

Razvoj metoda mikrorazmnožavanja i procjena genetičke stabilnosti triju vrsta perunika (*Iris* spp.) razmnoženih in vitro

SAŽETAK

Rod *Iris* ima preko 300 vrsta, i usprkos velikom hortikulturnom potencijalu Iridaceae germplazme, do sada je mikropropagirano samo 40-ak vrsta iz 12 rodova ove porodice. Razlog tome dijelom može biti u slabijoj regenerativnoj sposobnosti jednosupnica u usporedbi s dvosupnicama. Bez obzira na teškoće, kultura tkiva perunika razvija se već 40 godina ponajviše zbog velike potražnje tržišta za biljkama perunika slobodnim od virusa. Mnoge vrste iz ove porodice su endemi, rijetke i/ili zaštićene i većina ih još nije u uzgoju. Hrvatske endemične perunike *Iris adriatica* Trinajstić ex Mitić, *Iris illyrica* Tomm. te *Iris x rotschildii* Degen. su vrste veoma atraktivnih cvjetova i stoga zanimljive za komercijalnu proizvodnju. Razmnožavaju se vegetativno, dijeljenjem rizoma, zbog čega je stopa umnažanja niska pa mikropropagacija postaje zanimljiva kao metoda razvoja početne populacije koja će služiti kao matičnjak biljaka.

U ovom radu je na temelju postojećih podataka o regeneraciji drugih vrsta perunika u kulturi tkiva razvijen protokol regeneracije za spomenute tri hrvatske endemične vrste perunika. Za indukciju kalogeneze i somatske embriogeneze korištene su najčešće upotrebljavanje kombinacije i koncentracije auksina: 2,4-D (1 mg/L) sama ili u kombinaciji s NAA (1 mg/L) ili pak sama NAA (2,5 mg/L). Sposobnost indukcije kalogeneze iz eksplantata baze listova razlikovala se kod tri promatrane vrste perunika, a ovisila je o donorskoj biljci (genotipu) kod jadranske i ilirske perunike, dok je kod Rotschildove perunike na indukciju kalusa značajno utjecao tretman tj. sastav regulatora rasta u hranidbenoj podlozi. Genotipovi jadranske perunike su bili najuspješniji u indukciji proembriogenih kalusnih struktura s uspješnošću do 43,40% dok su genotipovi ilirske i Rotschildove perunike embriogene kaluse razvili na najviše 15,18% odnosno 12,03% induciranih kalusa. Na eksplantatim korijena nije induciran niti jedan kalus ni na jednoj od tri promatrane vrste perunika, bez obzira na tretman.

Poznato je da je rast biljnih stanica in vitro i njihova regeneracija u čitave biljke vegetativan

proces koji uključuje samo mitotske diobe stanica i teoretski ne bi trebao uzrokovati nikakvu varijabilnost. Ipak, u mnogim je istraživanjima dokazano da se promjene u somatskim stanicama za vrijeme mitotske diobe povremeno događaju i mogu rezultirati varijabilnošću razvijenog klonskog potomstva. Ovu pojavu nazivamo somaklonskom varijabilnošću (soma= vegetativan, klon= identična kopija). Iako ovisi o brojnim faktorima, za sintetske auksine 2,4-D i NAA se smatra da su povezani s njenom pojavom. Upravo su ti auksini najčešće nužni za indukciju kalogeneze, a korišteni su i u ovom istraživanju. S druge strane, somatski embriji nastaju iz meristematskih i nediferenciranih mladih tkiva biljke pa se može očekivati očuvanje genetske stabilnosti embriogenih kalusa.

Biljke dobivene somatskom embriogenezom u ovom istraživanju, analizirane su s ciljem utvrđivanja klonske vjernosti na fenotipskoj, citogenetičkoj i genskoj razini. Analizom glavnih komponeneta (PCA) temeljenom na morfometrijskim izmjerama, razlikovane su promatrane vrste dok su regeneranti pojedine donorske biljke većinom zadržali sličnost s matičnom skupinom. Varijable koje su utjecale na razlikovanje vrsta, odnosno one s najvećim vrijednostima u prvoj glavnoj komponenti svojstvenih (eigen) vektora bile su širina (0,38) i dužina donjeg lista perigona (0,37), visina biljke (0,37) i širina gornjeg lista perigona (0,37).

Da bi se utvrdila klonska vjernost regeneranata na citogenetičkoj razini provedena je analiza sadržaja jezgrine DNA protočnim citometrom. Protočna citometrija je brza i pouzdana metoda, a u kratkom vremenu može analizirati reprezentativan broj jezgara. Promjena ploidnosti zabilježena je samo kod jednog od 74 analizirana regeneranta Rotschildove perunike što čini manje od 1,35%. Kod druge dvije vrste nije bilo odstupanja u razini ploidnosti.

Deset kombinacija početnica korišteno je za provjeru klonske vjernosti na DNA razini AFLP sustavom genskih biljega. AFLP se smatra posebno prikladnom metodom detekcije u istraživanjima u kojima se očekuje mali stupanj genetske raznolikosti. Kod sve tri vrste je većina regeneranata zadržala sličnost s matičnom skupinom. Kod jadranske perunike je Diceov koeficijent sličnosti varirao od 95-97 %, kod ilirske perunike 91-96% dok je kod Rotschildove perunike iznosio 87-94%. Regenerant koji se najviše razlikovao unutar pojedine

vrste dijelio je s ostalim regenerantima svoje skupine 81% sličnosti kod jadranske perunike, 92% kod ilirske perunike i 86,7% sličnosti kod Rotschildove perunike. Mantelovim testom ustanovljeno je da nema korelacije između matrica udaljenosti dobivenih na osnovi morfoloških i molekularnih podataka. Taj se podatak može objasniti utjecajem okolinskih i/ili eventualnih epigenetskih faktora na fenotip biljke.

Dakle, biljke regenerirale u procesu somatske embriogeneze najvećim su dijelom ostale vrlo vjerni klonovi matičnih biljaka. Očigledno su koncentracije sintetskih auksina 2,4-D i NAA upotrebene u ovom istraživanju bile ispod razine koja uzrokuju somaklonsku varijabilnost kod istraživanih vrsta. Regeneracijski protokol razvijen u okviru ovog rada može se preporučiti za mikropropagaciju jer osigurava genetsku vjernost razvijenih biljaka.

Ključne riječi: *Iris* spp., mikropropagacija, somatska embriogeneza, somaklonska varijabilnost, aksilarno grananje, morfometrijska mjerenja, protočna citometrija, AFLP