divljih vrsta suncokreta, kao i pri identifikaciji interspecies hibrida (Atlagić et al., 2003).

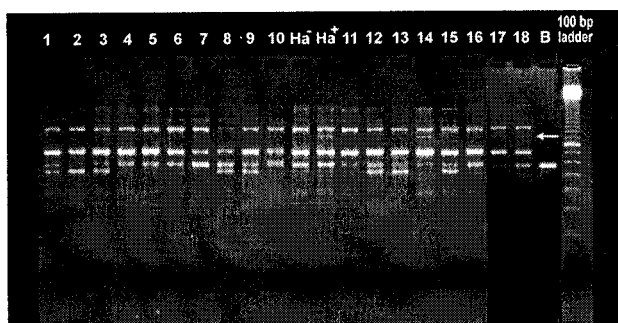
Jedan od ciljeva NS oplemenjivačkog programa je uvođenje otpornosti na plamenjaču u inbred linije koje imaju dobre kombinacione sposobnosti (Škorić, 1992). U ovom programu koriste se poznati i pronalaze novi markeri za otpornost prema postojećim rasama plamenjače. Ranije je utvrđeno da je u Jugoslaviji predominantna rasa 4 plamenjače (Maširević, 1998). Panković i sarad. (2001) su kao materijal za skrining sa molekularnim markerima koristili dve linije: Ha-26 A i Ha-19 A, roditeljske komponente srednjeranih i ranih hibrida (Škorić et al., 2000). Obe linije su ukrštene sa linijom JM-8, koja je izvor gena PI6, nosioca otpornosti prema rasama plamenjače 1,2,3 i 4. Dobijeni hibridi iz tih ukrštanja povratno su ukrštani sa Ha-26 A (dalje označeni kao G 10 i G 11), odnosno sa Ha-19 A (G 12 i G 16). Pored toga ispitivana je i linija Ha-26+ A, u koju je uneta otpornost prema plamenjači iz Ha 335, drugog izvora PI6 gena.

DNK je izolovana iz listova navedenih linija kao i diferencijalnih linija suncokreta, koje se koriste za identifikaciju rasa plamenjače. Polimorfizam je ispitivan primenom RAPD, SSR i nekoliko publikovanih PCR markera za otpornost prema bolestima (Bouzidi et al., 2002; Lu et al., 2000). Na slici 1. su prikazani fragmenti umnoženi sa prajmerom HAP3 (Bouzidi et al., 2002; Panković et al.,



Sl. 1. Fragmenti dobijeni u PCR-u sa prajmerom HAP3 (Bouzidi et al., 2002), koji pokriva oko 3 cM na lokusu Pl6, i DNK ispitivanih genotipova. Pozicije na gelu odgovaraju profilima dobijenim sa DNK koje su izolovane iz sledećih genotipova: 1 CMS-1-90A; 2 Ha-98Na; 3 Ha-26 B; 4 Ha-74A; 5 Ha-19A; 6 Rba-265; 7 Rba-274; 8 PMI 3; 9 CMS-3-8A; 10 Ha-26; 11 Ha-26<sup>+</sup>; 12 PM-17; 13 QHP1; 14 Ha 335; 15 JM 8A; 16 cms-3-8-A; 17 \*G12; 18 \*G10; 19 \*G11; 20 negativna kontrola, M=100bp Ladder. Strelice naznačuju poziciju markera.

Fig.1. PCR fragments obtained with primer HAP3 (Bouzidi et al., 2002), which covers about 3cM of Pl6 locus, and DNAs of examined genotypes. Gel positions resemble to the profiles obtained with DNAs from following genotypes: 1 CMS-1-90A; 2 Ha-98Na; 3 Ha-26 B; 4 Ha-74A; 5 Ha-19A; 6 Rba-265; 7 Rba-274; 8 PMI 3; 9 CMS-3-8A; 10 Ha-26; 11 Ha-26<sup>+</sup>; 12 PM-17; 13 QHP1; 14 Ha 335; 15 JM 8A; 16 cms-3-8-A; 17 \*G12; 18 \*G10; 19 \*G11; 20 negative control, M=100bp Ladder. Arrows indicate the position of markers.

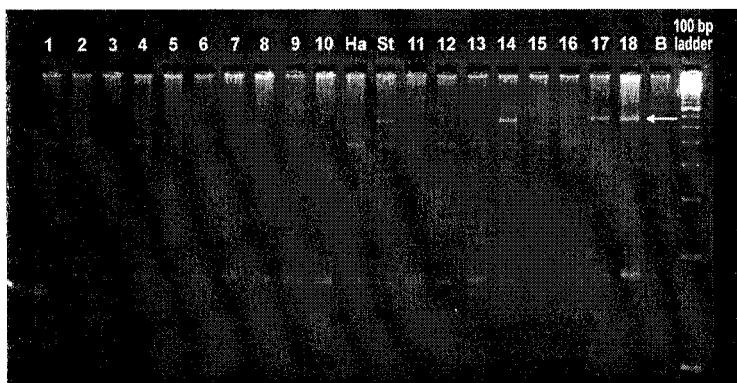


Sl. 2. Umnožavanje RAPD fragmenta dobijenih sa prajmerom UBC 119 i DNK iz sledećih genotipova: 1 CMS-1-90A; 2 Ha-98Na; 3 Ha-26 B; 4 Ha-74A; 5 Ha-19A; 6 G16; 7 Rba-265; 8 Rba-274; 9 PMI 3; 10 CMS-3-8A; Ha-26; Ha-26<sup>+</sup>; 11 PM-17; 12 QHP1; 13 Ha 335; 14 JM 8A; 15 cms-3-8-A; 16 \*G12; 17 \*G10; 18 \*G11; 19 negativna kontrola, M=100bp Ladder. Genotipovi na pozicijama od 1-10 su osetljivi, a od 11-18 su otporni prema plamenjaci. Fragment 900-1000 bp, koji je pronaden kod genotipova otporni prema plamenjaci Ha-26 A<sup>+</sup>, JM-8A, G10 i G11, je obeležen strelicom.

Fig.2 The amplification of RAPD fragments obtained with primer UBC 119 and DNAs from following genotypes: 1 CMS-1-90A; 2 Ha-98Na; 3 Ha-26 B; 4 Ha-74A; 5 Ha-19A; 6 G16; 7 Rba-265; 8 Rba-274; 9 PMI 3; 10 CMS-3-8A; Ha-26; Ha-26<sup>+</sup>; 11 PM-17; 12 QHP1; 13 Ha 335; 14 JM 8A; 15 cms-3-8-A; 16 \*G12; 17 \*G10; 18 \*G11; 19 negative control, M=100bp Ladder. Gel positions from 1 to 10 refer to sensitive, and from 11 to 18 to genotypes resistant to downy mildew. Fragment from 900-1000 bp, which was detected in resistant genotypes Ha-26 A<sup>+</sup>, JM-8A, G10 and G11 is marked with an arrow.

2003). Do pozicije 10 na gelu, naneseni su uzorci dobijeni sa DNK iz genotipova koji su bili neotporni, a posle pozicije 10 genotipovi koji su u laboratorijskom testu bili otporni prema plamenjači. Strelicama je naznačen položaj markera, koji pokrivaju oko 3cM na Pl6 lokusu. Kao što je očekivano, sva četiri fragmenta su prisutna kod Ha 335, JM8, C, kao i kod otpornih linija iz potomstva povratnih ukrštanja JM8 sa Ha 26A i Ha19A (Sl. 1).

U ispitivanju novih RAPD i SSR markera za otpornost prema plamenjači, samo dva su pokazala polimorfizam između otpornih i osetljivih linija (Panković et al., 2001). Na slici 2. prikazani su rezultati dobijeni sa RAPD prajmerom UBC119, a na slici 3. rezultati dobijeni sa SSR prajmerom ORS37. RAPD marker je pronađen kod otpornih genotipova Ha-26 A<sup>+</sup>, JM-8A, G10 i G11 (Slika 2). Očekivani SSR fragment, 173-188 bp nije bio u korelaciji sa otpornošću (rezultati nisu prikazani), ali se pojavio fragment u oblasti 600-700bp (Sl. 3) koji je pronađen kod istih genotipova kao i RAPD marker: Ha-26 A<sup>+</sup>, JM-8A, G10 i G11.



Sl. 3. Umnožavanje SSR fragmenata sa prajmerom ORS 37 i DNK ispitivanih genotipova (redosled isti kao kod slike 2). Marker veličine 600-700 bp je označen strelicom.

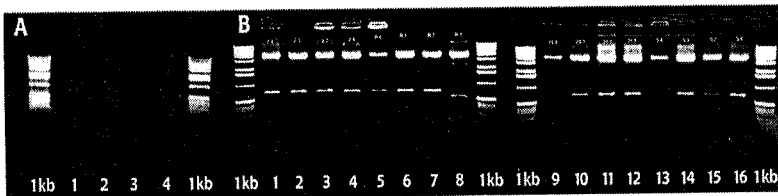
Fragmenti su razdvajani na 2% agarozu.

Fig.3 The amplification of SSR fragments with primer ORS 37 and DNA of examined genotypes (the disposition is the same as in Fig. 1). Marker (600-700 bp) is marked with an arrow. Fragments are separated on 2% agarose.

Dobijeni SSR marker (Sl. 3) je isečen iz 4 uzorka DNK sa gela i prečišćen (Sl. 4A). Fragmenti su klonirani korišćenjem vektora pCR<sup>R</sup>2.1-TOPO<sup>R</sup> i hemijski kompetentnih ćelija *E. coli*. DNK je izolovana iz belih kolonija, i nakon degestije sa EcoR I potvrđeno je prisustvo kloniranog fragmenta u većini uzoraka. Klonirani fragmenti su sekvencionirani. Blast analizom između sekvencioniranih fragmenata dobijen je stepen homologije oko 70%, a homologija sa publikovanim sekvencama je bila neznačajna. Međutim, dizajniran je specifičan prajmer za umnožavanje ovog fragmenta i ispitivanje nasleđivanja ovog SCAR markera je u toku.

Da bi iz ispitivanog materijala odabrali linije za buduća ukrštanja, dobijeni rezultati su takođe iskorišteni za izračunavanje genetičke distance između genotipova. Ukupno je pronađeno 48 polimorfnih markera. Sličnost između

genotipova je određena preko SMC (Simple Matching Coefficient). Genetičke distanca između svih parova ispitivanih genotipova ( $GD=(1-SMC) \times 100$ ) se kretala od 7 do 67%. Iz ovih podataka konstruisan je dendrogram u kojem su genotipovi grupisani u klasterne preko UPGMA analize (Statistica). Rezultati potvrđuju veliku sličnost između dve ispitivane inbred linije, otporne ( $Ha-26 A^+$ ) i osetljive ( $Ha-26 A$ ) prema plamenjači.

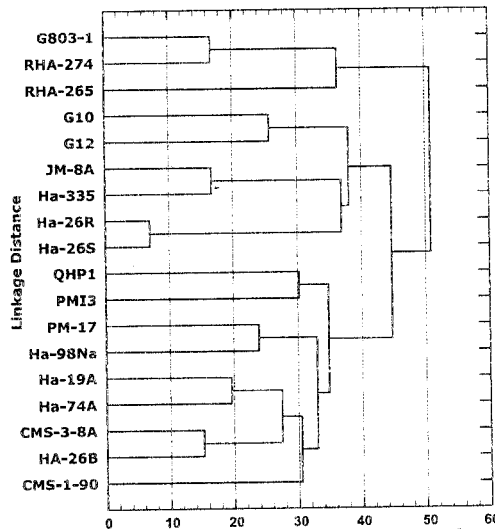


Sl. 4 A SSR marker, isečen i prečišćen iz četiri uzorka 1-  $Ha-26 A^+$  zaražena, 2-  $Ha-26 A^+$  nezaražena, 3. G10 i 4- JM-8 A.

B Nakon kloniranja fragmenata ( $pCR^R2.1-TOPO^R$ ), izolacije DNK iz belih kolonija i digestije sa *EcoR I* prisustvo kloniranog fragmenta je potvrđeno u većini uzoraka iz više izvora: linija  $Ha-26 A^+$  zaražena (pozicije 1-4),  $Ha-26 A^+$  nezaražen (pozicije 5-8), G10 (pozicije 9-12) i JM-8 A (pozicije 13-16).

Fig. 4 A SSR marker, cut and purified from four samples on the gel 1-  $Ha-26 A^+$  infected, 2-  $Ha-26 A^+$  uninfected, 3. G10 i 4- JM-8 A.

B Fragment was cloned ( $pCR^R2.1-TOPO^R$ ), DNA was isolated from white colonies and digested with *EcoR I*, and the presence of the cloned fragment was confirmed in most of the samples from different sources:  $Ha-26 A^+$  infected (positions 1-4),  $Ha-26 A^+$  uninfected (positions 5-8), G10 (positions 9-12) i JM-8 A (positions 13-16).



Sl. 5 Dendrogram koji pokazuje srodnost između 20 ispitivanih genotipova suncokreta. Klasteri su identifikovani primenom UPGMA analize (Statistika).

Fig. 5 Dendrogram which is showing the similarities among 20 examined sunflower genotypes. Clusters were identified by UPGMA analysis (Statistika).

U toku je provera testa alelnosti za Pl6 gen, kao i za pronađene RAPD, SSR i SCAR markere, na potomstvu iz ukrštanja linija Ha-26 A i Ha-26 A<sup>+</sup>.

## LITERATURA

- Atlagić, J., Panković, D., Pekanović, A. (2003): Backcrosses in interspecific hybridisation in sunflower. *Genetika* (in press).
- Babu, R.C., Nguyen, B.D., Chamarek, V., Shanmugasundaram P., Chezian P., Jeyaprakash P., Ganesh S. K., Palchamy A., Sadasivam S., Sarkarung S., Wade L.J., Nguyen H.T. (2003): Genetic analysis of drought resistance in rice by molecular markers: Association between secondary traits and field performance. *Crop Science* 43, 1457-1469.
- Baldini, M., Vischi, M., Turi, M., Di Bernardo, N., Raranciuc, S., Echeverria M., Castano F., Vanzozi G.P., Olivieri A.M. (2003): Evaluation of genetic variability for *Sclerotinia sclerotiorum* Lib. De Bary resistance in a population from a cross between susceptible and resistant sunflower. Proceedings of the Sixth European Conference on Sunflower Biotechnology, Sevilla, 5-9 October 2003, S1P1.
- Bert, P., Tourvieille, de Labrouhe D., Philippon J., Mouzeyar S., Jouan I., Nicolas P., Vear F. (2001): Identification of a second linkage group carrying genes controlling resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor. Appl. Genet.* 103, 992-997.
- Bouzidi, M.F., Badaoui, S., Cambon F., Vear F., Tourvieille de Labrouhe D., Nicolas P., Mouzeyar S. (2002): Molecular analysis of a major locus for resistance to downy mildew in sunflower with specific PCR-based markers. *Theor. Appl. Genet.* 104, 592-600.
- Dekkers, J.C.M. (2003): Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: strategies and lessons. Paper presented at the 54th annual meeting of the European Association for Animal Production, Rome, Italy, 31 August- 3 September 2003.
- Dekkers, J.C.M. and Hospital F. (2002): The use of molecular genetics in the improvements of agricultural populations. *Nature Reviews: Genetics* 3: 22-32.
- Gedil, M.A., Slabaugh M.B., Berry S., Johnson R., Michelmore R., Miller J., Gulya T., Knapp S.J. (2001): Candidate disease resistance genes in sunflower cloned using conserved nucleotide-binding site motifs: Genetic mapping and linkage to the downy mildew resistance genes. *Plant Genome* 44, 205-212.
- Gentzbittel, L., Vear, F., Zhang Y.-X., Berville A., Nicolas P. (1995): Development of a consensus linkage RFLP map of cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor. Appl. Genet.* 90, 1079-1086.
- Hahn, V., Micic Z., Knapp, S.J., Tang S., Melchinger A.E., Bauer E. (2003): QTL-analysis of resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflower. Proceedings of the Sixth European Conference on Sunflower Biotechnology, Sevilla, 5-9 October 2003, S1O2.



- Hongtrakul, V., Huestis, G.M., Knapp S. (1997): Amplified fragment length polymorphisms as a toll for DNA fingerprinting sunflower germplasm: genetic diversity among oilseed inbred lines. *Theor. Appl. Genet.* 95, 400-407.
- Koebner, R. (2003): MAS in cereals: Green for maize, amber for rice, still red for wheat and barley. Paper presented at an international workshop on "Marker assisted selection: A fast track to increase genetic gain in plant and animal breeding?" in Turin, Italy, 17-18 October 2003.
- Kusterer, B., Friedt, W., Lazarescu, E., Prufe, M., Ozdemir, N., Tzigos S., Horn R. (2003a): Map-based cloning strategy for isolating the restorer gene Rf1 of the PET1 cytoplasm in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Helia* in press.
- Kusterer, B., Rozynek, B., Brahm, L., Prufe, M., Tzigos S., Horn R., Friedt W. (2003b): Construction of a genetic map and localization of major traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Helia* in press.
- Leclercq, P., Cauderon, Y., Dauge, M. (1970): Selection pour la resistance au mildiou du Tournesol a partir d hybrides Topinambour x Torunesol. *Ann. Amelior. Plantes*, 20, 363-373.
- Lu, Y.H., Melero-Vara, J.M., Garcia-Tejada, J.A., Blanchard, P. (2000): Development of SCAR markers linked to the gene Or5 conferring resistance to broomrape (*Orobancha cumana* Wallr.) in sunflower. *Theor. Appl. Genet.* 100, 625-632.
- Maširević, S. (1998): Races of sunflower downy mildew pathogen (*Plasmopara halstedii*) in Yugoslavia. ISA Sunflower Downy Mildew Symposium III, 13-14 Jan, Fargo, USA, 21-23.
- Miller, J.F., Gulya T.J. (1988): Registration of six downy mildew resistant sunflower germplasm lines. *Crop Sci.* 28, 1040-1041.
- Miller, J.F., Gulya T.J. (1991): Inheritance of resistance to race 4 of downy mildew derived from interspecific crosses in sunflower. *Crop Sci.* 31, 40-43.
- Mouzeyar, S., Roeckel-Drevet P., Gentzbittel L., Philippon J., Tourville de Labrouhe D., Vear F., Nicolas P. (1995): RFLP and RAPD mapping of the sunflower Pl1 locus for resistance to *Plasmopara halstedii* race 1. *Theor. Appl. Genet.*, 91, 733-737.
- Panković, D., Jocić, S., Lačok, N., Sakač, Z., Škorić, D. (2003): The use of PCR-based markers in the evaluation of resistance to downy mildew in NS-breeding material. *Helia* in press.
- Panković, D., Jocić S., Lačok, N., Škorić, D. (2001): PCR markers for resistance to *Plasmopara halstedii*. Proceedings of the Vth European Sunflower Conference, November 4-8, Pisa, Italy, 23.
- Panković, D., Mihaljčević, M., Škorić, D. (1997): Determination of genetic distance between different sunflower lines with RAPD markers. I Simpozijum molekularne genetike, Zlatibor, 15-18 septembar, 23.
- Panković, D., Sakač, Z., Plesničar, M., Škorić, D. (2000b): Identification of RAPD markers linked to drought tolerance by bulked segregant analysis. Proceedings of the 15th International Conference, Toulouse, France 12-15 June.

- Panković, D., Vasić, D., Škorić, D. (2000a): Korišćenje molekularnih markera, fuzije protoplasta i genetskih transformacija u oplemenjivanju suncokreta. Zbornik radova, Sveska 33, 65-80.
- Pustovoit, G.T. (1966): Interspecies hybridization as a method of sunflower selection on group immunity. *Genetika*, 2, 59-69.
- Putt, E.D., Sackston, W.E. (1957): Studies on sunflower rust. I. Some sources of rust resistance. *Can. J. Plant Sci.* 37, 43-54.
- Rachid, Al-Chaarani G., Roustee, L., Gentzbittel, L., Mokrani, L., Barrault, G., Dechamp-Guillaume G., Sarrafi A. (2002): A QTL analysis of sunflower partial resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) and black stem (*Phoma macdonaldii*) by the use of recombinant inbred lines (RILs). *Theor. Appl. Genet.* 104, 490-496.
- Rahim, M., Jan, C.C., Gulya, T.J. (2002): Inheritance of resistance to sunflower downy mildew races 1, 2 and 3 in cultivated sunflower. *Plant Breed.* 121, 57-60.
- Roeckle-Drevet, P., Gagne, G., Mouzeyar, S., Gentzbittel, L., Philippon, J., Nicolas, P., Tourvieille de Labrouhe D., Vear F. (1996): Colocation of downy mildew (*Plasmopara halstedii*) resistance genes in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Euphytica* 91, 225-228.
- Ronicke, S., Hahn, V., Friedt, W. (2003): Molecular and phenotypic characterization of sunflower lines expressing enhanced *Sclerotinia* resistance. Proceedings of the Sixth European Conference on Sunflower Biotechnology, Sevilla, 5-9 October 2003, S2O3.
- Škorić, D. (1992): Achievements and future directions of sunflower breeding. *Field Crops Res.* 30 (3-4), 231-270.
- Škorić, D., Jocić, S., Molnar, I. (2000): General (GCA) and specific (SCA) combining (SCA) abilities in sunflower. Proc.15th Internat. Sunflow. Confer., Toulouse, France 12.-15. June, E23-E27.
- Slabaugh, M.B., Yu J.K., Tang, S., Heesacker A., Hu X., Lu G., Bidney D., Han F., Knapp S.J. (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.
- Tang, S., Knapp, S.J. (2003): Microsatellites uncover extraordinary diversity in native American land races and wild populations of cultivated sunflower. *Theor. Appl. Genet.* 106, 990-1003.
- Tang, S., Yu J.K., Slabaugh, M.B., Shintani D.K., Knapp S.J. (2002): Simple sequence repeat map of the sunflower genome. *Theor. Appl. Genet.* 105, 1124-1136.
- Tartini, S. (2003): Marker-assisted selection in pome fruit breeding. Paper presented at an international workshop on "Marker assisted selection: A fast track to increase genetic gain in plant and animal breeding?" in Turin, Italy, 17-18 October 2003.
- Vear, F., Gentzbittel L., Philippon J., Mouzeyar S., Mestries E., Roeckel-Drevet P., Tourvieille de Labrouhe D., Nicolas P. (1997): The genetics of resistance to

- five races of downy mildew (*Plasmopara halstedii*) in sunflower (*Helianthus annuus* L.) Theor. Appl. Genet. 95, 584-589.
- Vischi, M., Di Bernardo, N., Scotti, I., Della Casa, S., Seiler, G., Olivieri A.M. (2003): Comparison of populations of *Helianthus argophyllus* and *H. debilis* ssp. *cucumerifolius* and their hybrids from the African coast of the Indian Ocean and the USA using molecular markers. *Helia* in press.
- Young, N.D. (1999): A cautiously optimistic vision for marker-assisted breeding. *Molecular Breeding* 5:505-510.
- Yu, J.K., Mangor J., Thompson L., Edwards K.J., Slabaugh M.B., Knapp S.J. (2002): Allelic diversity of simple sequence repeat markers among elite inbred lines in cultivated sunflower. *Genome* 45:652-660.

## **MOLECULAR MARKERS IN SUNFLOWER BREEDING**

***Panković, Dejana, Sakač, Z., Jocić, S., Škorić, D.***

Institute of Field and Vegetable Crops, Novi Sad

### **SUMMARY**

The contemporary state of the investigations in the field of the molecular markers application in breeding in general, and in sunflower breeding specifically, is presented in the paper. In the second part of the paper the authors are reviewing their own results on the application of molecular markers in the investigation of: drought tolerance, diversity of sunflower inbred lines and wild species, and in the identification of interspecies hybrids. The investigation of sunflower tolerance to downy mildew is presented in more detail. Markers obtained with PCR primer HAP3 are indicating that the resistance to downy mildew in examined sunflower genotypes is connected with Pl6 gene. DNA polymorphism among examined genotypes was investigated with RAPD and SSR markers. Obtained results were used for the calculation of genetic distances (GD) between all possible pairs of genotypes. GD which varied between 7% and 67%, were used for dendrogram construction. Data confirm that inbred lines, resistant (Ha-26 A<sup>+</sup>) and sensitive (Ha-26 A) to downy mildew, are very similar.

**KEY WORDS:** sunflower breeding, molecular markers, marker assisted selection