

"Zbornik radova", Sveska 35, 2001.

Pregledni rad - Review

**UPOTREBA BIOTEHNOLOŠKIH I METODA
MOLEKULARNE BIOLOGIJE U OPLEMENJIVANJU
SUNCOKRETA DOSTIGNU A U SVETU**

Vasić, Dragana¹

IZVOD

Suncokret spada među četiri najvažnije uljane kulture u svetu. Tokom protekle dekade prinos i proizvodnja suncokreta u svetu su porasli za 70%, što je posledica optimizacije agrotehničkih mera kao i stvaranja sve produktivnijih hibrida. Ipak, pojava opasnih oboljenja izazvanih *Phomopsis* i *Sclerotinia* sp. i povećani zahtevi industrije u pogledu kvaliteta su doveli do potrebe uvođenja novih genetskih svojstava u genom gajenog suncokreta.

Biotehnologija, odnosno moderna kultura tkiva, biologija ćelije i molekularna biologija pružaju mogućnost proširenja genetske osnove gajenog suncokreta i stvaranja nove germplazme, bolje adaptirane na nove zahteve tržišta i proizvodnje. Intenzivan rad u ovim oblastima je na suncokretu započet ranih sedamdesetih.

U radu je dat pregled biotehnoloških i molekularnobioloških tehnika koje su sa uspehom upotrebljene u oplemenjivanju suncokreta u svetu, sa naglaskom na dostignuća predstavljena na XV Međunarodnoj konferenciji o suncokretu.

KLJUČNE REČI: suncokret, biotehnologija, molekularna biologija

Uvod

Suncokret (*Helianthus annuus* L.) spada među četiri najvažnije uljane kulture u svetu. Tokom protekle dekade prinos i proizvodnja suncokreta u svetu su porasli za 70%, što je posledica optimizacije agrotehničkih mera kao i stvaranja sve produktivnijih hibrida. Ipak, pojava opasnih oboljenja izazvanih *Phomopsis* i *Sclerotinia* sp. i povećani zahtevi industrije u pogledu kvaliteta su doveli do potrebe uvođenja novih genetskih svojstava u genom gajenog suncokreta.

Upotrebom klasičnih metoda oplemenjivanja, potrebno je najmanje deset generacija da bi se unele poželjne osobine. To je ponekad u neskladu sa brzim

1 Dr Dragana Vasić, naučni saradnik, Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad

promenama u zahtevima tržišta. Pored toga, problem predstavlja i relativno uska genetska osnova gajenog suncokreta, što je posledica malog broja genotipova koji se koriste kao početni materijal u oplemenjivanju i korišćenja citoplazmatske muške sterilnosti za proizvodnju semena. Svi sadašnji hibridi gajenog suncokreta su bazirani na istoj citoplazmi.

Biotehnologija, odnosno moderna kultura tkiva, biologija ćelije i molekularna biologija pružaju mogućnost proširenja genetske osnove gajenog suncokreta i stvaranja nove germplazme, bolje adaptirane na nove zahteve tržišta i proizvodnje (Alibert i sar., 1998). Intenzivan rad u ovim oblastima je na suncokretu započeo ranih sedamdesetih.

U ovom radu biće dat pregled biotehnoških i molekularnobioloških tehnika koje su sa uspehom upotrebljene u oplemenjivanju suncokreta u svetu, sa naglaskom na dostignuća predstavljena na XV Međunarodnoj konferenciji o suncokretu.

Biotehnologija

a) Proizvodnja dvostrukih haploida

U procesu oplemenjivanja suncokreta potrebno je interesantne genotipove dovesti u homozigotno stanje, odnosno stvoriti inbred linije. Ovaj proces obično traje od šest do osam godina. Proizvodnjom dvostrukih haploida moguće je dobiti potpuno homozigotan materijal u roku od par meseci.

Dvostruki haploidi nastaju spontanim udvostručavanjem broja hromozoma u ranoj fazi gajenja u kulturi ili indukovanom diploidizacijom uz pomoć kolhicina i potpuno su homozigotni na sve alele koje sadrže u sebi. Kod suncokreta, za njihovo dobijanje su korišćeni kultura antera i kultura ozračenog polena.

Kultura antera je uspešno korišćena za prevođenje u homozigotno stanje intersepcies hibrida gajenog suncokreta sa *H. tuberosus*, *H. laetiflorus* i *H. resinusus* (Nurhidayah i sar., 1996; Friedt i sar., 1997), kao i interesantnih genotipova iz populacija i sorata gajenog suncokreta (Vasić i sar., 1995, 2000). Nenova i sar (1998) su upotrebom kulture antera proizveli dvostruke haploide divljih srodnika suncokreta *H. mollis*, *H. salicifolius* i *H. smithii*.

Todorova i sar. (1997) su razvili metod proizvodnje dvostukih haploida upotrebom ozračenog polena. Autori su na ovaj način uspeli da dobiju nekoliko inbred linija koje su testirali i u poljskim uslovima (Todorova i Ivanov, 1998, 2000).

Problemi koji se javljaju pri stvaranju dvostrukih haploida su zavisnost efikasnosti metode od genotipa i regeneracija biljaka iz diploidnog tkiva, odnosno tapetuma antera, koja je u nekim slučajevima toliko izražena da su pojedini autori izrazili sumnju da do regeneracije iz haploidnog tkiva uopšte i dolazi (Zhong i sar 1995). Zabuni doprinosi i pojava spontane diploidizacije tokom kulture, kao i nemogućnost da se citološki raspoznaju diploidi i dvostruki haploidi. Ovaj problem je delimično rešen upotrebom izoenzima i molekulskih markera za analizu regeneranata (Nurhidayah i sar., 1994, 1996).

b) Proizvodnja interspecies hibrida

Divlje vrste suncokreta predstavljaju izvore genetske varijabilnosti za agronomski važna svojstva. U nekim slučajevima prenošenje ovih svojstava u genom gajenog suncokreta upotrebom konvencionalnih metoda je teško zbog visoke interspecies inkompatibilnosti. Kao sredstva za prevazilaženje ovog problema su kod suncokreta korišćeni kultura nezrelog embriona i fuzija protoplasta.

Kod kulture embriona, nezreli embrioni se dva do pet dana nakon oplodnje stavljaju na hranljivu podlogu da bi se sprečilo njihovo propadanje. Chandler i Beard (1983) su prvi uspešno izveli spašavanje embriona kod inkompatibilnih interspecies ukrštanja kod suncokreta. Ova tehnika je zatim sa uspehom korišćena za proizvodnju većeg broja interspecies hibrida između gajenog suncokreta i *H. decapetalus*, *H. giganteus*, *H. strumosus* i *H. mollis* (Krauter i sar., 1991) i interspecies hibrida gajenog suncokreta i *H. tuberosus* sa povećanom otpornošću prema *Phomopsis* (Dozet i sar 1996).

Fuzija protoplasta se koristi u slučajevima tzv. prezigotne inkompatibilnosti, odnosno kada nakon ukrštanja ne dolazi do formiranja embriona (Vasiljević i Vasić 1995). Prvi uspešan pokušaj korišćenja ove tehnike kod suncokreta je bio 1995. godine kada su Krasnyanski i Menczel proizveli somatski hibrid između gajenog suncokreta i *H. giganteus*. Nakon njih, Henn i sar. (1998) su na ovaj način uspešno ukrstili gajeni suncokret sa *H. maximiliani* i *H. giganteus*, pokušavajući da unesu otpornost prema *Sclerotinia* u gajeni suncokret.

Glavni problem prilikom fuzije protoplasta je nizak procenat regeneracije biljaka, tako da se u većini slučajeva kao proizvodi hibridizacije regenerišu samo kalusi (Aslane-Chanabe, 1991; Vasić i sar., 2000).

c) Genetske transformacije

Upotrebom genetskih transformacija moguće je u gajeni suncokret uneti poželjne gene koji se ne mogu naći kod njegovih divljih srodnika. Ovo se posebno odnosi na gene za otpornost prema pojedinim značajnim oboljenjima (Panković i sar., 1999).

Genetske transformacije obuhvataju izolaciju, kloniranje i karakterizaciju gena iz različitih vrsta; kreiranje novih genetskih konstrukcija od sekvenci izolovanih iz biljnih ili životinjskih vrsta; kreiranje novih sekvenci mutagenезom dobijenih sekvenci; i na kraju transfer tih novih genetskih konstrukcija u genom biljke tako da se omogući njihova ekspresija kako bi biljci dali novo svojstvo.

Everett i sar. (1987) su prvi uspeli da dobiju transformisane biljke gajenog suncokreta, a nakon njih i Malone-Schoneberg i sar. (1991) i Bidney i sar. (1992). Najveći komercijalni značaj svakako imaju transgene biljke suncokreta u koje je unešen gen za oksalat oksidazu iz pšenice, a koje su pokazale povećanu tolerantnost prema napadu *Sclerotinia* glave u poljskim uslovima, proizvedene u privatnoj kompaniji Pioneer (Bazzalo i sar., 2000; Scelonge i sar., 2000).

Kao i kod somatske hibridizacije glavni problem pri primeni ove metode je nizak procenat regeneracije i prenošenja željenog svojstva na potomstvo.

d) In vitro skrining

In vitro skrining podrazumeva određivanje reakcije ili otpornosti biljke na stres (napad bolesti, sušu, povećanu zaslanjenost) u *in vitro* uslovima. U tu svrhu cele biljke, njihovi organi, kalusi ili protoplasti se gaje u prisustvu toksina patogenog, aktivnih supstanci herbicida, povišene koncentracije NaCl, izazivača zasušivanja kao što je PEG i dr.

Kod suncokreta *in vitro* skrining je najčešće korišćen za određivanje otpornosti prema bolestima, pri čemu su korišćeni ili filtrati toksina patogenog ili hemijski agensi. U najvećem broju radova korišćen je filtrat toksina *Phomopsis* (Maširević i sar., 1988; Dozet i Vasić, 1995; Raducanu i sar., 1998; Vasić i Škorić, 2000) ili *Sclerotinia* (Raducanu i sar 1998; Raducanu i sar 2000; Tahmasebi-Enferadi i sar 2000). Pored njih, za utvrđivanje otpornosti prema *Sclerotinia* korišćena je i kultura u prisustvu oksalne kiseline (Raducanu i sar., 1994; Vasić i sar., 1999). U svim ispitivanjima pronađena je korelacija između otpornosti odnosno osetljivosti u poljskim i *in vitro* uslovima, s tim što je korelacija bila veća kada su za ispitivanje korišćene cele biljke.

Nedostatak *in vitro* skrininga je nepostojanje standardizovanog metoda za ispitivanje, odnosno to što se dobijeni rezultati još uvek ne mogu smatrati apsolutno pouzdanim, odnosno moraju se proveriti i u poljskim uslovima.

Molekularna biologija

Selekcija uz pomoć markera (MAS) predstavlja praktičnu primenu molekularnih markera u oplemenjivanju biljaka, pa samim tim i suncokreta. MAS je indirektna selekcija na neku osobinu gde se kao selekcionim kriterijum koristi molekularni marker koji se nasleđuje na isti način kao i ispitivana osobina. Molekularni markeri imaju nekoliko prednosti u odnosu na klasične fenotipske markere korišćene u oplemenjivanju. Oni omogućavaju povećanje efikasnosti konvencionalnog oplemenjivanja. Pored toga, molekularni markeri ne zavise od uslova spoljne sredine i mogu se detektovati u svim stadijumima razvoja biljaka (Mohan i sar., 1997).

Molekularni markeri su posebno korisni u oplemenjivanju na agronomski važna svojstva koja je inače teško kontrolisati, kao što je otpornost prema bolestima, insektima i nematodama, tolerancija na abiotski stres, parametri kvaliteta i kvantitativne osobine.

a) PCR bazirani markeri

Ova grupa markera predstavlja veoma efikasno sredstvo za identifikaciju i izolaciju markera vezanih za važna svojstva kao što su otpornost prema bolestima, CMS, kvalitet ulja i tolerantnost prema stresu (Friedt i sar., 1997). Među njima, RAPD markeri su se pokazali kao najbolji zbog svoje jednostavnosti.

Kod suncokreta, RAPD markeri su korišćeni za ispitivanje genetike različitih svojstava sa naglaskom na otpornost prema bolestima. Besnard i sar (1997) su koristili RAPD markere za ispitivanje otpornosti prema *Phomosis* u potomstvu

intersepecies hibrida, a Brahm i sar. (1998a, 1998b) za mapiranje gena za otpornost prema plamenjači.

Lawson i sar. (1998) su identifikovali dva RAPD markera povezana sa genom koji uslovljava otpornost na većinu patotipova *Puccinia helianthi* u Australiji. Autori su razvili dva specifična markera koja je moguće koristiti u MAS selekciji.

RAPD markeri su korišćeni i za mapiranje restorer gena Rf1 (Prufe i sar., 1998) i visokog sadržaja oleinske kiseline (Dehmer i Friedt, 1998), kao i za ispitivanje otpornosti prema suši (Panković i sar., 2000).

U brojnim slučajevima RAPD analiza je korišćena za karakterizaciju oplemenjivačkog materijala, ispitivanje genetičke udaljenosti i dokazivanje introgresije nakon interspecies hibridizacije. Panković i sar (1997) su ispitivali genetsku udaljenost između inbred linija gajenog suncokreta, a Gongshe i sar (2000) njihovu genetsku čistoću. Linder i sar (1998) su ispitivali prenošenje gena gajenog suncokreta u divlje srodnike radi procene rizika usled gajenja transgenog suncokreta.

b) RFLP i AFLP

Ove dve metodike su osnovna sredstva za analizu genoma na molekularnom nivou.

Poznato je da gajeni suncokret ima usku genetsku osnovu. Zato se ispitivanju genetičke varijabilnosti linija i hibrida suncokreta pridaje sve veći značaj. U ovu svrhu sve češće se koriste i RFLP (Gentzbittel i sar., 1995; Zhang i sar., 1995) i AFLP markeri (Hongtrakul i sar., 1997). Određivanje genetske divergentnosti odnosno sličnosti je veoma značajno kako zbog ispitivanja potencijala za heterozis tako i zbog zaštite autorskih prava. Utvrđeno je da genetička udaljenost ustanovljena uz pomoć AFLP markera predstavlja dobar pokazatelj heterozisa kod suncokreta (Cheres i sar., 2000).

Mestries i sar. (1998) su identifikovali lokuse za otpornost prema *Sclerotinia* lista i glave uz pomoć RFLP markera. Kombinacijom RAPD i AFLP tehnika izolovani su markeri korisni za indirektnu selekciju na gene za otpornost prema plamenjači *Pl₂*, *Pl₆* i *Pl_{arg}* (Brahm i sar., 2000). Bert i sar. (2000) su koristili AFLP i RFLP za mapiranje gena odgovornih za otpornost prema *Sclerotinia* lista i glave, *Phomopsis* i još nekoliko agronomski važnih svojstava.

Jedan od najvećih problema prilikom upotrebe AFLP, RFLP i PCR markera u oplemenjivanju su visoki troškovi. Ovaj problem se može prevazići pojednostavljenjem procedure izolacije DNK na koju otpada pola troškova u PCR analizi, kao i korišćenjem specifičnih PCR markera (Mohan i sar., 1997).

Perspektive

Iako je postignut značajan napredak u primeni metoda molekularne biologije i oplemenjivanju suncokreta, još uvek postoje određeni problemi koji sprečavaju njihovu širu upotrebu.

Jedan od problema je nepostojanje tzv. "biblioteka" sekvenici i markera specifičnih za pojedine lokuse (Knapp i sar 2000). Drugi problem je nepostojanje

kooperacije i koordinacije između različitih ustanova, čime se istraživanja u ovoj oblasti znatno usporavaju.

Knapp i sar (2000) rade na stvaranju baze od 4000 sekvenci koja bi omogućila lakšu identifikaciju i izolaciju gena kod suncokreta. Ove sekvence će biti na raspolaganju javnosti, što bi trebalo da ubrza identifikaciju interesantnih gena i stvaranje DNK markera. Autori takođe rade na dobijanju nekoliko stotina specifičnih DNK markera za gajeni suncokret, a u cilju stvaranja genetske mape suncokreta.

Postojanje "biblioteka" sekvenci bi kod suncokreta potpomoglo i rad na proučavanju molekularnog aspekta otpornosti prema bolestima, odnosno lokalizaciju regiona genoma i gena odgovornih za otpornost i nekih proteina koji se akumuliraju nakon infekcije (Mouzeyar, 2000). Uz pomoć preciznih genetskih mapa bilo bi moguće klonirati različite gene za otpornost. Metod kloniranja je već uspešno korišćen za izolaciju gena specifično indukovanih infekcijom sa *P. balstedii* (Mazeyrat i sar., 1998). Postojeće sekvence su korišćene i u proučavanju uloge gena za $\Delta 9$ i $\Delta 12$ desaturazu u akumulaciji oleinske kiseline, što je od značaja za stvaranje oleinskih hibrida suncokreta (Lacombe i Berville, 2000).

Kada su u pitanju biotehnoološke metode, glavna prepreka njihovoj široj upotrebi je pre svega niska sposobnost regeneracije gajenog suncokreta uopšte, koja u najvećoj meri zavisi od genotipa. U toku su intenzivna istraživanja kako genetičkih (Deglene i sar., 1997; Flores Berrios i sar., 2000), tako i abiotičkih faktora koji kontrolišu ovo svojstvo, pre svega mineralne ishrane (Vasić i sar., 2000). Bolje poznavanje ovih faktora bi trebalo da omogući povećanu efikasnost regeneracije i povećanje broja genotipova koji poseduju ovo svojstvo.

U slučaju da se ovaj problem uspešno reši, metode biotehnologije bi mogle postati efikasno sredstvo za unošenje poželjnih svojstava u gajeni suncokret, pre svega putem genetskih transformacija.

ZAKLJUČAK

Biotehnoološke i metode molekularne biologije su se pokazale kao efikasna sredstva za oplemenjivanje suncokreta, pogotovo u oblastima gde je klasično oplemenjivanje dostiglo svoje limite. Poseban napredak je učinjen u domenu molekularne biologije i genetskih transformacija. Ono što sprečava širu upotrebu ovih metoda su troškovi, specifični uslovi potrebni za njihovu primenu, kao i nedostatak kooperacije između različitih istraživačkih timova.

LITERATURA

- Alibert G, Lucas O, Vasić D, Alibert B, Thion L (1998). Seed quality for sunflower: Improvement by biotechnology. Proc of Seed Science in the Field of Genetically Controlled Stress Physiology, Toulouse, France.
- Aslane-Chanabe C (1991). Regeneration de plantes a partir de protoplastes chez genre *Helianthus* et hybridation somatique entre le tournesol cultive et les tournesols sauvages. Doktorska disertacija, INP ENSAT, Toulouse, France.

- Bazzalo ME, Bridges I, Gallela T, Grondona M, Leon A, Scott A, Bidney D, Cole G, D’Hautefeuille JL, Lu G, Mancini M, Scelonge C, Soper J, Sosa-Domingues G, Wang L (2000). *Sclerotinia* head rot resistance conferred by wheat oxalate oxidase gene in transgenic sunflower. Proc of the 15th International Sunflower Conference, Toulouse, France, p. K-60-65.
- Bert PF, Jouan I, Serre F, Cambon F, Tourvieille de Labrouhe D, Nicolas P, Vear F (2000). Analyses of QTL associated with resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Diaporthe helianthi* in sunflower (*Helianthus annuus* L.) using molecular markers. Proc of the 15th International Sunflower Conference, Toulouse, France, p. K-48-53.
- Besnard G, Griveau Y, Quillet MC, Sariéys H, Lambert P, Vares D, Bervile A (1997). Specifying the introgressed regions from *H. argophyllus* in cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.) to mark *Phomopsis* resistance genes. Theor Appl Genet 94: 131-138.
- Bidney D, Scelonge C, Martich J, Burrus M, Sims L, Huffman G (1992). Microprojectile bombardment of plant tissues increases transformation frequency by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Mol Biol 18: 301-313.
- Brahm L, Rocher T, Horn R, Prufe M, Kohler H, Friedt W (1998a). Mapping downy mildew resistance in sunflower. Proc of the 3rd Sunflower Downy Mildew Symposium, Fargo, ND, USA, p. 103-110.
- Brahm L, Rocher T, Horn R, Prufe M, Friedt W (1998b). Mapping different resistances against downy mildew in sunflower. Proc of the XV Eucarpia General Congress, Viterbo, Italy, p. 72.
- Brahm L, Hahn V, Rocher T, Friedt W (2000). Molecular markers as a tool in breeding for resistance against sunflower downy mildew. Proc of the 15th International Sunflower Conference, Toulouse, France, p. J-43-48.
- Chandler JM, Beard BH (1983). Embryo culture of *Helianthus* hybrids. Crop Sci 23: 1004-1007.
- Cheres MT, Miller JF, Crane JM, Knapp SJ (2000). Genetic distance as a predictor of heterosis and hybrid performance within and between heterotic groups in sunflower. Theor Appl Genet 100: 889-894.
- Deglène L, Lesingenes P, Alibert G, Sarrafi A (1997). Genetic control of organogenesis in cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus* L.). Plant Cell Tissue Org Cult 48: 127-130.
- Dehmer KJ, Friedt W (1998). Evaluation of different microsatellite motifs for analysing genetic relationships in cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.). Plant Breed 117: 45-48.
- Dozet B, Atlagić J, Vasić D (1996). Transferring stem canker resistance from *Helianthus tuberosus* L. into inbred line of sunflower by embryo rescue technique. Helia 19, 25: 87-94.
- Dozet B, Vasić D (1995). In vitro techniques for selection of sunflower for resistance to *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* Munt.-Cvet. et al. Helia 18, 22: 37-44.
- Everett NP, Robinson KE, Mascarenhas D (1987). Genetic engineering of sunflower (*Helianthus annuus* L.). Bio/Technology 5: 1201-1204.

- Flores Berrios E, Gentzbittel L, Mokrani L, Alibert G, Sarrafi A (2000). Genetic control of early events in protoplast division and regeneration pathways in sunflower. *Theor Appl Genet* 101: 606-612.
- Friedt W, Nurhidayah T, Rocher T, Kohler H, Bergmann R, Horn R (1997). Haploid production and application of molecular methods in sunflower (*Helianthus annuus* L.). U: SM Jain (Ed): *In vitro* haploid production in higher plants. Kluwer Ac Publ, Amsterdam, p. 17-35.
- Gentzbittel L, Vear F, Zhang YX, Berville A, Nicolas P (1995). Development of a consensus linkage RFLP map of cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor Appl Genet* 90: 1079-1086.
- Gongshe L, Jiasheng M, Jie L (2000). Use of RAPD markers to screen hybrids of oilseed sunflower. Proc of the 15th International Sunflower Conference, Toulouse, France, p. M-16-19.
- Henn HJ, Wingender R, Schnabl H (1998). Regeneration of fertile interspecific hybrids from protoplast fusions between *Helianthus annuus* L. and wild *Helianthus* species. *Plant Cell Rep* 18: 220-224.
- Hongtrakul V, Huestis GM, Knapp SJ (1997). Amplified fragment length polymorphisms as a tool for DNA fingerprinting sunflower germplasm: genetic diversity among oilseed inbred lines. *Theor Appl Genet* 95: 400-407.
- Knapp SJ, Slabaugh MB, Tang S (2000). The development of tools for molecular breeding and genomics research in cultivated sunflower. Proc of the 15th International Sunflower Conference, Toulouse, France, p. Pl.D-1-7.
- Krasnyanski S, Menczel L (1995). Production of fertile somatic hybrid plants of sunflower and *Helianthus giganteus* L. by protoplast fusion. *Plant Cell Rep* 14: 232-235.
- Krauter R, Steinmetz A, Friedt W (1991). Efficient interspecific hybridization in the genus *Helianthus* via embryo rescue and characterization of the hybrids. *Theor Appl Genet* 82: 521-525.
- Lacombe S, Berville A (2000). Problems and goals in studying oil composition variation in sunflower. Proc of the 15th International Sunflower Conference, Toulouse, France, p. Pl.D-16-25.
- Lawson WR, Goutler KC, Henry RJ, Kong GA, Kochman JK (1998). Marker-assisted selection for two rust resistance genes in sunflower. *Mol Breed* 4: 227-234.
- Linder CR, Taha I, Seiler GJ, Snow AA, Rieseberg LH (1998). Long-term introgression of crop genes into wild sunflower populations. *Theor Appl Genet* 96: 339-347.
- Malone-Schoneberg RS, Bidney D, Scelonge C, Burrus M, Martich J (1991). Recovery of stable transformants from *Agrobacterium tumefaciens* treated split shoot axes. Abstr of World Congress on Cell Tissue Culture, Anaheim, USA.
- Maširević S, Secor GA, Gulya TJ (1988). Use of cell culture to screen sunflower germplasm for resistance to *Phomopsis* brown-gray stem spot. *Plant Cell Rep* 7: 528-530.
- Mazeyrat F, Mouzeyar S, Nicolas P, Tourvieille De Labrouhe D, Ledoigt G (1998). Cloning, sequence and characterization of a sunflower (*Helianthus annuus*

- L.) pathogen-induced gene showing sequence homology with auxin-induced genes from plants. *Plant Mol Biol* 38: 899-903.
- Mestries E, Gentzbittel L, Tourvielle de Labrouhe D, Nicolas P, Vear F (1998). Analyses of quantitative trait loci associated with resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflowers (*Helianthus annuus* L.) using molecular markers. *Mol Breed* 4: 215-226.
- Mohan M, Nair S, Bhagwat A, Krishna TG, Yano M (1997). Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Mol Breed* 3: 87-103.
- Mouzeyar S (2000). Unraveling the molecular mechanism of pathogen resistance in sunflowers. Proc of the 15th International Sunflower Conference, Toulouse, France, p. Pl.D-8-15.
- Nenova N, Christov M, Ivanov P (1998). Anther culture regeneration from some wild *Helianthus* species. Abstr of the 4th European Conference on Sunflower Biotechnology, Montpellier, France, p. 64.
- Nurhidayah T, Kohler H, Dahlhoff M, Friedt W (1994). Anther culture of interspecific sunflower hybrids and examination of regenerants by biochemical and molecular methods. *Biotechnol Biotechnol Eq* 7: 113-116.
- Nurhidayah T, Horn R, Rocher T, Friedt W (1996). High regeneration rates in anther culture of interspecific sunflower hybrids. *Plant Cell Rep* 16: 167-173.
- Panković D, Mihalčević M, Škorić D (1997). Determination of genetic distance between different sunflower lines with RAPD markers. U: Vasiljević B (Ed): Book of abstracts 1st Symposium on molecular genetics and 1st Symposium on mutagenesis and genotoxicology, Zlatibor, p. 34.
- Panković D, Vasić D, Škorić D (1999). Korišćenje molekularnih markera, fuzije protoplasta i genetskih transformacija u oplemenjivanju suncokreta. Zbornik radova Naučnog instituta za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, Sveska 33: 65-80.
- Panković D, Sakač Z, Plesničar M, Škorić D (2000). Identification of RAPD markers linked to drought tolerance by bulked segregant analysis. Proc of the 15th International Sunflower Conference, Toulouse, France, p. M-38-43.
- Prufe M, Lazarescu E, Brahm L, Friedt W, Horn R (1998). Genome mapping and positional cloning of the restorer gene Rf1 in sunflower. Abstr of the 4th European Conference on Sunflower Biotechnology, Montpellier, France, p. 41.
- Raducanu F., Soare G., Verzea M. (1994). The "*in vitro*" reaction of some sunflower genotypes to different concentrations of oxalic acid to different filtrates of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib. de Bary). Proc EUCARPIA Oil Prot. Sect., Albena, Bugarska, p. 202-207.
- Raducanu F, Moraru I, Hagima I, Soare G (1998). The effect of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Phomopsis helianthi* filtrates on some quality and quantity characters of 17 sunflower genotypes tested *in vitro* and *in vivo*. Abstr of the 4th European Conference on Sunflower Biotechnology, Montpellier, France, p. 62.

- Raducanu F, Vranceanu AV, Hagima I, Petcu E (2000). Studies about the influence of *Sclerotinia sclerotiorum* filtrates on some quantitative and qualitative traits in Romanian sunflower genotypes *in vitro* and *in vivo* tested. Proc of the 15th International Sunflower Conference, Toulouse, France, p. K-29-34.
- Scelonge C, Wang L, Bidney D, Lu G, Hastings C, Cole G, Mancl M, D'Hautefeuille JL, Sosa-Dominguez G, Coughlan S (2000). Transgenic *Sclerotinia* resistance in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Proc of the 15th International Sunflower Conference, Toulouse, France, p. K-66-71.
- Tahmasebi-Enferadi S, Turi M, Baldini M, Vanozzi GP (2000). Comparison between artificial inoculation and culture filtrate of *Sclerotinia sclerotiorum* Lib. de Bary treatments of nine sunflower genotypes. Proc of the 15th International Sunflower Conference, Toulouse, France, p. K-23-28.
- Todorova M, Ivanov P, Shindrova P, Christov M, Ivanova I (1997). Doubled haploid production of sunflower (*Helianthus annuus* L.) through irradiated pollen-induced parthenogenesis. Euphytica 97: 249-254.
- Todorova M, Ivanov P (1998). Induced parthenogenesis in sunflower: effect of pollen donor. Abstr of the 4th European Conference on Sunflower Biotechnology, Montpellier, France, p. 95.
- Todorova M, Ivanov P (2000). Induced parthenogenesis in sunflower (*Helianthus annuus* L.): Effect of gamma-irradiation doses. Proc of the 15th International Sunflower Conference, Toulouse, France, p. L-46-51.
- Vasić D, Vasiljević Lj, Škorić D (1995). Shoot regeneration from anthers of sunflower. Proc of the 3rd European Symposium on Sunflower Biotechnology, Giessen, Germany, p. 34.
- Vasić D, Alibert G, Škorić D (1999). *In vitro* screening of sunflower for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. Helia 22, 31: 95-104.
- Vasić D, Alibert G, Berville A, Škorić D (2000). RAPD analysis of sunflower somatic hybrid calli. Proc of the 15th International Sunflower Conference, Toulouse, France, p. L-42-45.
- Vasić D, Pajević S, Sarić M, Škorić D (2000). Content and dynamics of accumulation of mineral elements in sunflower calluses. Proc of the 12th FESPP Congress, Budapest, Hungary, p. s21.
- Vasić D, Škorić D (2000). Određivanje parametara i koncentracije filtrata najpogodnijih za ispitivanje otpornosti suncokreta na *Phomopsis* u *in vitro* uslovima. Zbornik radova sa 41. savetovanja industrije ulja, Miločer, p. 69-72.
- Vasić D, Škorić D, Jocić S (2000). Anther culture of sunflower cultivars. Proc of the 15th International Sunflower Conference, Toulouse, France, p. L-52-55.
- Vasiljević Lj, Vasić D (1995). Izolacija i fuzija protoplasta. U: Kultura tkiva u poljoprivredi. Feljton, Novi Sad, p. 195-247.
- Zhong D, Michaux-Ferriere, Coumans M (1995). Assay for doubled haploid sunflower (*Helianthus annuus*) plant production by androgenesis: fact or artifact? Part 1. *In vitro* anther culture. Plant Cell Tissue Org Cult 41: 91-97.

***USE OF METHODS OF BIOTECHNOLOGY AND
MOLECULAR BIOLOGY IN SUNFLOWER BREEDING
ACHIEVEMENTS IN THE WORLD***

Vasić, Dragana

Institute of Field and Vegetable Crops, Novi Sad

SUMMARY

Sunflower is one of four the most important oil crops in the world. Over the past decade yield and world sunflower production has increased by 70%. This success has resulted both from the optimization of agricultural technology and breeding for more productive hybrids. However, the development of serious diseases caused by *Phomopsis* and *Sclerotinia* sp., and the high industrial demands concerning quality implies the introduction of new genetic characteristics in the sunflower genome.

Biotechnology involving modern tissue culture, cell biology and molecular biology offers the opportunity of widening cultivated sunflower genetic base and developing new germplasms, better adapted to the new market and production demands.

In this paper a review is given of biotechnological and techniques of molecular biology successfully used in sunflower breeding. Special attention was paid to the results presented at 15th International Sunflower Conference.

KEY WORDS: sunflower, biotechnology, molecular biology.