

UPOTREBA BIOTEHNOLOŠKIH I METODA MOLEKULARNE BIOLOGIJE U OPLEMENJIVANJU SUNCOKRETA - DOSTIGNUĆA U SVIJETU

IZVADAK

Suncokret spada među četiri najvažnije uljane kulture u svijetu. Tijekom protekle dekade prinos i proizvodnja suncokreta u svijetu su porasli za 70%, što je posljedica optimizacije agrotehničkih mjera kao i stvaranja sve produktivnijih hibrida. Ipak, pojava opasnih oboljenja izazvanih *Phomopsis* i *Sclerotinia sp.* i povećani zahtjevi industrije u pogledu kvalitete doveli su do potrebe uvođenja novih genetskih svojstava u genom uzgajanog suncokreta.

Biotehnologija, odnosno moderna kultura tkiva, biologija stanice i molekularna biologija pružaju mogućnost proširenja genetske osnove uzgajanog suncokreta i stvaranja nove germplazme, bolje adaptirane na nove zahtjeve 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 s uspjehom upotrijebljene u oplemenjivanju suncokreta u svijetu, s naglaskom na dostignuća predstavljena na XV. Međunarodnoj konferenciji o suncokretu.

KLJUČNE RIJEČI: suncokret, biotehnologija, molekularna biologija

UVOD

Suncokret (*Helianthus annuus L.*) spada među četiri najvažnije uljane kulture u svijetu. Tijekom protekle dekade prinos i proizvodnja suncokreta u svijetu su porasli za 70%, što je posljedica optimizacije agrotehničkih mjera kao i stvaranja sve produktivnijih hibrida. Ipak, pojava opasnih oboljenja izazvanih *Phomopsis* i *Sclerotinia sp.* i povećani zahtjevi industrije za kvalitetom doveli su do potrebe uvođenja novih genetskih svojstava u genom uzgajanog suncokreta.

Upotrebom klasičnih metoda oplemenjivanja, potrebno je najmanje deset generacija da bi se unijele poželjne osobine. To je ponekad u neskladu s brzim promjenama u zahtjevima tržišta. Pored toga, problem predstavlja i relativno uska genetska osnova uzgajanog suncokreta, što je posljedica malog broja genotipova koji se koriste kao početni

¹ dr. Dragana Vasić, viši znanstveni suradnik, Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad

materijal u oplemenjivanju i korištenja citoplazmatske muške sterilnosti za proizvodnju sjemena. Svi sadašnji hibridi uzgajanog suncokreta bazirani su na istoj citoplazmi.

Biotehnologija, odnosno moderna kultura tkiva, biologija stanice i molekularna biologija pružaju mogućnost proširenja genetske osnove uzgajanog suncokreta i stvaranja nove germplazme, bolje adaptirane na nove zahtjeve tržišta i proizvodnje (Alibert i sur. 1998). Intenzivni rad u ovim oblastima je na suncokretu započeo ranih sedamdesetih.

U ovom radu bit će dat pregled biotehnoških i molekularnobioloških tehnika koje su s uspjehom upotrijebljene u oplemenjivanju suncokreta u svijetu, s 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 mjeseci.

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

Kultura antera je uspješno korištena za prevođenje u homozigotno stanje intersepcies hibrida uzgajanog suncokreta sa *H. tuberosus*, *H. laetiflorus* i *H. resinosus* (Nurhidayah i sur. 1996, Friedt i sur. 1997), kao i interesantnih genotipova iz populacija i vrsta uzgajanog suncokreta (Vasić i sur. 1995, 2000). Nenova i sur. (1998) su upotrebom kulture antera proizveli dvostruke haploide divljih srodnika suncokreta *H. mollis*, *H. salicifolius* i *H. smithii*. Todorova i sur. (1997) su razvili metodu proizvodnje dvostrukih haploida upotrebom ozračenog peluda. Autori su na ovaj način uspjeli dobiti nekoliko inbred linija koje su testirali i u poljskim uvjetima (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 uopće i dolazi (Zhong i sur. 1995). Zabuni pridonosi i pojava spontane diploidizacije tijekom kulture, kao i nemogućnost da se citološki raspoznaju diploidi i dvostruki haploidi. Ovaj problem je djelomično riješen upotrebom izoenzima i molekularskih markera za analizu regeneranata (Nurhidayah i sur. 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 uzgajanog

suncokreta upotrebom konvencionalnih metoda je teško zbog visoke interspecies inkompatibilnosti. Da bi se prevladao ovaj problem, kod suncokreta je korištena kultura nezrelog embriona i fuzija protoplasta.

Kod kulture embriona, nezreli embrioni se dva do pet dana nakon oplodnje stavljaju na hranjivu podlogu da bi se spriječilo njihovo propadanje. Chandler i Beard (1983) su prvi uspješno izveli spašavanje embriona kod inkompatibilnih interspecies križanja kod suncokreta. Ova tehnika je zatim uspješno korištena za proizvodnju većeg broja interspecies hibrida između uzgajanog suncokreta i *H. decapetalus*, *H. giganteus*, *H. stromosus* i *H. mollis* (Krauter i sur. 1991) i interspecies hibrida uzgajanog suncokreta i *H. tuberosus* s povećanom otpornošću prema *Phomopsis* (Dozet i sur. 1996).

Fuzija protoplasta se koristi u slučajevima tzv. prezigotne inkompatibilnosti, odnosno kada nakon križanja ne dolazi do formiranja embriona (Vasiljević i Vasić 1995). Prvi uspješan pokušaj korištenja ove tehnike kod suncokreta je bio 1995. godine kada su Krasnyanski i Mencil proizveli somatski hibrid između uzgajanog suncokreta i *H. giganteus*. Nakon njih, Henn i sur. (1998) su na ovaj način uspješno križali uzgajani suncokret sa *H. maximiliani* i *H. giganteus*, pokušavajući unijeti otpornost prema *Sclerotinia* u uzgajani suncokret.

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

c) Genetske transformacije

Upotrebom genetskih transformacija moguće je u uzgajani suncokret unijeti 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 sur. 1999).

Genetske transformacije obuhvaćaju izolaciju, kloniranje i karakterizaciju gena iz različitih vrsta; kreiranje novih genetskih konstrukcija od sekvenci izoliranih iz biljnih ili životinjskih vrsta; kreiranje novih sekvenci mutagenezom 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 sur. (1987) su prvi uspjeli dobiti transformirane biljke uzgajanog suncokreta, a nakon njih i Malone-Schoneberg i sur. (1991) i Bidney i sur. (1992). Najveću komercijalnu važnost svakako imaju transgene biljke suncokreta u koje je unijet gen za oksalat oksidazu iz pšenice, a koje su pokazale povećanu tolerantnost prema napadu *Sclerotinia* glave u poljskim uvjetima, proizvedene u privatnoj kompaniji Pioneer (Bazzalo i sur. 2000, Scelonge i sur. 2000).

Kao i kod somatske hibridizacije, glavni problem pri primjeni ove metode je nizak postotak regeneracije i prenošenja željenog svojstva na potomstvo.

d) In vitro skrining

In vitro skrining podrazumjeva određivanje reakcije ili otpornosti biljke na stres

(napad bolesti, sušu, povećanu zaslanjenost) u *in vitro* uvjetima. U tu svrhu cijele biljke, njihovi organi, kalusi ili protoplasti se uzgajaju u prisustvu toksina patogena, aktivnih substanci herbicida, povišene koncentracije NaCl, izazivača zasušivanja kao što je PEG i dr.

Kod suncokreta *in vitro* *skrining* je najčeće korišten za određivanje otpornosti prema bolestima, pri čemu su korišteni ili filtrati toksina patogena ili kemijski agensi. U najvećem broju radova korišten je filtrat toksina *Phomopsis* (Maširević i sur. 1988, Dozet i Vasić 1995, Raducanu i sur. 1998, Vasić i Škorić 2000) ili *Sclerotinia* (Raducanu i sur. 1998, Raducanu i sur. 2000, Tahmasebi-Enferadi i sur. 2000). Pored njih, za utvrđivanje otpornosti prema *Sclerotinia* korištena je i kultura u prisustvu oksalne kiseline (Raducanu i sur. 1994, Vasić i sur. 1999). U svim ispitivanjima pronađena je korelacija između otpornosti odnosno osjetljivosti u poljskim i *in vitro* uvjetima, s tim što je korelacija bila veća kada su za ispitivanje korištene cijele biljke.

Nedostatak *in vitro* *skrininga* je nepostojanje standardizirane metode za ispitivanje, odnosno to što se dobijeni rezultati još uvijek ne mogu smatrati apsolutno pouzdanim, odnosno moraju se provjeriti i u poljskim uvjetima.

Molekularna biologija

Selekcija uz pomoć markera (MAS) predstavlja praktičnu primjenu molekularnih markera u oplemenjivanju biljaka, pa samim tim i suncokreta. MAS je indirektna selekcija na neku osobinu gdje se kao selekcijski kriterij koristi molekularni marker koji se nasljeđuje na isti način kao i ispitivana osobina. Molekularni markeri imaju nekoliko prednosti u odnosu na klasične fenotipske markere korištene u oplemenjivanju. Oni omogućavaju povećanje efikasnosti konvencionalnog oplemenjivanja. Pored toga, molekularni markeri ne zavise od uvjeta vanjske sredine i mogu se detektirati u svim stadijima razvoja biljaka (Mohan i sur. 1997).

Molekularni markeri su posebno korisni u oplemenjivanju na agronomski važna svojstva koja je inače teško kontrolirati, kao što je otpornost prema bolestima, insektima i nematodama, tolerancija na abiotski stres, parametri kvalitete 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, kvaliteta ulja i tolerantnost prema stresu (Friedt i sur. 1997). Među njima, RAPD markeri su se pokazali kao najbolji zbog svoje jednostavnosti.

Kod suncokreta, RAPD markeri su korišteni za ispitivanje genetike različitih svojstava s naglaskom na otpornost prema bolestima. Besnard i sur. (1997) su koristili RAPD markere za ispitivanje otpornosti prema *Phomosis* u potomstvu intersepecies hibrida, a Brahm i sur. (1998a, 1998b) za mapiranje gena za otpornost prema plamenjači.

Lawson i sur. (1998) su identificirali dva RAPD markera povezana s genom koji

uvjetuje otpornost na većinu patotipova *Puccinia helianthi* u Australiji. Autori su razvili dva specifična markera koja je moguće koristiti u MAS selekciji.

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

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

b) RFLP i AFLP

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

Poznato je da uzgajani suncokret ima usku genetsku osnovu. Zato se ispitivanju genetičke varijabilnosti linija i hibrida suncokreta pridaje sve veća važnost. U ovu svrhu sve češće se koriste i RFLP (Gentzbittel i sur. 1995, Zhang i sur. 1995) i AFLP markeri (Hongtrakul i sur. 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 sur. 2000).

Mestries i sur. (1998) su identificirali lokuse za otpornost prema *Sclerotinia* lista i glave uz pomoć RFLP markera. Kombinacijom RAPD i AFLP tehnika izolirani su markeri korisni za indirektnu selekciju na gene za otpornost prema plamenjači - Pl_2 , Pl_6 i Pl_{arg} (Brahm i sur. 2000). Bert i sur. (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 riješiti pojednostavljenjem procedure izolacije DNK na koju otpada pola troškova u PCR analizi, kao i korištenjem specifičnih PCR markera (Mohan i sur. 1997).

Perspektive

Iako je postignut značajan napredak u primjeni metoda molekularne biologije i oplemenjivanju suncokreta, još uvijek postoje određeni problemi koji sprječavaju njihovu širu upotrebu.

Jedan od problema je nepostojanje tzv. "biblioteka" sekvenici i markera specifičnih za pojedine lokuse (Knapp i sur. 2000). Drugi problem je nepostojanje kooperacije i koordinacije između različitih ustanova, čime se istraživanja u ovoj oblasti znatno

usporavaju.

Knapp i sur. (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 ubrzati identifikaciju interesantnih gena i stvaranje DNK markera. Autori također rade na dobijanju nekoliko stotina specifičnih DNK markera za uzgajani 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 regija 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. Metoda kloniranja je već uspješno korištena za izolaciju gena specifično induciranih infekcijom sa *P. halstedii* (Mazeyrat i sur. 1998). Postojeće sekvence su korištene i u proučavanju uloge gena za $\Delta 9$ i $\Delta 12$ desaturazu u akumulaciji oleinske kiseline, što je važno za stvaranje oleinskih hibrida suncokreta (Lacombe i Berville 2000).

Kada su u pitanju biotehnoške metode, glavna prepreka njihovoj široj upotrebi je prije svega niska sposobnost regeneracije uzgajanog suncokreta uopće, koja u najvećoj mjeri zavisi od genotipa. U tijeku su intenzivna istraživanja kako genetičkih (Deglene i sur. 1997, Flores Berrios i sur. 2000), tako i abiotičkih faktora koji kontroliraju ovo svojstvo, prije svega mineralne ishrane (Vasić i sur. 2000). Bolje poznavanje ovih faktora trebalo bi omogućiti povećanu efikasnost regeneracije i povećanje broja genotipova koji posjeduju ovo svojstvo.

U slučaju da se ovaj problem uspješno riješi, metode biotehnologije bi mogle postati efikasno sredstvo za unošenje poželjnih svojstava u uzgajani suncokret, prije svega putem genetskih transformacija.

ZAKLJUČAK

Biotehnoške i metode molekularne biologije pokazale su se kao efikasna sredstva za oplemenjivanje suncokreta, pogotovo u oblastima gdje je klasično oplemenjivanje dostiglo svoje limite. Poseban napredak je učinjen u domeni molekularne biologije i genetskih transformacija. Ono što sprječava širu upotrebu ovih metoda su troškovi, specifični uvjeti potrebni za njihovu primjenu, 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, Sarieys H, Lambert P, Vares D, Berville 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, Jiesheng 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 SN, 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, Gentzbiittel L, Tourvieille 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, Mihajljević 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

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 payed to the results presented at 15th International Sunflower Conference.

KEY WORDS: *sunflower, biotechnology, molecular biology*