Somaklonska varijabilnost kod ukrasnog bilja

Lukačević, Anita

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:598074

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

SOMAKLONSKA VARIJABILNOST KOD UKRASNOG BILJA

DIPLOMSKI RAD

Anita Lukačević

Zagreb, rujan, 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:
Biljne znanosti

SOMAKLONSKA VARIJABILNOST KOD UKRASNONG BILJA

DIPLOMSKI RAD

Anita Lukačević

Mentor: doc. dr. sc. Ivanka Habuš Jerčić

Zagreb, rujan, 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA STUDENTA

O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Anita Lukačević**, JMBAG 0119010823, rođen/a dana 01.05.1991. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

SOMAKLONSKA VARIJABILNOST KOD UKRASNOG BILJA

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____ _____

Potpis studentice

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta/ice **Anita Lukačević**, JMBAG 0119010823, naslova

SOMAKLONSKA VARIJABILNOST KOD UKRASNOG BILJA

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____ , dana

_____ .

Povjerenstvo:			potpisi:
1.	doc.dr.sc. Ivanka Habuš Jerčić	mentor	_____
2.	prof.dr.sc. Snježana Kereša	član	_____
3.	izv.prof.dr.sc. Vesna Židovec	član	_____

Zahvala

Ovim putem bih se, najprije, željela zahvaliti bratu i roditeljima koji su mi pružili podršku i imali strpljenje u svim trenucima moga školovanja i upućivali me na pravi put.

Također se zahvaljujem mentorici doc.dr.sc. Ivanki Habuš Jerčić koja mi je svojim savjetima pomogla u pisanju ovoga diplomskog rada i profesorici prof.dr.sc. Snježani Kereša zbog čijeg rada i prakse sam pronašla motivaciju i veliki interes za ovaj studij.

Na kraju, zahvaljujem se svim svojim prijateljima i kolegama, ali i profesorima koji su me pratili kroz sve godine studiranja.

Hvala od srca!

Sadržaj

1. Uvod 1

1.1. Cilj rada 2

2. Pregled literature 3

2.1. Somaklonska varijabilnost 3

2.1.1. Porijeklo i uzroci somaklonske varijabilnosti 4

2.1.2. Mehanizam somaklonske varijabilnosti 8

2.1.3. Stopa somaklonske varijabilnosti 9

2.1.4. Metode za identifikaciju somaklonske varijabilnosti 10

2.1.5. Važnost i upotreba somaklnoske varijabilnosti 15

2.2. Somaklonska varijabilnost kod ukrasnih biljnih vrsta 18

2.2.1. *Anthurium* ssp. Schott 22

2.2.2. *Caladium* ssp. Vent 25

2.2.3. *Chrysanthemum* ssp. L. 28

2.2.4. *Passiflora* ssp. L. 31

2.2.5. *Petunia x hybrida* D. Don ex W. H. Baxter 35

2.2.6. *Phalaenopsis* ssp. Bulme 38

2.2.7. *Rhododendron simsii* Planch. 42

2.2.8. *Saintpaulia ionatha* H.Wendl 46

2.2.9. *Syngonium podophyllum* Schott 49

2.2.10. *Torenia fournieri* Lind. 52

3. Zaključak 55

4. Popis literature 57

Životopis 66

Sažetak

Diplomskog rada studenta/ice **Anita Lukačević**, naslova

SOMAKLONSKA VARIJABILNOST KOD UKRASNOG BILJA

Somaklonska varijabilnost je spontana ili inducirana pojava koja se može javiti u kulturi biljnog tkiva u obliku genetskih ili epigenetskih promjena. Može imati negativan utjecaj ako je cilj dobivanja uniformnih genotipova ili može biti poželjna kod dobivanja novih genotipova ekonomski vrjednijih od donorskih i važan izvor genetske varijabilnosti. Za utvrđivanje somaklonske varijabilnosti koriste se morfološke, citološke i molekularne metode. Brojni somaklonovi ukrasnih biljnih vrsta, kao što su orhideje, afričke ljubičice, krizanteme, petunije, i dr., uspješno su komercijalizirani. U ovom radu dan je pregled dosadašnjih istraživanja vezanih za utvrđivanje somaklonske varijabilnosti kod ukrasnog bilja.

Ključne riječi: Somaklonska varijabilnost, ukrasno bilje, genetska varijabilnost, kultura biljnog tkiva

Summary

Of the master's thesis – student Anita Lukačević**,** entitled

SOMACLONAL VARIATION IN ORNAMENTAL PLANTS

Somaclonal variation is phenomenon that can occur in the plant tissue culture in the form of genetic or epigenetic variation. It can have a negative impact if the goal of the plant tissue culture is a production of genetic uniformn plants or it can be desirable in obtaining new genotypes of economically more valuable than donor plant and an important source of genetic variability. Morphological, cytological and molecular methods were used to determine somaclonal variability. Numerous somaclones of ornamental plant species, such as orchids, African violets, crisps, petunias, etc., have been successfully commercialized. This paper contains an overview of previous researches related to the determination of somaclonal variation in ornamental plants.

Keywords: Somaclonal variation, ornamental plants, plant tissue culture, genetic diversity

1. Uvod

Kultura biljnog tkiva je *in vitro* metoda vegetativnog razmnožavanja koja se odvija u sterilnim i kontroliranim uvjetima. Temelji se na prirodnoj pojavi razvoja svih biljnih organa iz jedne diferencirane stanice, a naziva se totipotentnost. Kultura biljnog tkiva je u proizvodnji komercijalizirana osamdesetih godina 20. st., a do tada je imala primjenu samo u istraživanjima (Idowu i sur., 2009). Razlog tome je mogućnost proizvodnje velikog broja klonova oslobođenih od virusa.

Kultura biljnog tkiva je, za biljku, stresna metoda propagacije koja može izazvati pojavu ,,off-type'' genotipova. Ta pojava se naziva somaklonska varijabilnost. Somaklonska varijabilnost je spontana ili inducirana pojava na koju utječe niz faktora koji su detaljnije opisani u nastavku rada. Ovaj tip varijabilnosti može biti posljedica epigenetskih (nenasljednih) i genetskih (nasljednih) promjena (Orbović i sur., 2007). Za identifikaciju somaklonske varijabilnosti koriste se morfološki markeri, molekularni markeri (AFLP, SNP, RAPD, RFLP, SSR i dr.), citološke metode i fiziološke/biokemijske metode.

Somaklonska varijabilnost izazvana genetskim promjenama može se primijeniti u oplemenjivačkim programima za dobivanje boljih genotipova ili za povećanje genetske varijabilnosti. Somaklonovi ukrasnog bilja, ratarskih, voćarskih i povrtnih kultura koja imaju bolja svojstva od postojećih priznati su kao kultivari i introducirani su u komercijalnu proizvodnju (Orbović i sur., 2007).

Ukrasno bilje pripada skupini ekonomski najznačajnijih biljnih vrsta koje se sve više proizvode tehnikama kulture biljnog tkiva. Ukoliko je cilj mirkopropagacije ukrasnog bilja dobivanje genetski uniformnih biljaka, pojava somaklonske varijabilnosti je nepoželjna, ali ako se pojavi u obliku ekonomski poželjnijeg svojstva nego kod matične biljke, primjerice nova boja cvijeta ili oblik lista, može biti važan izvor genetske varijabilnosti. Takvi somaklonovi su uspješno komercijalizirani kod velikog broja ukrasnih biljnih vrsta.

1.1. Cilj rada

Cilj ovoga diplomskog rada je napraviti detaljan pregled dosadašnjih istraživanja vezanih za identifikaciju somaklonske varijabilnosti kod ukrasnih biljnih vrsta i dati prikaz morfoloških, citoloških i molekularnih metoda za identifikaciju tih somaklonova. U radu su obrađene sljedeće ukrasne biljne vrste: afrička ljubičica (*Saintpaulia* ssp. H.Wendl.), orhideja (*Phaleopsis* ssp. Bulme), caladij (*Caladium* ssp. Vent), krizantema (*Chrysanthemum* ssp. L.), pasiflora (*Passiflora* ssp. L.), petunija (*Petunia hybrida* D. Don ex W. H. Baxter), anturij (*Anthurium* ssp. Schott), torenija (*Torenia fournieri* Lind.), indijska azaleja (*Rhododendron simsii* Planch.) i singonij (*Syngonium podophyllum* Schott).

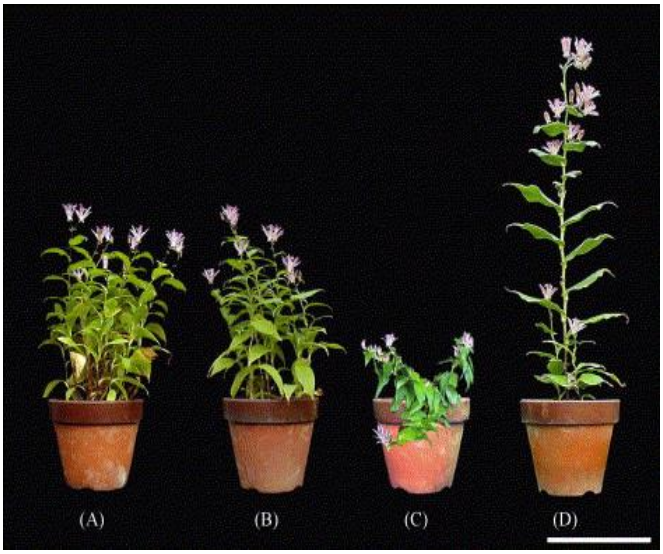
2. Pregled literature

2.1. Somaklonska varijabilnost

Sredinom 20. st. se smatralo da svi genotipovi dobiveni *in vitro* tehnikama regeneracije su klonovi matične biljke bez obzira na to da li su na regeneriranim biljkama uočene fenotipske promjene (Jelaska, 1994.). Prvo dokumentirano otkriće somaklonske varijabilnosti bilo je 1969. Te godine znanstvenici su otkrili postojanje varijabilnosti u broju kromosoma, morfološku i enzimatsku varijabilnost kod šećerne trske (*Saccharum officinarum* L.) (Sarmah i sur., 2017).

Skirvin i Janik, 1976. godine, su među prvima prepoznali važnost somaklonske varijabilnosti u poboljšavanju svojstava genotipova (Jain i sur., 1998). Komercijalizacija kulture biljnog tkiva započela je osamdesetih godina prošloga stoljeća, sukladno tome, sve se više pažnje posvećuje somaklonskoj varijabilnosti. Pojam somaklonske varijabilnosti uvode Larkin i Scowcroft 1981. godine (Jain i sur., 1998) i opisuju ga kao fenotipsku varijabilnost koja se javlja kod biljaka regeneriranih *in vitro* tehnikama (Skirvin i sur.,1994): „*Od sada se klonska uniformnost više opisuje kao izuzetak nego kao pravilo".*

Danas se somaklonska varijabilnost prati kod svih biljnih vrsta dobivenih regeneracijom u kulturi biljnog tkiva. Razlog tome je što je pojava somaklonske varijabilnosti spontana, nepredvidiva, trajna (genetska) ili privremena (epigenetska) može se pojaviti u jednom svojstvu ili na razini cijelog genoma (Leva i sur., 2012). Primjer somaklonova žabljeg ljiljana (*Tricyrtis hirta* Wall.) koji se razlikuju na fenotipskoj razini prikazan je na slici 1.



Slika 1. Somaklonska varijabilnost kod žabljeg ljiljana (*Tricyrtis hirta* Wall.)
(Izvor: sciencedirect.com)

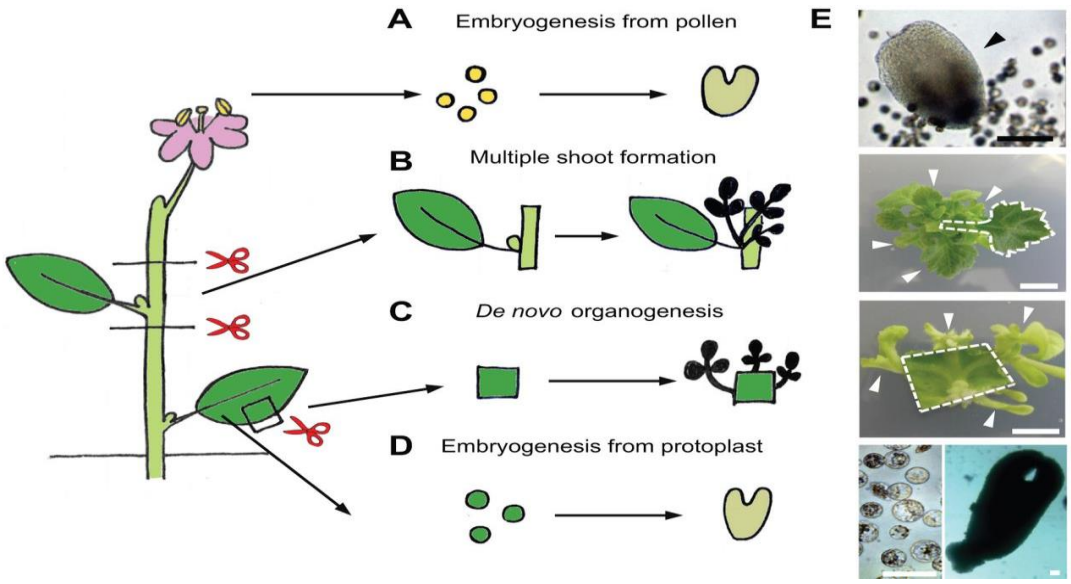
2.1.1. Porijeklo i uzroci somaklonske varijabilnosti

Pojava somaklonske varijabilnosti u kulturi biljnog tkiva je spontana, iako može biti i inducirana (Bairu i sur., 2011). Razumijevanjem porijekla i uzroka somaklonske varijabilnosti moguće je utjecati na učestalost njene pojave. Faktori koji utječu na učestalost pojave somaklonske varijabilnosti su slijedeći:

a. Postupci regeneracije

Važan faktor za normalan rast i razvoj biljke je stanična organizacija koja je nepostojeća u kulturi biljnog tkiva što je jedan od uzroka somaklonske varijabilnosti (Karp, 1994). Regeneracijom biljke u kulturi meristema, koji imaju stabilizirajući faktor, umanjuje se učestalost pojave somaklonske varijabilnosti, dok se u kulturi protoplasta, gdje nema organizacije stanica, povećava njena učestalost (Leva i sur., 2012).

Tehnike korištene u kulturi biljnog tkiva (slika 2) mogu se poredati prema genetskoj stabilnosti: mikropropagacija vegetacijskih vrhova i nodalnih segmenata, somatska embriogeneza, organogeneza pomoću kalusa i kultura protoplasta (Leva i sur., 2012; Karp, 1994).



Slika 2. Vrste eksplatata koje se primjenjuju u različitim tehnikama kulture biljnog tkiva
(Izvor: http://dev.biologists.org/content/develop/143/9/1442/F3.large.jpg?download=true)

b. Porijeklo eksplatata

Tkivo korišteno u kulturi biljnog tkiva (slika 2) ima značajan utjecaj na pojavu somaklonske varijabilnosti (Leva i sur., 2012). Meristemska tkiva poput pericikla, kambija i prokambija imaju diferencirane stanice što znatno umanjuje učestalost somaklonske varijabilnosti, a dediferencirana tkiva poput listova, stabljike i korijena, prilikom *in vitro* regeneracije, prolaze kroz fazu kalusa što uvelike povećava učestalost somaklonske varijabilnosti (Leva i sur., 2012; Sahijram i sur., 2003; Bairu i sur., 2011). Eksplantati za koje se pretpostavlja da imaju postojeću varijabilnost, provjeravaju se kroz dva ciklusa subkultivacije, a uočeni somaklonovi se odstranjuju, ukoliko somaklonska varijabilnost nije poželjna (Skirvin i sur., 1994).

c. Kemijski sastav hranidbenog medija

Koncentracija i vrsta regulatora rasta u hranidbenom mediju ima znatan utjecaj na učestalost somaklonske varijabilnosti (Leva i sur., 2012). Nepravilan omjer koncentracija auksina i citokinina mogu poremetiti genetsku strukturu stanica (Bairu i sur., 2011). Korištenjem auksina prilikom regeneracije iz kalusa povećana je stopa DNA metilacije što rezultira pojavom epigenetskih promjena (Giménez i sur., 2001).

Koncentracija i vrsta regulatora rasta u nekim slučajevima nije imala utjecaj na pojavu somaklonske varijabilnosti. Primjerice, Bennici i sur. (2004) postavili su pokus u kojemu su koristili somatsku embriogenezu kao tehniku regeneracije komorača (*Foeniculum vulgare* Mill.) pri različitim koncentracijama hormona rasta. Rezultati istraživanja su pokazali da hormoni rasta nisu imali signifikantni utjecaj na genetsku uniformnost regeneriranih biljaka. Bairu i sur. (2011) zaključuju da utjecaj vrste i koncentracije hormona rasta na pojavu somaklonske varijabilnosti ostaje tema daljnje rasprave i cilj budućih istraživanja.

d. Utjecaj genotipa

Svaki organizam drugačije reagira na uvjete stresa, pa tako i biljke u kulturi biljnog tkiva što dovodi do pojave varijabilnosti. Damasco i sur. (1998) potvrđuju tu tvrdnju usporedbom zastupljenosti somaklonova kod dva kultivara banane (*Musa* ssp.), a razlog tome je interakcija okoliša i genotipa**.**

e. Trajanje i broj subkultivacija

Trajanje i broj subkultivacija utječu na genetski stabilnost i učestalost somaklonske varijabilnosti, posebice kod kulture protoplasta i regeneracije iz kalusa. Bairu i sur. (2011) navode da prema istraživanju (Rodrigues i sur., 1998) stopa somaklonske varijabilnosti iznosi 1.3% nakon pete subkultivacije, a nakon jedanaeste je porasla na 3.8%. Nasuprot tome, neka istraživanja navode slučajeve u kojima se zadržala genetska uniformnost nakon velikog broja subkultivacija. Grašak (*Pisum sativum* L.) zadržao je genetsku uniformnost nakon 24 godine održavanja u *in vitro* uvjetima (Smykal i sur., 2007), a komorač (*Foeniculum vulgare* Mil.) nakon 17 mjeseci (Bennici i sur., 2004). Pretpostavlja se da je razlog utjecaj genotipa (Bairu i sur., 2011).

Petolino i sur. (2003) predlažu statistički model za predviđanje mutacijske stope na temelju broja subkultivacija, ali radi kompleksnosti biološkog sistema, model ima ograničenu upotrebu (Leva i sur., 2012).

f. Postojeća varijabilnost

Faktori koji utječu na aktivaciju postojeće varijabilnosti su (Bairu i sur., 2011):

- ***Kimere***

Kimere su organizmi koji, u sklopu svog genoma, sadrže različita tkiva (slike 3 i 4) čiji poredak utječe na genetsku stabilnost (Bairu i sur., 2011). Krikorian i sur. (1993) prikazuju utjecaj izbora eksplantata kod kimera na pojavu somaklonske varijabilnosti. Iz tog razloga potrebno je uzimati eksplantate s genetski uniformnog i stabilnog roditelja za dobivanje „*true-type"* klonova (Bairu i sur., 2011).



Slika 3. Kimera jabuke (*Malus* ssp.) (Izvor: https://fruitforum.files.wordpress.com)



Slika 4. Kimera dalije (*Dhallia* ssp.) (Izbor: pinterest.com)

- **Uloga staničnog ciklusa**

Stanični ciklus ima značajnu ulogu u rastu i razvoju biljke. Svaki postupak koji se razlikuje od normalnog (prirodnog, *in vivo*) rasta i razvoja može izazvati mutacije. Primjerice, u kulturi protoplasta pojavljuje se veliki broj pogrešaka prilikom sinteze mikrotubula, formiranja i orijentacije diobenog vretena i kod segregacije kromatida (Karp, 1994).

- **Promjene u strukturi i broju kromosoma**

Karakterizacija i klasifikacija promjena u strukturi kromosoma induciranih prilikom kulture biljnog tkiva je omogućila bolje razumijevanje somaklonske varijabilnosti (Bairu i sur., 2011). Promjene u strukturi kromosoma su najbolji pokazatelj učestalosti i opsega kariotipskih promjena (Lee i Philips, 1988). Promjene u strukturi kromosoma u kulturi biljnog tkiva izazivaju predominantne kromosomske aberacije, a kasna replikacija heterokromatina i neravnoteža u nukleotidnom bazenu izazivaju preraspodjelu kromosoma (Bryant, 1976).

- **Aktivacija pokretnih genetičkih elemenata (transpozona)**

Transpozoni ili pokretni genetički elementi su kratke sekvence molekule DNA u velikom broju zastupljene u cijelom genomu. Svojom pokretljivošću mogu doprinijeti preraspodjeli genoma i izazvati mutacije (Bairu i sur., 2011). Transpozoni se aktiviraju u stresnom okolišu, kao što je kultura biljnog tkiva i dovode do pojave somaklonova. Primjer somaklonske varijabilnosti izazvane pokretljivošću transpozona je nestabilna boja cvijeta kod *in vitro* regenerirane lucerne (*Medicago sativa* L.) (Jelaska, 1994).

2.1.2. Mehanizam somaklonske varijabilnosti

Smulders i Klerk (2010) su podijelili somaklonsku varijabilnost u dvije kategorije:

a. Genetske promjene (nasljedne)
b. Epigenetske promjene (nenasljedne)

a. Genetske promjene

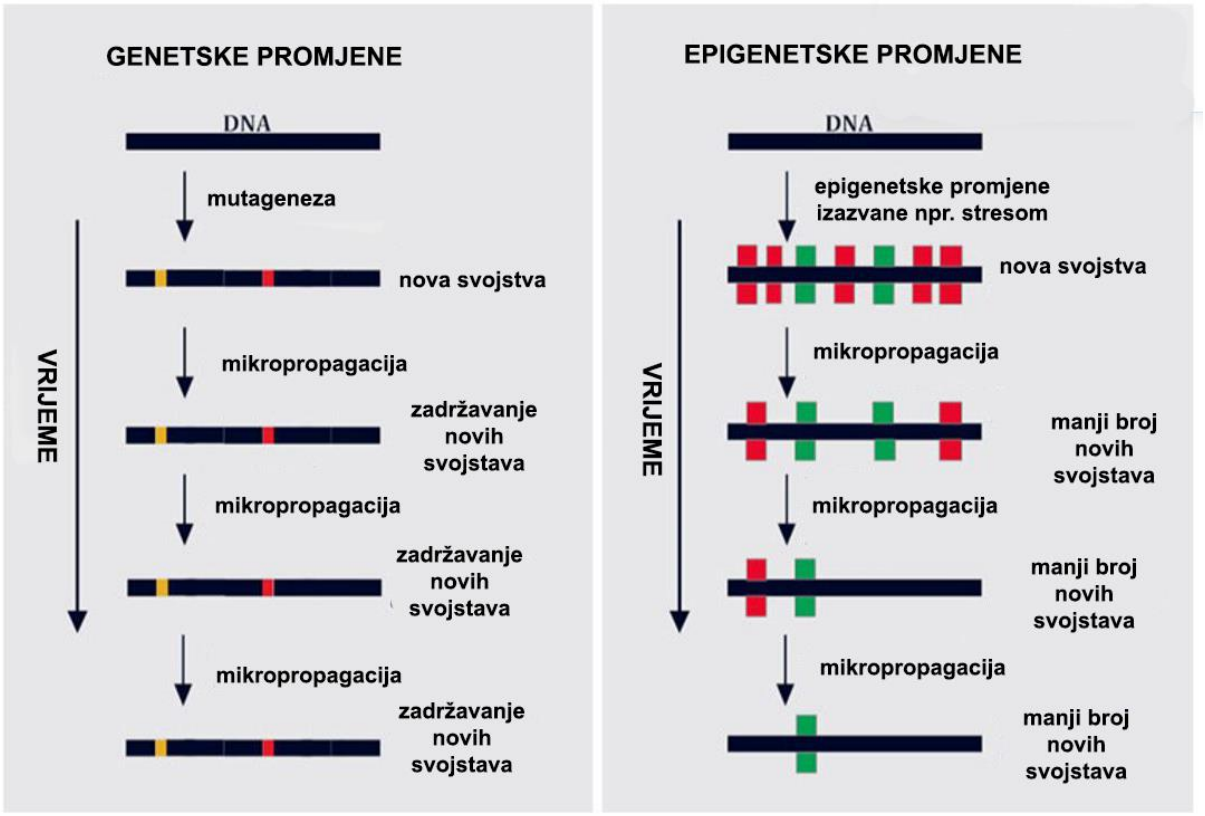
Genetske promjene obuhvaćaju fizičke promjene u sekvenci DNA što ih čini stabilnim i nasljednim (Sarmah i sur., 2017). Drugim riječima, genetske promjene se ponašaju u skladu s Mendelovim zakonima nasljeđivanja (Smulders i Klerk, 2010). Rezultat su promjena u broju kromosoma (euploidija i aneuploidija) i promjena u strukturi kromosoma (delecija, duplikacija, inverzija, translacija) što može biti posljedica (Sarmah i sur., 2017):

- Mutacija,
- Aktivacija pokretnih genetičkih elemenata,
- Amplifikacija gena,
- Kariotipske promjene.

b. Epigenetske promjene

Za razliku od genetskih promjena, epigenetske promjene su privremene i nisu nasljedne. Epigenetske promjene su promjene izazvane promjenom u ekspresiji gena. Mehanizam tih promjena temeljen je na DNA metilaciji i modifikacijama aminokiselina na repovima histona (Sarmah i sur., 2017). Za vrijeme DNA metilacije, metilna grupa se veže na citozin nakon replikacije DNA, a na sebe veže proteine koji sudjeluju u sintezi heterokromatina (Sarmah i sur., 2017). DNA metilacija ne ometa replikaciju DNA, ali inhibira transkripciju gena što direktno utječe na ekspresiju nekog svojstva (Smulders i Klerk, 2010). Neke epigenetske promjene mogu nestati u relativno kratkom vremenu, dok neke mogu biti prisutne kroz više generacija (Brettell i Dennis, 1991). Primjerice, *Arabidopsis thaliana* je zadržala epigenetske promjene kroz osam generacija (Johannes i sur., 2009).

Slika 4 prikazuje razlike između genetskih i epigenetskih promjena ovisno o vremenu. Vidljivo je da se genetske promjene zadržavaju kroz cikluse mikropropagacije (supkultivacije), a epigenetske promjene se s vremenom gube.



Slika 4. Razlika između genetskih i epigenetskih promjena
(Izvor: Smulders i Klerk, 2010)

2.1.3. Stopa somaklonske varijabilnosti

Somaklonska varijabilnost je teško predvidiva pojava (Sikirvin i sur.,1994) i ima signifikantno veću stopu učestalosti od prirodnih mutacija. Frekvencija somaklonova ovisi o genotipu biljke, tehnici kulture biljnog tkiva i dr. (Karp, 1994; Sikirvin i sur., 1994). Prema literaturi (Sikirvin i sur., 1994) stopa somaklonske varijabilnosti iznosi 1 – 3 % po subkultivaciji. Prihvatljiva stopa somaklonova u kulturi biljnog tkiva iznosi 3 – 5%, a kod banana (*Musa* ssp.), koja po prirodi ima veću stopu varijabilnosti, do 10% (Sahijaram i sur., 2003).

2.1.4. Metode za identifikaciju somaklonske varijabilnosti

a. Morfološke metode identifikacije

Morfološki markeri (vizualni ili klasični) najstariji su tipovi markera koji se baziraju na vizualnoj identifikaciji nekog svojstva (Kunert i sur., 2003). Uglavnom su karakterizirani kao fenotipska svojstva jedinke kao što su boja cvijeta, visina stabljike, boja i oblik ploda, i dr. (Collard i sur., 2005). Svojstva koja su kontrolirana manjim brojem gena (kvalitativna svojstva) i nisu pod utjecajem okoline, mogu biti korištena kao markeri (Staub i sur., 1996). Ipak, većina agronomski važnih svojstava u oplemenjivanju bilja, kontrolirana su većim brojem gena, a okolina ima veliki utjecaj na njihovu ekspresiju, što je, ujedno, i najvažniji nedostatak morfoloških markera.

b. Biokemijske/fiziološke metode

Ove metode identifikacije somaklonova temelje se na razlici kako biljka reagira u različitim okolinama. Narušavanje normalnog tijeka metabolizma i promjene u koncentraciji giberlinske kiseline, koja je regulator rasta i razvoja biljke, i izlučivanja enzima (Bairu i sur., 2011), može biti pokazatelj somaklonske varijabilnosti (Sandoval i sur., 1995). Količina dnevne svjetlosti je, također, indikator somaklonske varijabilnosti. Damasco i sur. (1998) predlažu metodu identifikacije varijabilnosti koristeći fotoinhibiciju, stanje fiziološkog stresa kod kojega se u biljci ne odvija fotosinteza u uvjetima veće količine dnevne svjetlosti (Adir i sur., 2003). Ova metoda se temelji na usporedbi reakcije *in vitro* regeneriranih biljaka na različitu količinu svjetlosti (Damasco i sur. 1998). Kao biokemijska/fiziološka metoda identifikacije somaklonske varijabilnosti kotisti se i varijabilnost u količini sintetiziranih pigmenata, kao što su klorofil, antocijan, karotenoid, i dr. (Shah i sur., 2003)

Biokemijske metode identifikacije somaklonske varijabilnosti su kompleksne i zahtjevaju vještinu, iskustvo i mnogo rada zbog čega nisu našle mjesto u komercijalnoj primjeni (Bairu i sur., 2011).

c. Citološke metode identifikacije

Citološke metode identifikacije somaklonske varijabilnosti zasnivaju se na varijabilnosti broja i strukture kromosoma i drugih staničnih komponenti (DNA, RNA molekule, kloroplasti i dr.). Prve citološke analize provodile su se pomoću kariooloških analiza, brojanjem kromosoma i proučavanjem kromosomskih aberacija mikroskopom (Raimondi i sur., 2001; Mujib i sur., 2007). No, te metode su se pokazale skupe, dugotrajne i nepouzdane. Od citoloških metoda identifikacije sve češće se koristi protočna citometrija koja je znatno brža i pouzdanija metoda identifikacije (Doležel i sur., 2004). Kod protočne citometrije najprije se pripravlja tekuća suspenzija nukleusa čija je DNA obilježena fluorescentnim bojama. Takva suspenzija se pušta kroz tekućinu na čijem se toku nalazi aparatura koja na bazi obasjavanja stanica UV svetlošću mjeri intenzitet fluorescentnog sjaja. Sadržaj suspenzije se kategorizira prema intenzitetu fluorescentnog sjaja ili prema sadržaju DNA (Doležel i Bartoš, 2003). Prema Doležal i Bartoš (2003), glavni nedostatak protočne citometrije je nepostojeća međunarodno standardizirana proba.

d. Molekularne metode identifikacije

Markeri označavaju prisustvo vidljivog i/ili mjerljivog svojstva nekog organizma (boja i oblik lista, visina stabljike, boja cvijeta, ploda i dr.) ili određenih molekula (proteini i nukleinske kiseline) (Guberac i sur., 2005).

Molekularni markeri su određene molekule (proteinski markeri) ili poznate DNA sekvence koje su vezane za gene koji kontroliraju neko svojstvo od agronomske važnosti ili se nalaze unutar gena (Treskić i sur., 2011). Učinkovitost pojedinog markera bazirana je na prisustvu polimorfizma, varijabilnosti u nekom svojstvu u homogenim uvjetima ili na prisustvu ili odsutnosti benda između dvije ili više jedinki. Polimorfizam molekula može se detektirati pomoću elektroforeze, na principu pokretljivosti molekula unutar gela pod utjecajem istosmjerne struje, na principu hibridizacije nukleinskih kiselina, vezanja za određeno mjesto u DNA lancu i pomoću PCR-a (lančana reakcija polimerazom) (Collard i sur., 2005; Varshney i sur., 2007). Molekularni markeri podijeljeni su na proteinske markere (enzimi, skladišni proteini) i na DNA markere (mitohondrijska, genomska, kloroplastna DNA i RNA).

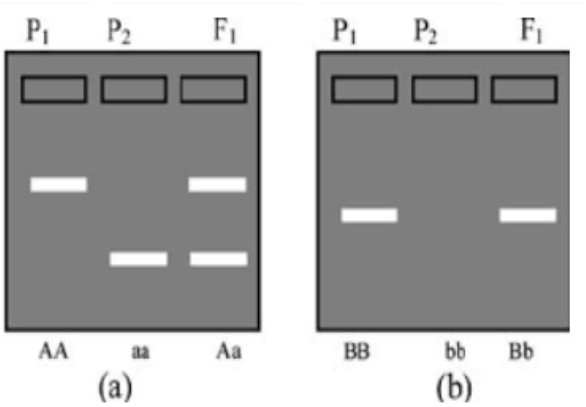
a. Izoenzimski markeri

Proteini su produkti transkripcije i translacije unutar stanice koji sudjeluju u svim biokemijskim reakcijama unutar svakog organizma. Kao markeri, proteini su korišteni dugi niz godina u identifikaciji biljnih vrsta (Kunert i sur., 2003). Proteini su analizirani kao izoenzimi, drugačiji oblik proteina, koji kontrolira identičan biokemijski proces (Kunert i sur., 2003).

Metoda ne zahtijeva izolaciju DNA niti poznavanje poretka nukleotidnih baza, dizajniranje početnica niti probe (Kumar i sur., 2009). Iako je metoda otkrivanja polimorfizma pomoću izoenzima jednostavna i jeftina, ima nekoliko važnih nedostataka: niska polimorfnost, ograničen broj biljega (Guberac i sur., 2005). Profil bendova na gelu može se razlikovati ovisno o tipu biljnog organa zbog različite ekspresije gena (list i korijen) (Kumar i sur., 2009) i pod utjecajem je okolišnih uvjeta (Kunert i sur., 2003).

b. DNA markeri

DNA markeri su poznatog poretka nukleotida koji su najčešće smješteni u nekodirajućim regijama DNA (Collard i sur., 2005) vezani za gene koji kontroliraju neko svojstvo od agronomske važnosti (Treskić i sur., 2011). Mogu se opisati kao posljedica mutacija ili promjena na lokusima (Kumar, 2009) – polimorfizam. Za razliku od morfoloških i proteinskih markera, DNA markeri su zastupljeni u velikom broju i nisu pod utjecajem okoline ili stadiju razvoja organizma (Collard i sur., 2005) u otkrivanju somaklonske varijabilnosti (Varshney i sur., 2007).



Slika 5. (a) Kodominantni tip markera mogu razlikovati homozigote od heterozigota. Na slici su jasno vidljivi bednovi homogizotnih roditelja P1 i P2 i heterozigotnog potomstva F1 (b). Dominantni tip markera ne razlikuje homozigote od heterozigota što se vidi u nedostatku benda recesivnog roditelja.

DNA markeri mogu se podijeliti na kodominantne markere i dominantne markere, ovisno da li pojedini marker može razlikovati heterozigote od homozigota (Collard i sur., 2005) (slika 5):

- **Kodominantni markeri** mogu imati više različitih alela, a dominantni samo dva (0 i 1) (Collard i sur., 2005). Kodominantni DNA markeri su SSR (Simple Sequence Repeat) i RFLP (Restriction Fragment Lenght Polymorphis).
- **Dominantni markeri** su RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), ISSR (Inter Simple Sequence Repeats), SNP (Single Nucleotid Polymorphism), SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) i dr.

Idealni tip molekularnog markera mora zadovoljavati određene kriterije, kao što su prisutnost polimorfizma, kodominantnost, marker mora biti ravnomjerno raspoređen u genomu, mora biti neovisan o utjecaju okolišnih uvjeta i dr. (Kumar et al, 2009). Od velikog broja poznatih markera, niti jedan ne zadovoljava sve kriterije, ali za uspješnost metode dovoljno je da zadovoljava nekoliko kriterija (Kumar et al, 2009). Sve navedene metode identifikacije, sa svim svojim prednostima i manama (tablica 1) imaju važnu ulogu u oplemenjivačkim programima u kojima se koriste somaklonovi kao izvor genetske varijabilnosti i u komercijalnoj proizvodnji gdje se identificirani somaklonovi uklanjaju u ranim fazama rasta i razvoja radi sprečavanja daljnjih gubitaka.

Tablica 1. Prednosti i nedostaci metoda identifikacije somaklonske varijabilnosti (Krishna i sur., 2016)

Metoda	Prednosti	Nedostaci
Morfološke metode	Vizualno raspoznavanje	Dugotrajna metoda
	Nije potreban laboratorij	Brojčano ograničena
	Preliminarna metoda	Ne razlikuje genotip od fenotipa
Citološke metode (protočna citometrija)	Brza, jednostavna i efektivna metoda	Citološke sastavnice mogu ometati kvantitativno obojenje DNA
	Brza i efektivna metoda u rutinskim analizama velikog broja uzoraka	Nepostojeća međunarodno standardizirana proba
	Mogućnost otkrivanja i najmanjih promjena na kromosomu	Brojanje kromosoma je dugotrajno
Izoenzimski markeri	Jednostavnost metode	Brojčano ograničeni
	Kodominantnost	Pod utjecajem okolinskih uvjeta
		Ekspresija ovisna o vrsti biljnog organa/tkiva
		Uspješnost metode ovisi o vrsti
Molekularni markeri	Kodominantnost (SSR, AFLP)	Dominantnost (RAPD, RFLP)
	Neovisnost o porijeklu uzorka DNA	Moguća nehomolognost fragmenata iste veličine kod ISSR multilokusne metode
	Neovisnot o okolišnim uvjetima	Neki markeri zahtijevaju visoku kvalitetu DNA (AFLP)
	Fenotipska neovisnost	Pojava null alela kod SSR markera
	Mogućnost identifikacije genetskih i epigenetskih promjena	Visoka cijena dizajniranja početnica kod SSR markera

2.1.5. Važnost i upotreba somaklnoske varijabilnosti

Napredak u tehnologiji kulture biljnog tkiva donio je mogućnost propagacije velikog broja raznih biljnih vrsta u relativno kratkom vremenskom periodu zbog čega je kultura biljnog tkiva komercijalizirana. Glavni nedostatak u komercijalnoj proizvodnji mikropropagacijom je pojava somaklonske varijabilnosti koja narušava genetsku uniformnost regeneranata. S druge strane, somaklonska varijabilnost pokazala se kao alternativni izvor genetske varijabilnosti za svojstva od interesa u oplemenjivačkim programima (Krishna i sur., 2015).

Somaklonska varijabilnost obuhvaća široki spektar fenotipskih (kvalitativnih) i genotipskih (kvantitativnih) promjena (Landey, 2013). Neke fenotipske promjene, kao što su promjena boje i oblika lista i cvijeta, nemaju značajan utjecaj na normalnu funkciju biljke. Fenotipske promjene koje utječu na građu biljke mogu imati štetan, ali i letalan učinak (Landey, 2013). Etienne i Betrand (2003) navode da somaklon kave (*Coffea arabica* L.) s više izdanaka ugiba nakon 6 mjeseci u stakleniku. Somaklonska varijabilnost može imati pozitivan i negativan učinak na kvantitativna svojstva poput visine biljke, biomasu, prinos zrna, kemijski sastav i na sintezu eteričnih ulja.

Genetska varijabilnost je u današnje vrijeme u neprekidnom opadanju što je rezultat ograničavanja izvora za svojstva od interesa u oplemenjivačkim programima. Klasični postupak oplemenjivanja neke biljne vrste zahtjeva mnogo rada, iskustva i vremena; potrebno je, otprilike, 10 do 15 godina za stvaranje nove sorte (Krishna i sur., 2015). Alternativni izvor genetske varijabilnosti se pronalazi u somaklonskoj varijabilnosti koja ima svoje prednosti i nedostatke (tablica 2).

Tablica 2. Pregled prednosti i nedostataka somaklonske varijabilnosti (Sarmah i sur., 2017; Krishna i sur., 2015)

Prednosti somaklonske varijabilnosti	Nedostaci somaklonske varijabilnosti
Uspješna selekcija na otpornost na abiotske stresove	Pojava nepoželjnih svojstava
Neinvazivna i jeftinija od drugih metoda za manipulaciju gena	Epigenetske promjene (ne nasljedne)
Visokoponovljiva i stabilna varijabilnost	Nepredvidiva varijabilnost
Povećana proizvodnja sekundarnih metabolita	Varijabilnost ovisi o genotipu
Nema kontaminacije raznim patogenima	Nepostojeća metoda selekcije za kvantitativna svojstva
Izvor genetske varijabilnosti	

Do danas je priznat veliki broj novih kultivara koji su dobiveni kao rezultat somaklonske varijabilnosti: *Eustoma grandifolium (slika 6)*, *Ipomea batatas* 'Scarlet', *Mustard Brassica* 'Pusa Jai Kisan' (slika 8), *Apium* UC-T3 somaklon, *Paulownia tomentosa* 'Snowstorm' (slika 7), *Oryza sativa* 'Hasuyume' i dr. (Chawla, 2002).



Slika 6. *Eustoma grandifolium* (Izvor: https://www.gardensonline.com.au/)



Slika 7. *Paulownia tomentosa* 'Snowstorm' (izvor: pl.wikipedia.org)



Slika 8. *Mustard Brassica* 'Pusa Jai Kisan' (izvor: https://www.biolib.cz/)

Somaklonska varijabilnost se, također, može pojaviti i u obliku otpornosti na bolesti i abiotske stresove. Regeneracijom šećerne trske (*Saccharum officinarum* L.) iz kalusa su dobiveni somaklonovi kod kojih je utvrđena otpornost na sivu pjegavost (*Helminthosporium sacchar*) i na *Fiji virus* (Chawla, 2002).

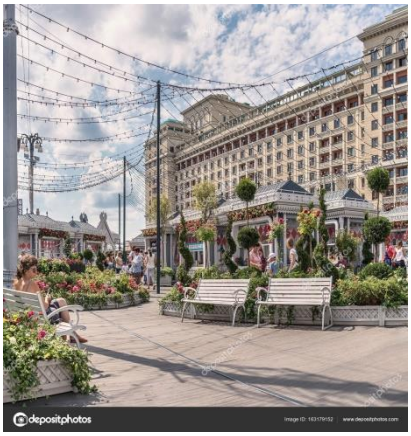
Za otpornost na abiotske stresove pronađeni su somaklonovi sa sljedećim svojstvima (Chawla, 2002).:

- Otpornost na hladnoću: ozimna pšenica (*Triticum aestivum* L.),
- Tolerantnost na salinitet: duhan (*Nicotiana tabaccum* L.), riža (*Oryza sativa* L.), krumpir (*Solanum tuberosum* L.),
- Tolerantnost na aluminij: rajčica (*Solanum lycopersicum* L.), duhan (*Nicotiana tabaccum* L.), riža (*Oryza sativa* L.),
- Tolerantnost na sušu: sirak (*Sorghum bicolor* Moench),
- Otpornost na herbicide: duhan (*Nicotiana tabaccum* L.), soja (*Glycine max* L.), kukuruz (*Zea mays* L.).

Pojava somaklonske varijabilnosti je spontana, nepredvidiva, trajna ili privremena i može se pojaviti u jednom svojstvu ili na cijelom genomu (Leva i sur., 2012).

2.2. Somaklonska varijabilnost kod ukrasnih biljnih vrsta

Ukrasne biljne vrste su jednogodišnje, dvogodišnje i višegodišnje vrste (trajnice, grmlje i drveće) koje imaju estetsku vrijednost. Koriste se za ukrašavanje okućnica, interijera (slika 10), gradskih trgova (slika 9), parkova, vrtova, za izradu cvjetnih aranžmana (slika 11), ograđivanje prostora i ispunjavanje ne izgrađenih zona, primjerice uz ceste. Uz estetsku ulogu, ukrasne biljne vrste imaju i važnu ekološku ulogu, posebice u urbanim sredinama: oprašivanje, održavanje bioraznolikosti, regulacija lokalne klime i temperature, pročišćavanje zraka i smanjenje buke (Speak i sur., 2015).



Slika 9. Ukrasno bilje u Moskvi, Rusija (Izvor: https://st3.depositphotos.com)



Slika 10. Ukrasne vrste u interijeru (Izvor: http://3.imimg.com/)



Slika 11. Ukrasne vrste za izradu cvjetnih aranžmana (Izvor: black-ires.com)

Osim estetske i ekološke, važna je i ekonomska uloga ukrasnih biljnih vrsta. Globalna komercijalna proizvodnja ukrasnog bilja je u konstantnom je porastu. Najveći svjetski proizvođači ukrasnih vrsta su: Nizozemska (33%), Japan (24%), SAD (12%), Italija (11%), Tajland (10%) i ostale zemlje (14%). Najveći svjetski izvoznici ukrasnog bilja (Nizozemska, Kolumbija, Italija i Izrael) drže 80% svjetskog tržišta, a zemlje u razvoju drže 20% svjetskog tržišta (Rajagopalan, 2000; Schiva, 2000). Visoka potražnja zahtijeva proizvodnju velikog broja ukrasnog bilja u kratkom vremenu. Klasične metode propagacije, samostalno, ne mogu zadovoljiti potrebe tržišta. Uvođenje kulture biljnog tkiva 80-tih godina prošlog stoljeća uvelike je olakšalo i ubrzalo komercijalnu proizvodnju. Danas se u svijetu oko 160 rodova s ukrasnom vrijednošću propagira kulturom biljnog tkiva (Rout, 2006).

Uz masovnu proizvodnju, tržište traži konstantno uvođenje novih kultivara. Oplemenjivanje ukrasnih biljnih vrsta, uz dobivanje genotipova otpornih na biotske i abiotske stresove, ima naglasak na dobivanje genotipova s novim svojstvima koja su ekonomski superiornija od postojećih. Ta svojstva uključuju morfološka svojstva biljke: pigmentacija vegetativnih organa i cvjetova, razne varijacije u obliku listova i latica, i produljenje životnog vijeka u vazama (Mujib i sur., 2013). Intenzivno klasično oplemenjivanje bilja s ciljem dobivanja novih svojstava ukrasnog bilja s višom ekonomskom vrijednosti od postojećih iscrpilo je genetsku varijabilnost u oplemenjivačkim populacijama (Deng, 2012). Schum (2003) navodi da su ukrasne biljne vrste idealne za primjenu invazivnih mutacijskih metoda za dobivanje novih svojstava od ekonomskog interesa, kao što su zračenje, primjena mutagenih sredstava, genetsko inžinjerstvo, zbog lakog praćenja fenotipskih promjena.

Tablica 3. Somaklonovi ukrasnih biljnih vrsta kod koji su identificirana svojstva od ekonosmke važnosti (Krishna i sur., 2016)

Ukrasna vrsta	Svojstvo od interesa	Literatura
Aglonema *(Aglaonema* Schott)	Priznati kultivari: 'Moonlight Bay' i 'Diamond Bay'	Henny i sur.(1992, 2003)
Anturij *(Anthurium* sp. Schott)	Priznati kultivar: 'Orange Hot'	Henny i Chen (2011)
***Begonija (Begonia x elatior* L.)**	Morfološka svojstva, broj cvjetova po biljci, veličina cvijeta	Jain (1997)
Pjetlova kresta *(Celosia argentea* L.)	Otpornost na nematode	Opadobe i Adebooye (2005)
Krizantema *(Dendranthema grandiflora* L.)	Varijabilnost lista, oblik cvijeta i veličina latice Krizantema izgleda kao tratinčica Varijabilnost u boji svijeta	Ahloowalia (1992) Jevremović i sur. (2012) Miler i Zalewska (2014)

Tablica 3. Somaklonovi ukrasnih biljnih vrsta kod koji su identificirana svojstva od ekonosmke važnosti (Krishna i sur., 2016) (Nastavak)

Ukrasna vrsta	Svojstvo od interesa	Literatura
Iglica (*Geranium* spp. L.)	Veći i atraktivniji cvijet	Skirvin i Janick (2013)
	Mutant sa visokom koncentracijom izomenthona	Gupta i sur. (2001)
Grebera (*Grebera jamesonii* Bolus)	Novi kultivari	Minerva i Kumar (2013)
Dnevni ljiljan *(Haemerocallis* spp. L.)	Patuljasti kratki cvjetovi, muški cvjetovi sterilni	Griesbach (1989)
Ukrasni đumbir (*Hedychium* sp*. L.*)	Patuljasti i išarani kultivar	Sakhanokho i sur. (2012)
Filodendron *(Philodendron* sp. Schott)	Kultivar 'Baby Hope'	Devanand i sur. (2004)
Singonij (*Syngonium podophyllum* Schott)	22 nova kultivara sa različitim i stabilnim lisnim svojstvima	Henny i Chen (2011)
Tulipan (*Tulipa* sp. L.)	Somaklon Bs6 sa crveno ljubičastim dužim cvijetom i stabljikom	Podwyszynska i sur. (2010)
Torenia (*Torenia fournieri* Lind.)	Varijabilnost u boji cvijeta	Nhut i sur. (2013)

Somaklonska varijabilnost, koja se spontano javlja u kulturi biljnog tkiva, pokazala se kao potencijalno dobar i neinvazivan izvor genetske varijabilnosti kod ukrasnih biljnih vrsta. Provedena su brojna istraživanja na velikom broju biljnih vrsta s ciljem identifikacije somaklonske varijabilnosti, njenog porijekla, mehanizma i metode kojom se može inducirati somaklonska varijabilnost (Mujib i sur., 2013). Tablica 3. prikazuje neke somaklonove ukrasnih biljnih vrsta kod kojih su pronađena nova svojstva ekonomski značajnija od postojećih.

U nastavku je dat detaljan pregled ukrasnih biljnih vrsta na kojima su provedene identifikacije somaklonske varijabilnosti.

2.2.1. *Anthurium* ssp. Schott

Porodica: Kozlačevke (*Araceae)*

Hrvatski naziv: Anturij, flamingo, flamingov cvijet

Porijeklo: Središnja i južna Amerika



Slika 12. Anturij (*Anthurium* ssp. Schott) (Izvor: bakker.com)

Rod *Anthurium* obuhvaća oko 500 vrsta raznih morfoloških karakteristika (Brickell, 2008) koje predstavljaju simbol ljubavi i prijateljstva. Anturij (slika 12) postaje popularna ukrasna biljka nakon drugog svjetskog rata (Herwig, 1975) i uzgaja se kao sobna biljka ili za izradu cvjetnih aranžmana. Kao sobna biljka, anturij zahtjeva zasjenu i veliku količinu vlage (Herwig, 1975). Iako je zaštitna boja „cvijeta" ove biljke crvena, danas postoje brojni kultivari sa širokim spektrom boja.

Vrijeme cvatnje: Dugi period cvatnje (Winatro i sur., 2010).

Morfološka svojstva:

Anturij je zimzelena, uspravna, penjajuča ili razgranata trajnica koja se u florikulturi najviše uzgaja zbog pricvjetnih listova raznih boja i, ponekad, zbog listova (Brickell, 2008). Listovi ove vrste su različitih oblika, najčešće srcolikog ili kopljastog oblika. Plojka je zelene boje i premazana je voštanom prevlakom (Brickell, 2008). Ono što se naizgled čini kao cvijet je zapravo pricvjetni list ili brakteja raznih boja koja štiti biljku i privlači oprašivače. Kod anturija takva brakteja se naziva spata (eng. *spathe*). Pravi cvat anturija je *klip* (eng. *spadix*) sastavljen od velikog broja spiralno posloženih cvjetića, a plod je dvosjemena boba (Šiber, 2018) (slika 13). Anturij je dvospolna i hermafrodinta vrsta kod koje se najprije razvijaju ženski spolni organi, a mjesec dana kasnije, i muški (Winatro i sur., 2010). Rezultat takvog razvoja spolnih organa kod anturija je visoka stopa stranooplodnje (Collette, 2004).



Slika 13. Morfološki prikaz anturija
(Izvor: https://upload.wikimedia.org/)

Način razmnožavanja:

Anturij (*Anthurium* ssp. Schott) se u prirodi razmnožava sjemenom (Dufour i Guerin, 2006), a u komercijalnoj proizvodnji vegetativnom propagacijom iz više razloga. Sjeme anturija brzo gubi klijavost zbog čega ga je nemoguće skladištiti (Winatro i sur., 2010), a biljke razvijene iz sjemena nisu genetski uniformne zbog visoke stope stranooplodnje (Dufour i Guerin, 2006). Sljedeći važan nedostatak uzgoja iz sjemena je dugotrajan rast i razvoj. Anturiju je potrebno oko 3 godine do pune zrelosti (Winatro i sur., 2010). Rješenje za navedene poteškoće znanstvenici su pronašli u kulturi biljnog tkiva. Anturij se *in vitro* propagira direktnom ili indirektnom organogenezom i embriogenezom koristeći klice, lisne peteljke, spatu ili klip kao eksplantate (Joseph et al. 2003; Martin et al. 2003; Viegas et al. 2007).

Somaklonska varijabilnost – rezultati istraživanja:

Winatro i sur. (2010) predlažu kulturu poluantera kao tehniku *in vitro* propagacije anturijuma. Anturij u kulturi poluantera najprije razvije kaluse iz kojih se razvijaju mladi izdanci. Kalus, kao neorganizirana nakupina stanica, utječe na pojavu somaklonske varijabilnosti kod regeneriranih biljaka. Na temelju tih spoznaja, Winatro i sur. (2010) proveli su istraživanje vezano za identifikaciju somaklonova anturija u kulturi poluantera koristeći morfološke i citološke metode identifikacije.

Morfološkom analizom, pomoću kataloga UPOV TG/86 i kartica boja, utvrđena je varijabilnost u boji i obliku spate i klipa (slika 14).



Slika 14. Varijabilnost u boji i veličini klipa i spate kod somaklonova anturija (Izvor: Winatro i sur., 2010)

Identifikacija somaklonova anturija citološkom metodom brojanja kromosoma na vrhu korijena i brojanja kloroplasta pokazuje varijabilnost u broju kloroplasta i stupnju ploidije: haploid, aneuploid, diploid i triploid. Autori zaključuju da varijabilnost na citološkoj razini utječe na ekspresiju morfoloških svojstava dobivenih somaklonova (Winatro i sur., 2010).

Morfološke promjene somaklonova anturija dobivenih regeneracijom iz kulture poluantera, *in vitro* tehnike koja ima visoku stopu somaklonske varijabilnosti, mogu se iskoristiti za dobivanje superiornih genotipova od ekonomske važnosti.

2.2.2. *Caladium* ssp. Vent

Porodica: Kozlačevke, kozlaci (*Araceae)*

Hrvatski naziv: Kaladij, šareni korijen, Isusovo srce

Porijeklo: Središnja i Južna Amerika



Slika 15. Kaladij (*Caladium* ssp. Vent)
(Izvor: https://www.longfield-gardens.com/_ccLib/image/plants/DETA5-1990.jpg)

Kaladij (slika 15) je ukrasna biljna vrsta koja se uzgaja kao sobna biljka ili u vrtovima (Herwig, 1975). Boja, oblik, išaranost listova kod kaladija predstavljaju svojstva od interesa u komercijalnoj proizvodnji i u oplemenjivačkim programima (Cao i sur., 2016; Deng, 2012).

Vrijeme cvatnje:

Kaladij koji se uzgaja kao ukrasna biljka rijetko cvate. Za poticanje cvatnje ove vrste potrebno je stvoriti suptropske i tropske uvjete (Grant, 2018).

Morfološka svojstva:

Kaladij (*Caladium* ssp. Vent) je ukrasna trajnica suptropskog i tropskog područja koja stvara podzemne gomolje. Ova ukrasna vrsta niskoga rasta ima razdijeljene listove, ravnog ili valovitog ruba i kopljastog, srcolikog ili lancetastog oblika (slika 16), sjajne lisne plojke raznih boja i šara (slika 15), i istaknutih žila (Cao i sur. (2016). Cvat kaladija se razvija kada biljka dođe do pune zrelosti (Grant, 2018). Građa cvata kaladija je karakteristična za porodicu kozlaca (*Araceae).* Cvat je klip (eng. *spadix*) sastavljen od velikog broja spiralno posloženih cvjetića ugodna mirisa (Grant, 2018) i obavijen je spatom (eng. *spathe*) (Šiber, 2018). Za razliku od ostalih ukrasnih vrsta ove porodice, spata kaladija nije obojena žarkim bojama (Grant, 2018). Plod je sitna boba.



Slika 16. Morfološki prikaz kaladija
(Izvor: https://encrypted-tbn0.gstatic.com/)

Način razmnožavanja:

Kaladij se razmnožava vegetativnim putem pomoću izdanaka koji rastu na gomolju biljke ili, rjeđe, sjemenom (Grant, 2018). Kultura biljnog tkiva ove ukrasne vrste koristi se s ciljem proizvodnje biljaka oslobođenih od patogena, propagacije novih kultivara i za dobivanje sintetičkog sjemena (Ahmed i sur., 2002). Kao i kod drugih biljnih vrsta, uz kulturu biljnog tkiva javlja se i somaklonska varijabilnost.

Somaklonska varijabilnost – rezultati istraživanja

Cao i sur. (2016) provode istraživanje sa ciljem utvrđivanja vrste i stope somaklonske varijabilnosti, utjecaja vrste eksplantata i hormona auksina na pojavu somaklonske varijabilnosti kod kaladija (*Caladium* 'Red flash'). Identifikaciju somaklonske varijabilnosti provode pomoću citoloških, morfoloških i molekularnih metoda. Analizom je utvrđeno da vrsta eksplantata i auksini utječu na povećanje stope somaklonske varijabilnosti kod kaladija. Najveći postotak somaklonova kaladija (25%) dobiven je regeneracijom iz zrelih listova na mediju koji sadrži hormon rasta auksin 2,4-D. Dobiveni somaklonovi se razlikuju u obliku i veličini listova, obojenju glavnih žila lista i išaranosti lisne plojke. Prema navedenim karakteristikama, regenerirane biljke podijeljene su u 10 skupina (slika 17).



Slika 17. Listovi somaklonova kaladija (*Caladium* 'Red flash) podjeljenih u 10 skupinama
(Izvor: Cao i sur., 2016)

Protočnom citometrijom i brojanjem kromosoma utvrđena je varijabilnost u koncentraciji nuklearne DNA i u broju kromosoma. Somaklonovi kaladija s 1.1 - 5.4% manjim sadržajem DNA imaju jedan kromosom manje, a somaklonovi sa 5.4 - 9.2% manjim sadržajem DNA imaju dva kromosoma manje. Jedan somaklon je imao 95% više nuklearne DNA. Rezultati citološke analize govore da na pojavu somaklonske varijabilnosti kod kaladija utječe promjena u broju kromosoma.

Molekularna analiza provedena je pomoću SSR markera. SSR markerima CaM1 i CaM103 utvrđena je varijabilnost na bendovima kod 9 uzoraka. Uočen je gubitak alela kod 8 uzoraka i promjena veličine benda kod jednog uzorka (Cao i sur., 2016).

Većina dobivenih somaklonova imaju lošija svojstva od postojećih kultivara, što predstavlja limitirajući faktor primjene somaklonske varijabilnosti u oplemenjivačkom programima. Neki somaklonovi kaladija (*Caladium* 'Red flash) imaju nova svojstva od interesa i mogu biti priznati kao novi kultivari. Na tim somaklonovima je uočena ružičasta boja listova, ljubičaste pjege i deblja lisna plojka (Cao i sur., 2016).

2.2.3. *Chrysanthemum* ssp. L.

Porodica: glavočike (*Asteraceae*)

Hrvatski naziv: krizantema

Porijeklo: Kina

Krizantema (*Chrysanthemum* ssp. L.) (slika 18) pripada skupini ekonomski najznačajnijih ukrasnih biljnih vrsta s višestrukom uporabnom vrijednosti, ali u Hrvatskoj se uzgaja većinom radi izrade cvjetnih aranžmana koji se postavljaju na grobna mjesta.



Slika 18. Krizantema (*Chrysanthemum* ssp. L.)
(Izvor: sieberz.cz)

Krizantema se, uglavnom, tretira mutagenim sredstvima u svrhu dobivanja novih kultivara. Takva mutagena sredstva su, često, štetna za okoliš i oplemenjivače, te mogu izazvati neželjene promjene koje umanjuju ekonomsku vrijednost biljke (Miller i sur., 2014). Iz toga razloga, somaklonska varijabilnost predstavlja alternativni način dobivanja novih kultivara.

Vrijeme cvatnje: Kraj listopada (Brickell, 2008).

Morfološka svojstva:

Krizanteme pripadaju rodu jednogodišnjih biljaka, trajnica i polugrmova koje se uzgajaju radi njenih cvjetnih glavica raznih boja i oblika (slika 19) (Brickell, 2008). Listovi su duboko režnjeviti ili urezani, perastog, jajolikog ili kopljastog oblika (Brickell, 2008). Cvat krizantema je tipičan za porodicu glavočika, a sastavljen je od jezičastih cvjetova s vanjske strane i cjevastih cvjetova unutar cvata (Brickell, 2008). Plod krizanteme je roška.



Slika 19. Varijabilnost boja i oblika cvata krizanteme
(Izvor: AliExpress.com)

Način razmnožavanja:

Krizantema se u komercijalnoj proizvodnji razmnožava pomoću zelenih reznica ili direktnom sjetvom na stalno mjesto u proljeće uz redovitu zaštitu i prihranu (Brickell, 2008). U novije vrijeme, krizanteme se propagiraju u kulturi biljnog tkiva.

Somaklonska varijabilnost – rezultati istraživanja:

Miller i Zalewska (2014) provode istraživanje s ciljem utvrđivanja metode regeneracije s najvećom stopom somaklonske varijabilnosti. Miller i Zalewska (2014) uzimaju 8 kultivara krizanteme i dijele ih u tri skupine: 2 skupine radio mutanata i jedna skupina originalnih kultivara. Eksplantati su uzeti u obliku listova i internodija te su mikropropagirani kao vegetacijski vrhovi. Regenerirane biljke se prebacuju u staklenike gdje se provodi morfološka analiza.

Morfološkom analizom su pronađena tri varijanta regenerirana iz lista, na kojima je uočena varijabilnost u boji cvata u odnosu na druge biljke (slika 20). Analizom pigmenta iz cvata tih somaklonova uočeno je prisustvo karotenoida koji utječu na promjenu boje latica.



Slika 20. Somaklonovi krizanteme dobiveni regeneracijom iz lista
(Izvor: Miller i Zalewska, 2014)

Molekularnim markerom RAPD utvrđena je signifikantna razlika između dobivenih somaklonova i ostalih biljaka krizantema.

Prije pokretanja postupka za priznavanje novih kultivara, dobivene somaklonove krizanteme potrebno je podvrgnuti ispitivanjima za genetsku stabilnost (Miller i Zalewska, 2014).

2.2.4. *Passiflora* ssp. L.

Porodica: Trubanjovke (*Passifloraceae*)

Hrvatski naziv: Pasiflora, Gospodinova krunica, Kristov cvijet, Kristova kruna

Porijeklo: Srednja i Južna Amerika, tropsko i subtropsko područje

Pasiflora (slika 21) je poznata pod nazivom Isusova kruna zbog oblika cvjetnog vjenčića i porijekla latinskog naziva (Herwig, 1975). Ime roda *Passiflora* potječe od lat. riječi *passio* što znači muka, a *flos* cvijet.

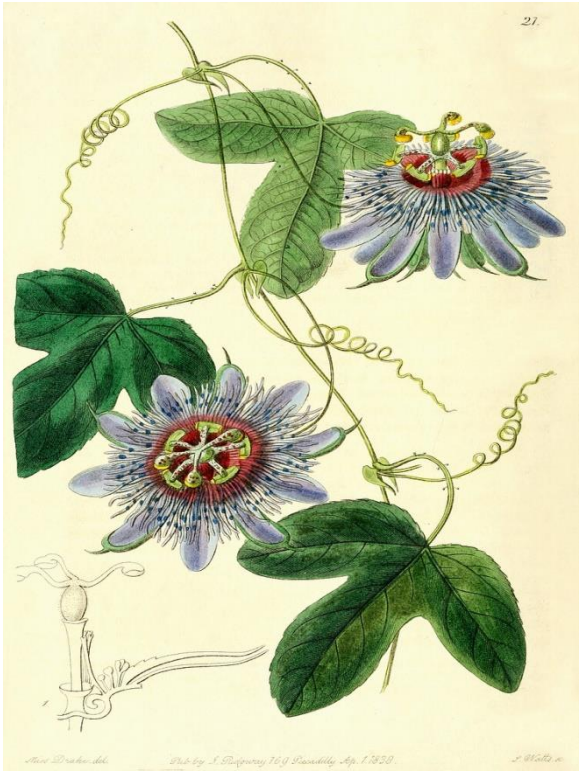


Slika 21. Kristova kruna (*Passiflora* ssp. L.)
(Izvor:https://cdn.shopify.com/)

Rod *Passiflora* obuhvaća oko 500 vrsta od kojih se većina uzgaja kao ukrasno bilje, radi jestivog ploda (*Passiflora edulus simsii*) ili radi ljekovitog djelovanja (*Passiflora incarnata*) (Braglia i sur., 2010), a *Passiflora cerula* je otrovna zbog cijanida. Ukrasna vrijednost ove vrste je u njenom cvijetu jedinstvenog izgleda koji uključuje široki spektar boja latica, vitica i složene nektarne strukture (Ulmer i sur., 2004)

Vrijeme cvatnje: Od travnja do rujna (Herwig, 1975).

Morfološka svojstva:



Slika 22. Morfološki prikaz pasiflore (Izvor: https://www.delta-intkey.com/angio/images/brns021.jpg)

Kristova kruna je rod ukrasnih zimzelenih i poluzimzelenih penjačica drvenih stabljika koje mogu narasti do 8 m pridržavajući se pomoću vitica (Brickell, 2008). Cvijet pasiflore je sastavljen od 5 latica raznih boja (bijela, ljubičasta, modra, zelenkasto-bijela i dr.) i niza resastih segmenata, bijele do intenzivno ljubičaste boje, koji tvore „krunicu“ (Brickell, 2008). U sredini cvijeta smješten je trodijelni tučak s nadraslom plodnicom i 5 peludnica(Brickell, 2008). Slika 22 prikazuje građu pasiflore. Plodovi pasiflore su mesnati, narančaste boje, jajasti do zaobljeni i jestivi, i dozrijevaju u jesen (Herwig, 1975; Brickell, 2008).

Način razmnožavanja:

Kristova kruna se razmnožava generativno sjemenom ili vegetativno zrelim reznicama u proljeće ili ljeto (Brickell, 2008), ali i u kulturi biljnog tkiva. U Italiji se Kristova kruna propagira za tržište u kulturi biljnog tkiva kojom se osigurava uniformnost genotipova (Braglia i sur., 2012).

Somaklonska varijabilnost – rezultati istraživanja:

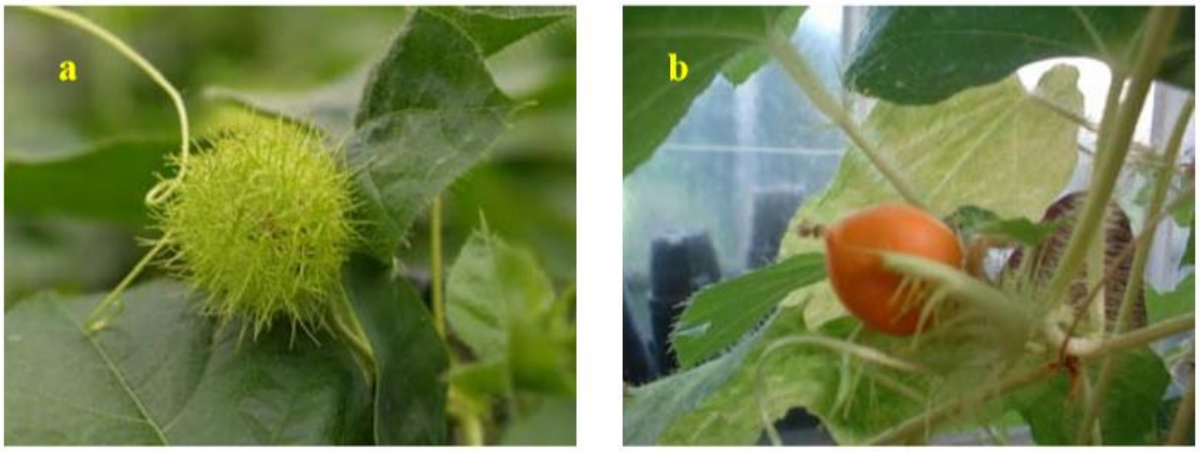
Braglia i sur. (2010) provode istraživanje koje uključuje mikropropagaciju nekoliko vrsta roda *Passiflora* (*P. hybrida, P. rifasciata, P. manta* i *P. foetida)* (slika 23) s ciljem dobivanja somaklonova koji imaju neko novo svojstvo od ekonomske važnosti.



Slika 23. Vrste roda *Passiflora* korištenih u istraživanju: a) *P.* "Guglielmo Betto"; b) *P.* "Manta"; c) *P. rifasciata*; d) *P. foetida*
(Izvor: Braglia i sur., 2010)

Regenerirane se biljke u vrijeme cvatnje analiziraju pomoću morfoloških markera. Kod Kristove krune regenerirane iz vitica nije identificirana somaklonska varijabilnost što dokazuje da se ta tehnika može koristiti za propagaciju genetski uniformnih biljaka.

Regeneracijom Kristove krune iz nezrelih cvjetova dobiveni su somaklonovi koji se razlikuju od matične biljke po veličini i obliku cvijeta i brakteja. Smanjenjem veličine brakteja povećana je vidljivost sazrijevanja plodova (slika 24) što, prema Braglia i sur. (2010), može predstavljati novo svojstvo Kristove krune.



Slika 24. Smanjenje veličine brakteja (a) i bolja vidljivost sazrijevanja ploda (b) (Izvor: Braglia i sur., 2010)

2.2.5. *Petunia x hybrida* D. Don ex W. H. Baxter

Porodica: pomoćnice (*Solanaceae*)

Hrvatski naziv: petunija, petonica

Porijeklo: Južna Amerika



Slika 25. Petunija (*Petunia x hybrida)*

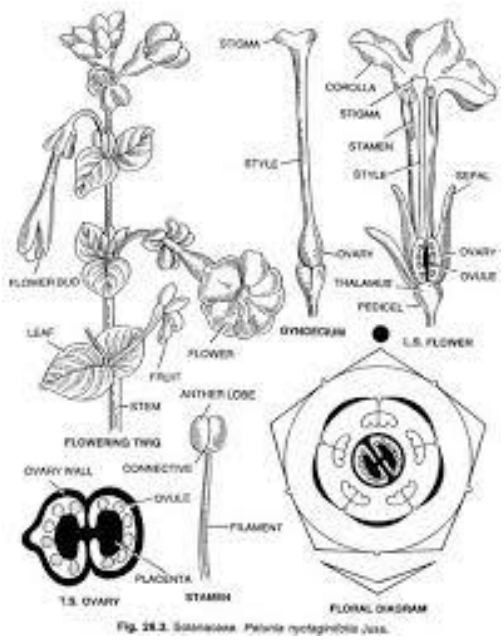
(Izvor: armstronggarden.com)

Ekonomska vrijednost petunije (*Petunia hybrida* D. Don ex W. H. Baxter) (Slika 25) je široki spektar boja cvjetova dugog perioda cvatnje i u dekorativnosti listova (Christopher, 1994). Petunija se uzgaja kao lončanica na prozorima i balkonima ili na cvjetnim gredicama.

Vrijeme cvatnje: Od travanja do listopada (Herwig, 1975).

Morfološka svojstva:

Rod *Petunia* obuhvaća jednogodišnje i višegodišnje zeljaste trajnice lijepih i *živopisnih* cvjetova (Brickell, 2008). Petunije (slika 26) su razgranate grmolike vrste veličine od 15 do 30 cm i širine 30 cm. Listovi ove ukrasne vrste su cjeloviti, jajolikog oblika dugi 5 do 12 cm i umjereno do intenzivno zelene boje (Brickell, 2008). Cvjetovi petunije su trubastog oblika, jednostruki ili dvostruki, širokog spektra boja: od bijelih, crvenih do plavih i ljubičastih tonova. Neki kultivari imaju tamne žilice, središnje bijele zvijezde, grla istaknutih boja ili obojene rubove latica (Brickell, 2008).



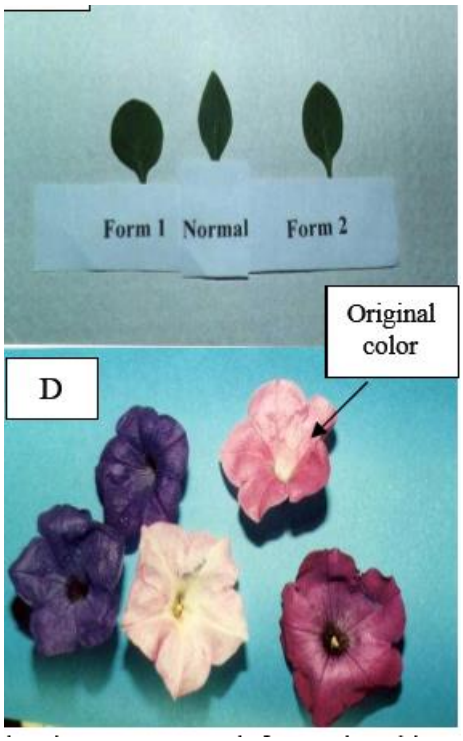
Slika 26. Morfološki prikaz petunije (Izvor: https://encrypted-tbn0.gstatic.com/)

Način razmnožavanja:

Petunija se uglavnom razmnožava generativno, sjemenom. Sjetva se odvija u veljači ili ožujku. Neke vrste petunije moguće je razmnožavati vegetativno, reznicama u jesen (Brickell, 2008).

Somaklonska varijabilnost – rezultati istraživanja:

Kao alternativni način dobivanja petunija novih odlika korištena je somaklonska varijabilnost (Abu-Qaoud i sur., 2010). S ciljem dobivanja somaklonova, Abu-Qaoud i sur. (2010) uzeli su listove petunije kao eksplantate i postavili ih na medij s hormonom rasta BAP (6-benzilaminopurin) koncentracije 2 mg/l. Regenerirani izdanci su supkultivirani na medij s hormonom IBA (indol-3-octena kiselina), potom su stavljeni na medij za ukorjenjavanje i premješteni u staklenike. Morfološkom identifikacijom utvrđeno je da od 60 biljaka petunije, 11 biljaka ima zaobljene listove, a kod 13 biljaka uočena je varijabilnost u boji cvijeta (slika 27). Dvije biljke imaju ljubičastu boju cvjetova, 8 ima tamno ružičastu, a 3 cvijeta imaju svjetlo ljubičastu boju.



Slika 27. Morfološke promjene kod somaklonova petunije (Izvor: https://encrypted-tbn0.gstatic.com/)

Prema Abu-Qaoud i sur. (2010), dobiveni rezultati mogu biti korisni u daljnjim istraživanjima i u postupku utvrđivanja genetske stabilnosti svojstva kod somaklonova petunije.

2.2.6. *Phalaenopsis* ssp. Bulme

Porodica: Orhideja (*Orchidaceae*)

Hrvatski naziv: Noćnoleptirna orhideja

Porijeklo: Od umjerenih područja do subtropske i tropske klime (Squire, 2008).



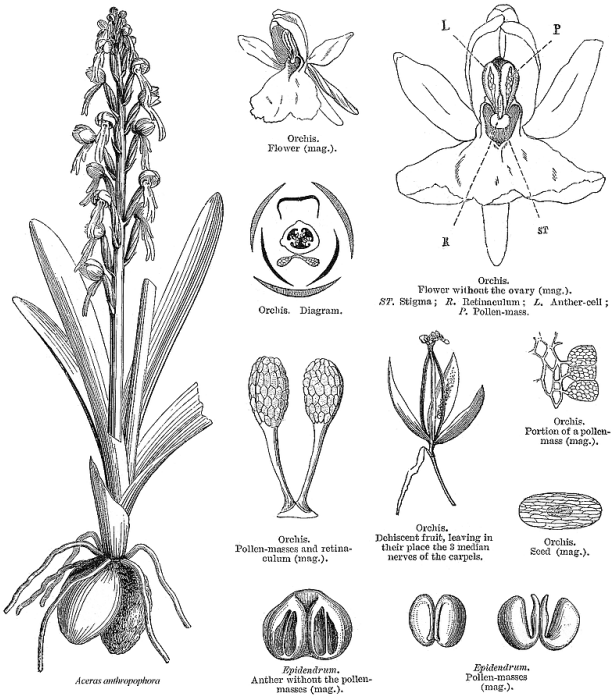
Slika 28. Noćnoleptirna orhideja (*Phalaenopsis* ssp. Bulme) (Izvor: https://urbanjungledc.com/)

Porodica orhideja je jedna od najbrojnijih biljnih porodica u svijetu (Squire, 2008). Porodica obuhvaća 750 rodova, 17 500 vrsta i još više hibrida koji se uzgajaju radi bujnosti i lakše njege (Brickell, 2008). Osnovna podjela orhideja je na epifitske orhideje, koje rastu na granama drveća, u procjepima, stijenama i rukavcima, i na terističke orhideje, koje rastu u zemlji, ali imaju manje ugledne cvjetove od epifitskih (Brickell, 2008). Orhideje su veoma popularno ukrasno bilje koje ima veliko tržište. Primjerice, u SAD-u se industrija orhideja procijenjuje na 126 milijuna $ (Griesbach, 2002). *Phalaenospsis* (slika 28), rod koji ima dugi period cvatnje, lako se uzgaja i ima prihvatljivu cijenu, najviše se proizvodi u SAD-u (50 - 90% od ukupne proizvodnje orhideja) (Chang i Veilleux, 2009). Iako je *Phalaenopsis* najznačajniji rod u florikulturnoj industriji, ima najmanji broj razvijenih hibrida, što govori da se nije iskoristio puni genetički potencijal ovoga roda (Chang i Veilleux, 2009).

Vrijeme cvatnje: Tijekom čitave godine (Squire, 2008).

Morfologija:

Osnovna građa (slika 29) cvijeta orhideja se ne razlikuje između rodova orhideja. Varira samo u veličini cvijeta i bojom. Cvijet orhideja se sastoji od 3 latice i 3 lapa različitih boja. Lapovi su kod većine drugih biljnih vrsta zelene boje i čvrsti, a kod orhideja su obojeni što čini cvijet puno većim (Squire, 2008). Dvije gornje latice su jednake veličine i oblika, a donja latica je u obliku usne i služi kao „sletna" platforma za oprašivače. Donja latica, bojom i mirisom, oponaša kukca da ga privuče (Squire, 2008). Cvjetovi roda *Phalaenopsis* su zaobljeni i plosnati, promjera 50 cm (Squire, 2008). Miris cvjetova orhideja varira ovisno o vrsti oprašivača: od slatkog do izrazito neugodnog mirisa (Squire, 2008).



Slika 29. Morfološki prikaz orhideje (Izvor: https://www.delta-intkey.com/angio/images/orchi769.gif)

Većina ukrasnih orhideja su epifiti. Epifitske orhideje imaju uočljivije cvjetove od terističkihh zbog čega se češće uzgajaju (Brickell, 2008). Biljni organi se razvijaju iz pseudolukovice. Prihvatno korijenje je debelo i kroz njega crpi hranu (Squire, 2008), a pomoću adventivnog korijenja prikuplja vlagu (Brickell, 2008). Većina terističkih orhideja imaju samo korijen ili gomolj preko kojega se hrane. Mali broj ima pseudolukovice (Brickell, 2008).

Način razmnožavanja:

Orhideje u prirodi proizvode malo sjemena koje ima veoma mali postotak klijavosti zbog čega se razmnožavaju vegetativnim putem, a u novije vrijeme, u kulturi biljnog tkiva. Epifitske orhideje se razmnožavaju pomoću bezlisnih pseudolukovica (*Ada, x Aliceara, Anguloa, Coelogyne, Encyclia* i dr.) (Brickell, 2008). Orhideje koje nemaju pseudolukovice, mlade izdanke stvaraju u osnovi. Takve vrste se razmnožavaju pomoću izdanaka u proljeće (*Disa, Paphiodedilum, Pharagmipedium*, i dr.) (Brickell, 2008). Rod *Phalaenopsis* se razmnožava stabljičnim reznicama nakon završetka cvatnje (Brickell, 2008). Terističke orhideje se razmnožavaju dijeljenjem gomolja u proljeće ili jesen (*Cypridedium, Serapias, Orchis*, i dr.) (Brickell, 2008).

Somaklonska varijabilnost – rezultati istraživanja:

Phalaenopsis je rod ukrasnih vrsta koja pripada porodici orhideja. Ovaj rod ima veliki ekonomski značaj zbog dugog perioda cvatnje i uočljivih cvjetova širokog spektra boja. Komercijalna proizvodnja ovog roda orhideja ima pozitivan učinak na ekonomiju brojnih zemalja JI Azije (Hew, 1994; Laws, 1995). Mikropropagacija se uvodi u proizvodnju orhideja radi masovne potražnje tržišta (Lee i sur., 2015). Najveći nedostatak mikropropagacije je pojava somaklonske varijabilnosti koja iznosi 10% kod vrsta roda *Phalaenopsis* (Tokuhara i Mii, 1998).

Lee i sur. (2015) provode istraživanje sa ciljem identifikacije faktora koji utječu na pojavu somaklonske varijabilnosti i narušavaju uniformnost genotipa. Biljni materijal vrsta roda *Phalaenopsis* podijeljen je u tri skupine: biljke normalnih morfoloških karakteristika (SD-N) i dvije skupine somaklonova (SD-V1 i SD-V2) na kojima je provedena morfološka, citološka i molekularna analiza.

Morfološkom analizom varijanata roda *Phalaenopsis* utvrđena je signifikantna razlika između sve tri skupine uzoraka (slika 30). Biljke se međusobno razlikuju u promjeru cvijeta i veličini biljnih organa. Somaklonovi su veći od normalnih biljaka.



Slika 30. Varijabilnost cvjetnih organa između biljaka skupina SD-N, SD-V1 i SD-V2 (Izvor: https://media.springernature.com/)

Citološka analiza je provedena je protočnom citometrijom kojom je utvrđeno da su epidermalne stanice somaklonova SD-V1 i SD-V2 signifikantno veće u usporedbi s biljkama skupine SD-N. Promjena u veličini stanica vidljiva je i u morfološkim svojstvima. Dakle, citološka analiza potvrđuje da je varijabilnost u morfološkim svojstvima somaklonova roda *Phalaenopsis* rezultat promjene veličine stanica. Obje skupine biljaka imaju identičan stupanj ploidije.

Lee i sur. (2015) proučavaju ekspresiju gena HPY2 i MADS4 korištenjem *Real time* PCR-a. HPY2 gen je povezan s endoreplikacijom i mitozom (Cookson i sur., 2006), a gen ADS4 je povezan s razvojem latica ABC modela cvijeta (Lee i sur., 2015). Analiza pokazuje da je ekspresija gena HPY2 najviša u cvjetovima skupine SD-V1, a kod listova nije bilo signifikantne razlike u ekspresiji istoimenog gena između skupina. Ekspresija gena MADS4 utječe na modifikaciju morfoloških karakteristika cvjetova somaklonova vrste roda *Phalaenopsis*.

Rezultatima ovoga istraživanja, autori daju pregled osnovnih podataka važnih u postupcima mikropropagacije biljaka kultivara *Phalaenopsis* ‘Spring Dancer’ i očuvanju genetske uniformnosti mikropropagiranih biljaka (Lee i sur., 2015).

2.2.7. *Rhododendron simsii* Planch.

Porodica: Vrjesolike (*Ericaceae*)

Hrvatski naziv: azaleja, indijska azaleja, sobni rododendron

Porijeklo: Istočna Azija



Slika 31. Azaleja (*Rhododendron simsii* Planch.)
(Izvor: http://plantsrescue.com/wp-content/uploads/2013/10/Rhododendron-simsii.jpg)

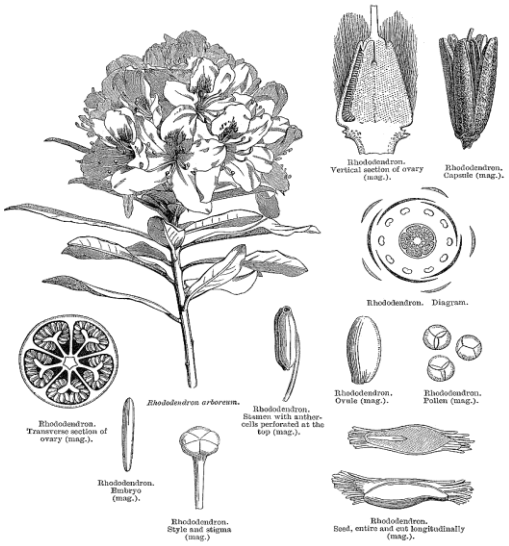
Rod Rhododendron obuhvaća veliki broj poluzimzelenih i zimzelenih grmova raznih veličina: od patuljastog do grma visine drveta (Herwig, 1975). Sve vrste ovoga roda su otrovne i djeluju paralitički na živčani sustav (Forenbacher, 1998). *Rhododendron simsii* (slika 31) je vrsta patuljastog rasta koja se uzgaja kao lončanica zbog svojih lijepih cvjetova.

Vrijeme cvatnje: Krajem proljeća (Herwig, 1975).

Morfologija:

Stabljika je drvenasta i razgranata, a listovi ove vrste azaleje (*Rhododendron simsii* Planch.) su ovalnog, izduženo ovalnog ili eliptičnog oblika, veličine nekoliko centimetara (Brickell, 2008).

Bujni cvjetovi su skupljeni u cvatove, od bijele, žute do ljubičaste i crvene boje. Cvijet može biti jednostruki, dvostruki ili višestruki (Brickell, 2008). Rub latica je valovit. Slika 32 prikazuje morfološka svojstva ove biljne vrste. *Rhododendron simsii* ponekad razvija poseban tip pupoljaka koji se nazivaju mutirani cvjetni pupovi (eng. *bud sport).* Mutirani cvjetni pup je dio biljke iz kojega se razvijaju biljni organi varijabilnih morfoloških svojstava, kao što je varijabilnost u boji i obliku cvijeta. Posljedica toga fenomena je promjena ekspresije gena u somatskim stanicama (de Shepper i sur., 2003).



Slika 32. Morfološki prikaz azaleje (Izvor: https://www.delta-intkey.com/angio/)

Način razmnožavanja:

Indijska azaleja se razmnožava pomoću korijenovih reznica u jesen ili u ranu zimu. Reznice se najprije moče u vodi, a zatim presađuju u tlo (Brickell, 2008).

Somaklonska varijabilnost – rezultati istraživanja:

Azaleja (*Rhododendron simsii* Planch.) pripada rodu *Rhododendron* unutar kojega nema *interspecies* križanja što uvelike smanjuje genetsku varijabilnost i otežava oplemenjivanje te vrste. De Shepper (2001) navodi da je mutirani cvjetni pup fenomen koji predstavlja izvor genetske varijabilnosti kod azaleje i da je više od polovice kultivara ove vrste dobiveno od mutiranih cvjetnih pupova. Ovisno o obojenosti latica, mutirani cvjetni pupovi se javljaju u nekoliko oblika (slika 33): normalna boja latica, išarane (eng. *flecked*), *picotee* latice, kombinacija *picotee* i išaranih latica i djelomično *picotee* latice *(*De Shepper, 2001; De Shepper i sur., 2001a).



Slika 33. Somaklonovi azaleje (*Rhododendron simsii* Planch.)
(Izvor: De Shepper i sur., 2003)

Mutacija cvjetnih pupova je česta pojava kod indijske azaleje koja se intenzivno razmnožava ili supkultivira u većem broju ciklusa. Iz tog razloga ta se pojava smatra somaklonskom varijabilnosti (De Shepper i sur., 2003). Identifikacija mehanizma, porijekla i načina nasljeđivanja ovoga svojstva važna je u oplemenjivačkim programima. De Shepper i sur., 2003. navode da su uzroci mutacije cvjetnih pupova indijske azaleje višestruki i u međusobnoj interakciji te ih se većina nasljeđuje isključivo vegetativnim putem. Iznimka su pupovi koji ovise o prisutnosti ili odsutnosti antocijana. Takvi mutirani cvjetni pupovi imaju išarane ili bijele latice.

Pojava nenasljednog svojstva boje mutiranih cvjetnih pupova je rezultat varijabilnosti u ekspresiji gena (epigenetske promjene) i genetskih promjena.

De Shepper i sur. (2001c) analiziraju list *Picotee* mutiranih cvjetnih pupova skupine „Hellmut Vogel" koristeći protočnu citometriju. Utvrđeno je da je „Hellmut Vogel" diploidni organizam što ne objašnjava različitu obojenost latica (De Shepper i sur., 2001c). U sljedećem koraku autori zasebno analiziraju rub i unutrašnjost latice. Rezultati pokazuju da je rub latice tetraploid, a ostatak latice je diploid, što znači da se radi o kimeri. Ovi podaci se odnose samo na latice šire od 7mm (De Shepper i sur., 2003).

De Schepper (2001) je proveo istraživanje s ciljem identifikacije utjecaja DNA metilacije na pojavu različitih mutiranih cvjetnih pupova indijske azaleje „Hellmut Vogel". Analizom lista regenerirane biljke utvrđena je prisutnost hipometilacije (kod 4 od 18 biljaka) i hipermetilacije. Dakle, metodom Sssl-MAA dokazuje se da je mutirani cvjetni pup „Hellmut Vogel" azaleje polimorfan u metilirajućem obliku što je posljedica mejotičke nestabilnosti pupova (De Schepper, 2001). Za utvrđivanje povezanosti fenotipova mutiranih cvjetnih pupova i DNA metilacije potrebno je provesti analizu specifičnog mjesta DNA metilacije na određenoj sekvenci (npr. gen za flavonoide) (De Shepper i sur., 2003).

Tipove mutiranih cvjetnih pupova indijske azaleje nemoguće je točno klasificirati zbog višestrukih uzroka mutacija. Stoga su, De Schepper i sur. (2003) napravili popis epigenetskih i genetskih promjena koje utječu na pojavu mutacije cvjetnih pupova koji imaju važnu ulogu u opisivanju interakcije epigenetskih i genetskih promjena.

2.2.8. *Saintpaulia ionatha* H.Wendl

Porodica: Gesnerijevke (*Gesneriaceae*)

Hrvatski naziv: Afrička ljubica, afrička ljubičica, usambara ljubica

Porijeklo: Šumovita dijelovi u planinama Usambara, Istočna Afrika (Herwig, 1975).



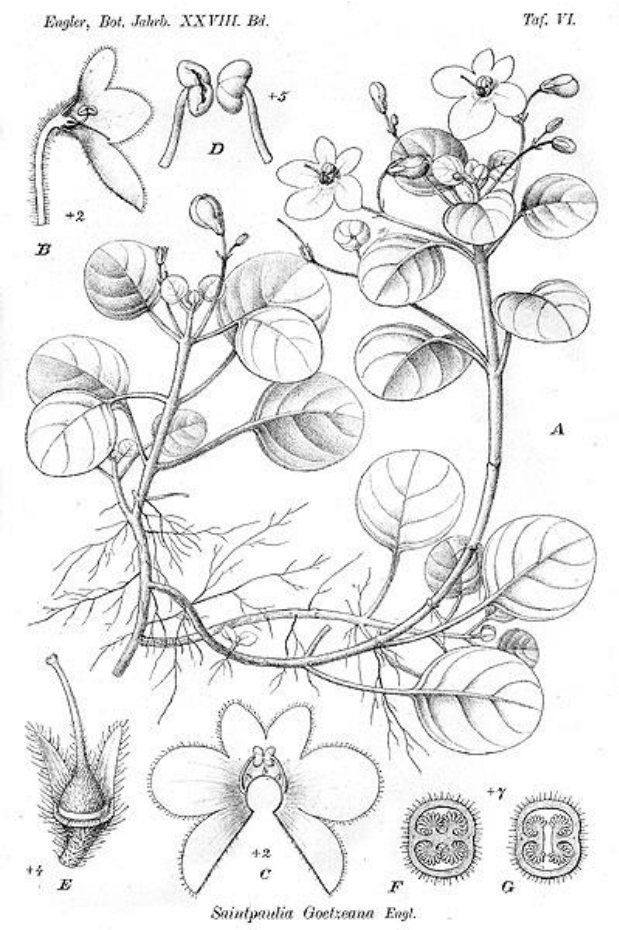
Slika 34. Afrička ljubičica (*Saintpaulia ionantha* H.Wendl)
(Izvor: https://d6p0gevo8s9lm.cloudfront.net/)

Afrička ljubičica (*Saintpaulia ionantha* H.Wendl) (slika 34) je ukrasna biljna vrsta širokog raspona boja latica i oblika za koju je karakteristična cvatnja tijekom cijele godine. Ova ukrasna vrsta voli vlažna i svjetla mjesta zbog čega se uzgaja na cvjetnim gredicama i kao lončanica (Herwig, 1975). Rod *Saintpaulia* dobio je naziv prema njemačkom znanstveniku W. Saint Paulu koji ga je otkrio i introducirao u Europu. Ovaj rod ima oko 2000 kultivara koji su dobiveni klasičnim križanjima ili primjenom mutagenih sredstava (Brickell, 2008).

Vrijeme cvatnje: Tijekom cijele godine (Herwig, 1975; Brickell, 2008).

Morfološka svojstva:

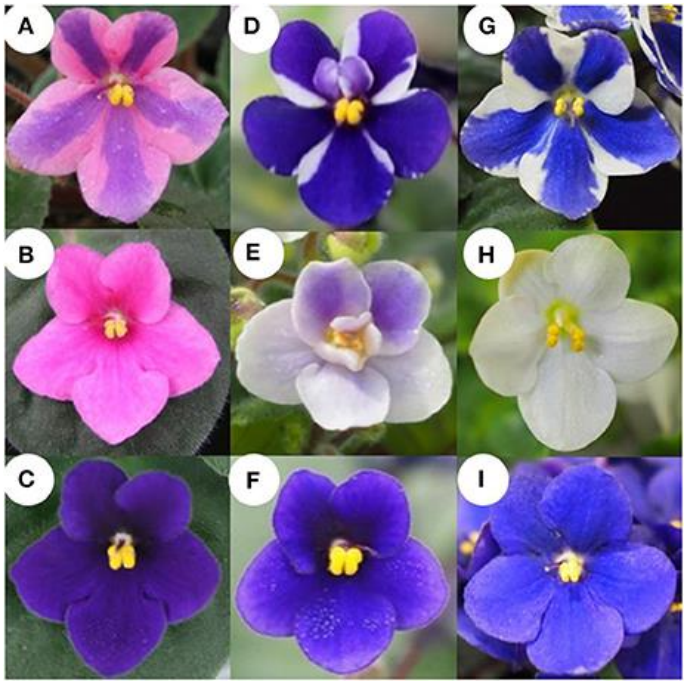
Afrička ljubičica (*Saintpaulia ionatha* H.Wendl) (slika 35) je niska zeljasta trajnica koja raste u obliku rozete (Herwig, 1975; Brickell, 2008). Kultivari ove vrste podijeljeni su u pet skupina ovisno o veličini lisne rozete: mikro-minijaturni (< 8 cm), minijaturni (8 – 16 cm), poluminijaturni (16 – 21 cm), standardni (21 – 40 cm) i veliki (> 40 cm) (Brickell, 2008). Listovi afričke ljubice su jajolikog ili ovalnog oblika, mesnati i tamnozelene boje, a mogu biti i prošarani ili zamrljani bijeloružičastom ili žutobijelom bojom (Herwig, 1975). Plojka lista je prekrivena vertikalnim dlačicama . Vrsta *S. confusae* ima duguljaste listove prekrivene visećim dlačicama , neujednačene duljine (Herwig, 1975). U pazušcima listova razvijaju se grozdasti cvatovi sastavljeni od jednostrukih ili dvostrukih cvjetova, namreškanog ili valovitog ruba i širokog spektra boja (Brickell, 2008). Plod kod vrste *S. confusae* je duguljast, a kod vrste *S. ionantha* je kuglastog oblika. Boja ploda je žuta ili narančasta (Brickell, 2008).



Slika 35. Morfološki prikaz afričke ljubičice (Izvor:http://www.genera-gesneriaceae.at/)

Somaklonska varijabilnost – rezultati istraživanja

Za utvrđivanje učestalosti mutiranih stanica afričke ljubičice (*Saintpaulia* sp.) regenerirane tehnikom kulture biljnog tkiva, Sato i sur. (2011) koriste *Real time* PCR. Transpozon VGs1:hAT ima važnu ulogu u ekspresiji boja latica afričke ljubičice i izaziva pojavu plavih i ružičastih stanica (Sato i sur., 2011). Na temelju tih podataka, *real time* PCR se koristi u svrhu otkrivanja plavih stanica i u svrhu utvrđivanja učestalosti mutiranih stanica. *In vitro* regeneracijom afričke ljubičice, dobiveni su genetski uniformne biljke, somaklonovi plavih latica i somaklonovi promijenjene išaranosti latica (Slika 36).



Slika 36. Varijabilnost u boji latica nakon *in vitro* regeneracije afričke ljubičice (Izvor: https://www.frontiersin.org/)

Za analizu su uzimani samo somaklonovi plavih latica. Učestalost tih somaklonova iznosila je 40%. *Real time* PCR-om utvrđeno je da je učestalost plavih stanica bila 2.4 - 4.6% manja prije *in vitro* regeneracije. Sato i sur. (2011) zaključuju da plave stanice izazivaju pojavu somaklonske varijabilnosti kod afričke ljubičice.

2.2.9. *Syngonium podophyllum* Schott

Porodica: Kozlačevke (*Araceae)*

Hrvatski naziv: singonij, afrički kozlac

Porijeklo: Središnja i Južna Amerika

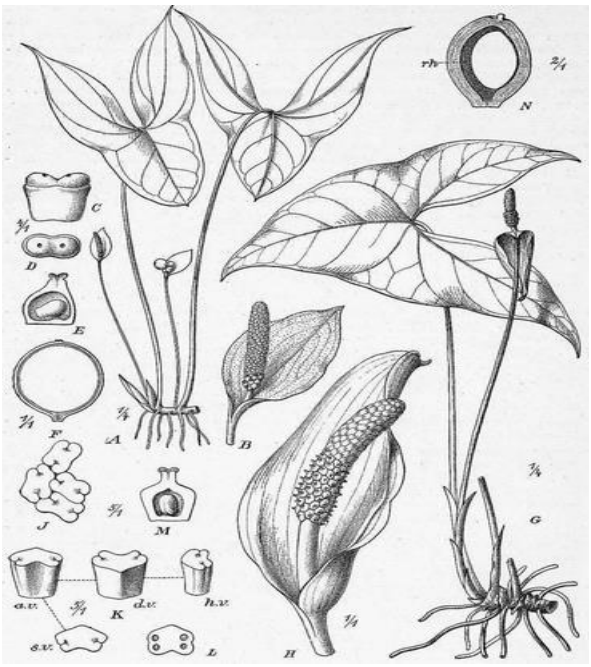


Slika 37. Singonij (*Syngonium podophyllum* Schott)
(Izvor: https://farm3.staticflickr.com/)

Singonij (*Syngonium podophyllum* Schott) (slika 37) obuhvaća 33 epifitske i semiepifitske, puzajuće ili penjajuće vrste koje obitavaju na humidnim područjima Centralne i Južne Amerike (Croat, 1982). Singonij je otrovna vrsta koja, u svim svojim organima, sadži oksalnu kiselinu nadražujućeg djelovanja.

Morfološka svojstva:

Singonij je zimzelena penjačica ili puzačica duge stabljike. Na dugim peteljkama su smješteni naizmjenični listovi duge lisne plojke. Mladi listovi afričkog kozlaca su jednostavne građe i ušiljenog vrha (Chen i sur., 2005). Lisna plojka mladih listova je šarolika, u čemu se nalazi ukrasna vrijednost singonija (Henry i Chen, 2003). Zreli listovi singonija su sastavljeni od eliptičnih listića i jednolike su boje (Chen i sur., 2005). Cvjetovi su tipične građe za porodicu kozlaca, a plod je boba (Šiber, 2018). Slika 38. prikazuje morfološku građu afričkog kozlaca.



Slika 38. Morfološki prikaz singonija (*Syngonium podophyllum* Schott) (Izvor:sv.wikipedia.org)

Način razmnožavanja:

Afrički kozlac ili singonij se razmnožava vegetativno, pomoću lisnih reznica. Kako lisne reznice prenose razne bolesti, od 1980. godine, singonij se razmnožava u kulturi biljnog tkiva koja je pridonijela pojavi somaklonske varijabilnosti (Chen i sur., 2005).

Somaklonska varijabilnost – rezultati istraživanja:

Pojava somaklonske varijabilnosti u kulturi biljnog tkiva singonija rezultirala je u identifikaciji 19 somaklonova koji su, naknadno, priznati kao kultivari (Chen i sur., 2005). Chen i sur. (2005) su na 19 kultivara singonija utvrdili da postoji signifikantna razlika između njih i srodnih kultivara koristeći AFLP markere i 12 setova početnica.

AFLP analizom utvrdili su razliku između 7 od 15 kultivara iz „White Butterfly" skupine i 3 od 6 unutar „Regina Red Allusion" skupine. Pomoću Jaccardovog koeficijenta, prikazan je koeficijent sličnosti unutar analiziranih skupina biljaka (tablica 4).

Tablica 4. Jaccardov koeficijent sličnosti između grupa „White Butterfly", „Regina Red Allusion", drugih vrsta singonija (*Syngonium*) i kontrolne grupe kozlaca (Chen i sur., 2005)

	„White Butterfly"	**„Regina Red Allusion"**	***Syngonium***	**Kontrolna grupa**
„White Butterfly"	0.98	-	-	-
„Regina Red Allusion"	0.72	0.99	-	-
Syngonium	0.28	0.27	0.21	-
Kontrolna grupa	0.03	0.04	0.03	0.08

Prema dobivenom koeficijentu sličnosti, Chan i sur. (2005) zaključuju da je potrebno povećati genetsku raznolikost unutar grupe radi sprječavanja širenja bolesti i štetnika.

2.2.10. *Torenia fournieri* Lind.

Porodica: Ljuborovke *(Linderniaceae)*

Hrvatski naziv: Torenija

Porijeklo: Azija



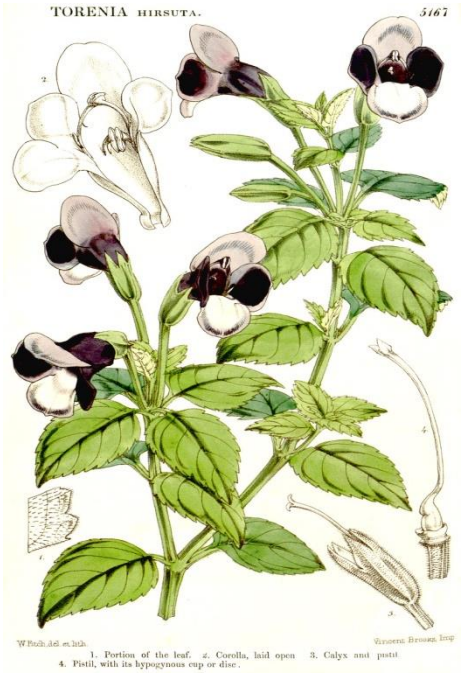
Slika 39. Torenija (*Torenia fournieri* Lind.)
(Izvor: knowledgebase.lookseek.com)

Torenija (*Torenia fournieri* Lind.) (slika 39) je jedna od najpoznatijih komercijalnih ukrasnih vrsta koja se uzgaja kao ločanica ili na cvjetnim gredicama. Njena ekonomska vrijednost je u cvjetovima raznih tonova boja (Nhut i sur., 2010)

Vrijeme cvatnje: Od srpnja do rujna (Herwig, 1975).

Morfološka svojstva:

Torenija (*Torenia fournieri* Lind.) je jednogodišnja zeljasta biljna vrsta uspravne i razgranate stabljike, visine do 30 cm (Brickell, 2008). Mali nasuprotni listovi, jajolikog oblika, nazubljena ruba i zelene boje, nalaze se na kratkim peteljkama (Herwig, 1975). Cvat torenije je grozd smješten na vrhu stabljike. Cvjetni vijenac se sastoji od 3 donje latice, išarane ljubičastim mrljama, 2 gornje latice i išaranog ždrijela (Herwig, 1975). Cvjetovi mogu biti raznih tonova bijele, žute, ljubičaste i plave boje (Nhut i sur., 2013) (slika 40).



Slika 40. Morfološki prikaz torenije
(Izvor: https://www.delta-intkey.com)

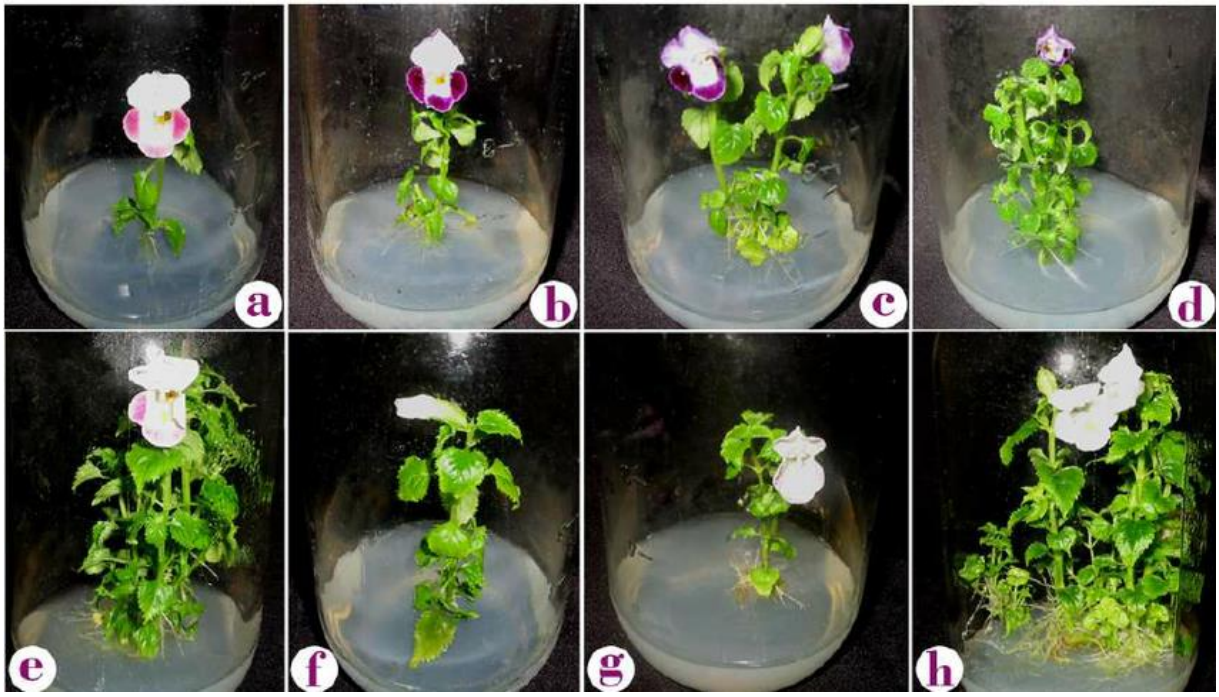
Način razmnožavanja:

Torenija se razmnožava sjemenom u ožuljku (Herwig, 1975).

Somaklonska varijabilnost – rezultati istraživanja:

Potražnja tržišta za novim kultivarima inovativnih morfoloških svojstva konstantno raste, stoga je potrebno dizajnirati metodu za njihovo dobivanje. Nhut i sur. (2013) predlažu somaklonsku varijabilnost kao izvor varijabilnosti u boji cvijeta torenije i objavljuju protokol za induciranje somaklonske varijabilnosti za promjenu boje cvijeta. Kao izvor eksplantata korištena je torenija modroljubičastih cvjetova koji su postavljeni na 3 različita hranidbena medija: M1 s polovičnom koncentracijom organskih aditiva, mikro i makro elemenata i punom koncentracijom Fe; M2 s koncentracijom mikro i makro elemenata i punom koncentracijom organskih aditiva i Fe te M3 s polovičnom koncentracijom Fe, mikro i makro elemenata i punom koncentracijom organskih aditiva. Puna koncentracija mikro i makro elemenata inhibira *in vitro* cvatnju zbog čega se koristi polovična koncentracija.

Nakon 8 – 10 tjedana u kulturi biljnog tkiva (slika 41), kada su biljke procvale, promatrana su njihova morfološka svojstva i uzeti uzorci za protočnu citometriju. Protočnom citometrijom se utvrđuje stupanj ploidije kod dobivenih somaklonova. Na M3 mediju se uspješno razvijaju somaklonovi bijelih i ljubičastih linija. Protočnom citometrijom je utvrđeno da nema signifikantne razlike u ploidiji između modroljubičastih i bijelih linija. Nove linije torenije su genetski stabilne što dokazuje da se ovaj protokol može upotrijebiti u dobivanju novih kultivara torenije (Nhut i sur. 2013).



Slika 41. Varijabilnost u boji cvijeta somaklonova torenije: a), b), f), g), h) na M3 mediju, b) i c) na MS i M1, d) na M2 mediju
(Izvor: https://www.researchgate.net/)

3. Zaključak

Ukrasno bilje je jedna od najznačajnijih skupina biljnih vrsta zbog svoje izrazite ekonomske i estetske vrijednosti. Napredak na području biotehnologije donio je mogućnost proizvodnje velikog broja uniformnih biljaka u relativno kratkom vremenskom razdoblju pomoću kulture biljnog tkiva. Međutim, kultura biljnog tkiva je stresna metoda propagacije za biljku što izaziva pojavu varijabilnosti kod regeneriranih biljaka. Takva varijabilnost se naziva somaklonska varijabilnost.

Somaklonska varijabilnost može biti spontana ili inducirana, nasljedna (genetska) ili nenasljedna (epigenetska), poželjna ili nepoželjna pojava i porebno ju je identificirati. Za identifikaciju somaklonske varijabilnosti koriste se brojne metode: morfološke, biokemijske, citološke i molekularne metode. Ovaj fenomen je nepoželjan u slučaju kada je cilj dobivanja genetski uniformnih regeneranata i može izazvati velike gubitke u komercijalnoj proizvodnji. Ukoliko se somaklonska varijabilnost pojavi u obliku svojstva od interesa, može poslužiti kao alternativni alat u oplemenjivačkim programima i za proširenje genetske varijabilnosti.

Metodama identifikacije somaklonske varijabilnosti kod *in vitro* regeneriranih ukrasnih vrsta pronađena su brojna svojstva koja mogu biti od ekonomske važnosti u komercijalnoj proizvodnji: varijabilnost u boji pricvjetnog lista i spate kod anturija (*Anthurium* ssp. Schott), ružičasti list, ljubičaste pjege i deblja lisna plojka kod kaladija (*Caladium* ssp. Vent), povećana vidljivost ploda kod Kristove krune (*Passiflora* ssp. L.), povećanje cvjetnih organa kod orhideje roda *Phalaenopsis*, promjena boje cvjetova kod krizanteme (C*hrysanthemum* ssp. L.) te promjena boje i oblika listova singonija (*Syngonium podophyllum* Schott). Prije pokretanja postupaka za priznavanje novih kultivara navedenih biljnih vrsta, potrebno je utvrditi genetsku stabilnost dobivenih svojstava. Kod nekih ukrasnih vrsta, kao što su indijska azaleja (*Rhododendron simsii* Planch.), torenija (*Torenia fournieri* Lind.) i afrička ljubičica (*Saintpaulia ionantha* H.Wendl), nisu pronađena nova svojstva od interesa, ali je napravljen pregled mehanizama somaklonske varijabilnosti i predložene su metode za induciranje varijabilnosti kod *in vitro* regeneriranih biljaka.

U današnje vrijeme je priznat veliki broj somaklonova ukrasnog bilja kao kultivari koji su uvedeni u komercijalnu proizvodnju, ali potražnja za novim kultivarima neprestano raste. U ovom radu dan je pregled dosadašnjih istraživanja vezanih za utvrđivanje somaklonske varijabilnosti koji mogu poslužiti za dobivanje novih kultivara ukrasnog bilja.

4. Popis literature

1. Abu-Qaoud, H., Abu-Rayya, A., & Yaish, S. (2010). *In vitro* regeneration and somaclonal variation of Petunia hybrida. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, *18*(1), 71-81.
2. Adir N., Zer H., Shochat S., Ohad I. (2003). Photoinhibition—a historical perspective. Photosynth Res 76: 343–370.
3. Ahloowalia B.S. (1992). *In vitro* radiation induced mutants in Chrysanthemum. Mutat Breed Newsl 39:6.
4. Ahmed E., Hayashi T., Zhu Y., Hosokawa M., Yazawa S. (2002). Lower incidence of variants in Caladium bicolor Ait. plants propagated by culture of explants from younger tissue. Sci Hortic-Amst 96: 187–194.
5. Bairu M. W., Aremu A. O., Van Staden J. (2011). Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. Plant Growth Regulation, 63(2): 147-173.
6. Bennici A., Anzidei M., Vendramin GG. (2004). Genetic stability and uniformity of Foeniculum vulgare Mill. regenerated plants through organogenesis and somatic embryogenesis. Plant Sci 166: 221–227.
7. Braglia, L., De Benedetti, L., Giovannini, A., Nicoletti, F., Bianchini, C., Pipino, L., Mercuri, A. (2009). *In vitro* plant regeneration as a tool to improve ornamental characters in Passiflora species. In *XXIII International EUCARPIA Symposium, Section Ornamentals, Colourful Breeding and Genetics-Part II 855*: 47-52. <https://www.actahort.org/books/855/855_5.htm>
8. Brettell R. I. S., Dennis E. S. (1991). Reactivation of a silent Ac following tissue culture is associated with heritable alterations in its methylation pattern. Mol Gen Genet 229: 365–372.
9. Brickell, C. (2008). Cvijeće i ukrasno bilje - velika ilustrirana enciklipedija. Mozaik knjiga, Zagreb
10. Bryant J. A. (1976.) The cell cycle. In: Bryant JA (ed) Molecular aspect of gene expression in plants. Academic Press, New York. 117–216.
11. Cao Z., Sui S., Cai X., Yang Q., Deng Z. (2016). Somaclonal variation in 'Red Flash'caladium: morphological, cytological and molecular characterization. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 126(2): 269-279.

12. Chang, Y. K., Veilleux, R. E., Iqbal, M. J. (2009). Analysis of genetic variability among Phalaenopsis species and hybrids using amplified fragment length polymorphism. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *134*(1): 58-66.
13. Chen, J., Henny, R. J., Devanand, P. S., Chao, C. T. (2006). AFLP analysis of nephthytis (Syngonium podophyllum Schott) selected from somaclonal variants. *Plant cell reports*, *24*(12): 743-749. 10.1007/s00299-005-0032-2
14. Christopher B. (1994). Encyclopedia of Gardening. The American Horticultural Society: 170-181: 546, 560.
15. Collard B. C., Jahufer M. Z., Brouwe, J. B., Pang E. C. (2005). An introduction to markers, quantitative rait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. Euphytica, 169-196.
16. Collette V. (2004). Anthurium aristocracy. N Z Gard J 7(1): 3–5.
17. Croat TB (1982) A revision of Syngonium (Araceae). Ann MO Bot Gard 68: 565–65.1
18. Damasco O. P., Smith M. K., Adkins S. W., Hetherington S. E., Godwin I. D. (1998). Identification and characterisation of dwarf off-types from micropropagated 'Cavendish' bananas. Acta Horticulturae. 490: 79-84.
19. Damasco O.P., Smith M.K,. Adkins S.W., Hetherington S.E., Godwin I.D. (1998). Identification and characterisation of dwarf off-types from micropropagated 'Cavendish' bananas. Acta Hortic 490: 79–84.
20. De Schepper S. (2001). Molecular Analysis of the Induction of Sports in Azalea (Rhododendron simsii hybrids). PhD Thesis, Ghent University, Belgium, 173. 0368-9697
21. De Schepper S, Debergh P, Van Bockstaele E, De Loose M (2001a). Molecular analysis of sport induction in azalea (Rhododendron simsii hybrids). Acta Horticulturae 552: 143–149.
22. De Schepper, S., Debergh, P., Van Bockstaele, E., De Loose, M., Gerats, A., Depicker, A., Bornman, C. H. (2003). Genetic and epigenetic aspects of somaclonal variation: flower colour bud sports in azalea, a case study. *South African journal of botany*, *69*(2): 117-128.
23. De Schepper S, Leus L, Mertens M, Heursel J, Debergh P, Van Bockstaele E, De Loose M (2001c). Flow cytometric analysis of ploidy in Rhododendron subgenus Tsutsusi. HortScience 36: 125–127.

24. Deng Z. (2012). Caladium genetics and breeding: recent advances. Floric Ornam Biotechnol 6 (Special issue 1): 53–61.
25. Devanand P.S., Chen .J, Henny R.J., Chao C.C.T. (2004). Assessment of genetic relationships among Philodendron cultivars using AFLP markers. J Am Soc Hortic Sci 129: 690–697.
26. Doležel J., Bartoš JAN (2005). Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. Ann Bot 95: 99–110.
27. Doležel J., Valarik M., Vrana J., Lysak M. A., Hribova E., Bartoš J., Gasmanova N., Doleželova M., Šafar J., Šimkova H. (2004). Molecular cytogenetics and cytometry of bananas (Musa spp.). In: Jain SM, Swennen R (eds) Banana improvement: cellular, molecular biology, and induced mutations. Science Publishers, Inc., Enfield: 229–244.
28. Dufour L., Guerin V. (2006). Main environmental factors affecting flowering of Anthurium andreanum L. soilless cultivated in tropical conditions. In: Teixeira da Silva JA (ed) Floriculture, ornamental and plant biotechnology: advances and topical issues, vol. III. Global Science Books Ltd., Isleworth, 172–182.
29. Etienne H, Bertrand B. (2001). The effect of the embryogenic cell suspension micropropagation technique on the trueness to type, field performance, bean biochemical content and cup quality of Coffea arabica trees. Tree Physiol; 21: 1031-38.
30. Forenbacher, S. (1998). Otrovne biljke i biljna otrovanja životinja. Zagreb: Školska knjiga.
31. Giménez C., de Garcia E., de Enrech NX, Blanca I. (2001). Somaclonal variation in banana: cytogenetic and molecular characterization of the somaclonal variant CIEN BTA-03. *In Vitro* Cellular Developmental Biology Plant. 37: 217-222.
32. Grant, B. L. (2018). Do Caladiums Bloom: What Is The Flower-Like Bud On Caladium Plant. 2018, Gardening know how <https://www.gardeningknowhow.com/ornamental/bulbs/caladium/do-caladiums-bloom.htm> Pristupljeno: 3. srpanj, 2018.
33. Griesbach R.J. (1989). Selection of a dwarf Hemerocallis through tissue culture. HortScience 24: 1027–1028.

34. Griesbach, R. J. (2002). Development of Phalaenopsis orchids for the mass-market. *Trends in new crops and new uses. ASHS Press, Alexandria, VA*, 458-465.
35. Gruberac S., Pretović S., Gruberac V., Marić S. (2005). Molekularni markeri u oplemenjivanju rajčice. POLJOPRIVREDA, 55-60.
36. Gupta R., Mallavarapu G.R., Banerjee S., Kumar S. (2001). Characteristics of an isomenthone-rich somaclonal mutant isolated in a geraniol-rich rose-scented geranium accession of Pelargonium graveolens. Flavour Frag J 16(5): 319–324.
37. Henny R. J., Chen J., Norman D.J. (2003). 'Diamond Bay' and 'Emerald Bay'Aglaonema. HortScience 38: 1446–1447.
38. Henny R.J., Chen J. (2011). Tropical foliage plant development: origin of new cultivars. ENH1092. Environmental Horticulture Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. http://edis.ifas.ufl.edu
39. Henny R.J., Poole R.T., Conover C.A. (1992) 'Silver Bay' Aglaonema. HortScience 27: 1238.
40. Henny RJ, Chen J (2003) Foliage plant cultivar development. Plant Breed Rev 23: 245–290.
41. Herwig R. (1975). Sobno i vrtno cvijeće. Grafički zavod Hrvatske, Zagreb.
42. HS Chawla. (2002). Introduction to plant biotechnology. Science publishers. 130-145.
43. Idowu P.E., Ibitoye D.O. Ademoyegun O.T. (2009). Tissue culture as a plant production technique for horticultural crops. African Journal of Biotechnology, 8(16). 10.4314/ajb.v8i16.62060
44. Jain S.M. (1997). Micropropagation of selected somaclones of Begonia and Saintpaulia. J Biosci 22: 582–592.
45. Jain S.M., Buiatti M., Gimelli F., Saccardo F. (1998). Somaclonal Variation in Improving Ornamental Plants. Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvemen, 32: 81-104. 10.1007/978-94-015-9125-6_5
46. Jelaska S. (1994). Kultura biljnih stanica i tkiva Školska knjiga, Zagreb.
47. Jevremović S., Subotić A., Miljković D., Trifunović M., Petrić M., Cingel A. (2012). Clonal fidelity of Chrysanthemum cultivars after long term micropropagation by stem segment culture. Acta Hortic 961: 211–216.

48. Johannes F., Porcher E., Teixeira F. K., Saliba-Colombani V., Simon M, Agier N., Bulski A., Albuisson J., Heredia F., Audigier P, Bouchez D, Dillmann C, Guerche P, Hospital F, Colot V (2009). Assessing the impact of transgenerational epigenetic variation on complex traits. PLoS Genet 5:e1000530
49. Joseph D., Martin K.P., Madassery J., Philip V.J. (2003). *In vitro* propagation of three commercial cut flower cultivars of Anthurium andraeanum Hort. Indian J Exp Biol 41:154–159.
50. Karp A. (1994). Origins, causes and uses of variation in plant tissue cultures. In Plant cell and tissue culture, Springer, Dordrecht, 139-15.1
51. Krikorian A. D., Irizarry H., Cronauer-Mitra S. S., Rivera E. (1993). Clonal fidelity and variation in plantain (Musa AAB) regenerated from vegetative stem and floral axis tips *in vitro*. Ann Bot 71: 519–535.
52. Krishna, H., Alizadeh, M., Singh, D., Singh, U., Chauhan, N., Eftekhari, M., & Sadh, R. K. (2016). Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. 3 Biotech, 6(1), 54.
53. Kumar A. (2009). Molecular markers. Preuzeto: Siječanj 16, 2018, od Science2.0: http://www.science20.com/humboldt_fellow_and_science/molecular_markers
54. Kumar P., Gupta V. K., Mirsa A. K., Modi D. R., Padney B. K. (2009). Potential of Molecular Markers in Plant Biotechnology. Plant Omics, 141-162.
55. Kunert K., Baaziz M., Cullis C. (2003). Techniques for determination of true-to-tyoe date palm (Phoenix dactylifera L.) plants. Emirates Journal of Agricultural Sciences, 1-15.
56. Landey L. B. (2013). Influence of micropropagation through somatic embryogenesis on somaclonal variation in coffee (Coffea arabica) : assessment of variations at the phenotypical, cytological, genetic and epigenetic level. Vegetal Biology. Universit´e Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc. English. <NNT : 2013MON20087>. <tel-01016417>
57. Lee M., Phillips R.L. (1988). The Chromosomal basis of somaclonal variation. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. 39: 413–437.

58. Lee, H. J., Kim, Y. E., Yoon, Y. J., Jeong, C. S., Lian, M. L., Paek, K. Y., & Park, S. Y. (2016). Highly endoreduplicated floral organs of somaclonal variants in clonally propagated Phalaenopsis 'Spring Dancer'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *126*(1), 67-77. 10.1007/s11240-016-0997-6
59. Leva A. R., Petruccelli R., Rinaldi L. M. R. (2012). Somaclonal variation in tissue culture: a case study with olive. In Recent advances in plant *in vitro* culture. InTech.
60. LoSchiavo, F., Pitto, L., Giuliano, G., Torti, G., Nuti-Ronchi, V., Marazziti, D., Vergara, R., Orselli, S. and Terzi, M. (1989). DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and itsvariations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylatingdrugs. Theoretical and Applied Genetics., 77: 325-331.
61. Martin K.P., Joseph D., Madasser J., Philip V.J. (2003). Direct shoot regeneration from lamina explants of two commercial cut flower cultivars of Anthurium andraeanum Hort. *In Vitro* Cell Dev Biol Plant 39(5): 500–504.
62. Matzke M., Kanno T., Daxinger L., Huettel B., Matzke A. J. M. (2009). RNA-mediated chromatin-based silencing in plants. Curr Opin Cell Biol 21: 367–376.
63. Miler N., Zalewska M. (2014). Somaclonal variation of chrysanthemum propagated *in vitro* from different explants types. Acta Sci Pol Hortorum Cultus 13(2): 69–82.
64. Minerva G., Kumar S. (2013). Micropropagation of gerbera (Gerbera jamesonii Bolus). In: Lambardi M, Ozudogru EA, Jain SM (eds) Protocols for micropropagation of selected economically-important horticultural plants. Methods Mol Biol 994: 305–316.
65. Mujib A., Banerjee S., Dev Ghosh P. (2007). Callus induction, somatic embryogenesis and chromosomal instability in tissue cultureraised hippeastrum (Hippeastrum hybridum cv. United Nations). Propag Ornam Plants 7: 169–174.
66. Mujib, A., Banerjee, S., & Ghosh, P. D. (2013). Tissue culture induced variability in some horticultural important ornamentals: chromosomal and molecular basis–a review. Biotechnology, 12(6): 213-224.

67. Nhut D.T., Hai N.T., Thu P.T.M., Thi N.N., Hien T.T.D., Tuan T.T., Nam N.B., Huy N.P., Chien H.X., Jain S.M. (2013). Protocol for inducing flower color somaclonal variation in torenia (Torenia fournieri Lind.). Methods Mol Biol 11013: 455–462.
68. Nhut, D. T., Hai, N. T., Thu, P. T. M., Thi, N. N., Hien, T. T. D., Tuan, T. T., Jain, S. M. (2012). Protocol for inducing flower color somaclonal variation in torenia (Torenia fournieri Lind.). In *Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants*: 455-462. Humana Press, Totowa, NY, 10.1007/978-1-62703-074-8_34
69. Opabode J.T., Adebooye O.C. (2005). Application of biotechnology for the improvement of Nigerian indigenous leaf vegetables. Afr J Biotechnol 4(3): 138–142.
70. Orbović V., Ćalović M., Viloria Z., Nielsen B., Gmitter F.G., Castle W.S., Grossern J.W. (2007). Analysis of genetic variability in various tissue culture-derived lemon plant populations using RAPD and flow cytometry. Euphytica, 161: 329-335. 10.1007/s10681-007-9559-3
71. Petolino J. F., Roberts J. L., Jayakumar P. (2003). Plant cell culture: a critical tool for agricultural biotechnology. In: Vinci VA, Parekh SR (eds.) Handbook of industrial cell culture: mammalian, microbial and plant cells. New Jersey : Humana Press; 243-258.
72. Podwyszynska M., Kuras A., Korbin M. (2010). Somaclonal variation in micropropagated tulips as a source of novel genotypes—field and molecular characteristic. Acta Hortic 855: 225–232.
73. Raimondi J.P., Masuelli R.W., Camadro E.L. (2001). Assessment of somaclonal variation in asparagus by RAPD fingerprinting and cytogenetic analyses. Sci Hortic 90: 19–29.
74. Rajagopolan C. (2000). Export potential of Indian floriculture and need of policy environment. Floric Today. 9: 29-33.
75. Rodrigues P. H. V., Tulmann Neto A., Cassieri Neto P., Mendes B. M. J. (1998). Influence of the number of subcultures on somoclonal variation in micropropagated Nanico (Musa spp., AAA group). Acta Hortic 490: 469–473.

76. Rout, G. R., Mohapatra, A., Jain, S. M. (2006). Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. Biotechnology advances, 24(6), 531-560.
77. Shah S.H., Wainwright S.J., Merret M.J. (2003). Regeneration and somaclonal variation in Medicago sativa and Medicago media. Pak J. Biol Sci. 6: 816–820
78. Sahijram L., Soneji J., Bollamma K. (2003). Analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (Musa spp.). *In Vitro* Cellular Developmental Biology Plant. 39: 551-556.
79. Sandoval J., Kerbellec F., Côte F, Doumas P. (1995). Distribution of endogenous gibberellins in dwarf and giant off-types banana (Musa AAA cv. 'Grand nain') plants from *in vitro* propagation. Plant Growth Regul 17: 219–224.
80. Sarmah D., Sutradhar M., Singh B.K., (2017). Somaclonal variation and its' application in ornamentals plants. Int J Pure App Biosci, 5: 396-406.
81. Sato M, Hosokawa M, Doi M (2011). Somaclonal Variation Is Induced *De Novo* via the Tissue Culture Process: A Study Quantifying Mutated Cells in *Saintpaulia*. PLoS ONE 6(8): e23541. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023541
82. Schiva, T. (2000). Strategies for development of commercial floriculture in Asia and the Pacific. In Report of the APO seminar, 2nd–6th May: 27-38.
83. Schum, A. (2003). Mutation breeding in ornamentals: an efficient breeding method?. In XXI International Eucarpia Symposium on Classical versus Molecular Breeding of Ornamentals-Part I 612: 47-60.
84. Skirvin R.M., Janick J. (1976). Tissue culture-induced variation in scented Pelargonium spp. J Am Soc Hortic Sci 101: 281–290.
85. Skirvin R.M., McPheeters K.D., Norton M. (1994) Sources and frequency of somaclonal variation. HortScience, 29(11): 1232-1237.
86. Skirvin, R. M., McPheeters, K. D., & Norton, M. (1994). Sources and frequency of somaclonal variation. HortScience, 29(11): 1232-1237
87. Smulders, M.J.M. and De Klerk, G.J.(2010). Epigenetics in plant tissue culture. Plant growth regulation, 63(2): 137-146.
88. Smykal P., Valledor L., Rodrıguez R., Griga M. (2007). Assessment of genetic and epigenetic stability in long-term *in vitro* shoot culture of pea (Pisum sativum L.). Plant Cell Rep 26: 1985–1998

89. Speak, A. F., Mizgajski, A., & Borysiak, J. (2015). Allotment gardens and parks: Provision of ecosystem services with an emphasis on biodiversity. Elsevier, 772–781.
90. Squire D. (2008). Orhideje - stručnjak za vrt. Leo-commerce d.o.o., Rijeka.
91. Staub,J. E., Serquen F. C., Gupta M. (1996). Genetic Markers, Map Construction, and Their Application in Plant Breeding. HortScience, Vol. 31(5), 729-741.
92. Šiber, A. (2018). Anturij. Preuzeto 5. Kolovoza, 2018. iz Konstrukcija stvarnosti: http://www.antoniosiber.org/anturij.html
93. Treskić Sanja, M. I.-Š. (2001). Molekularni markeri u oplemenjivanju kukuruza. Plant breeding and production, 71-81.
94. Ulmer, T., MacDougal, J. M., & Ulmer, B. (2004). Passiflora: Passionflowers of the world. *Portland, Or.: Timber Press 430p.-illus., col. illus.. ISBN*, *881926485*.
95. Varshney,R. K., Mahendar T., Aggarwal R. K., Borner A. (2007). Genic molekular markers in plant: development and application. Genomics-Assisted Crop Improvement:, 13-29.
96. Viegas J., da Rocha M.T.R., Ferreira-Moura .I, Correa MG..S., da Silva J.B., dos Santos N.C., Teixeira da Silva J.A. (2007). Anthurium andraeanum (Linden ex Andre) culture: *in vitro* and ex vitro. Floriculture Ornamental Biotech 1(1): 61–65.
97. Winarto, B., Mattjik, N. A., da Silva, J. A. T., Purwito, A., & Marwoto, B. (2010). Ploidy screening of anthurium (Anthurium andreanum Linden ex André) regenerants derived from anther culture. Scientia Horticulturae, 127(1), 86-90.

Životopis

Anita Lukačević je rođena 1. svibnja 1991. godine u gradu Zagrebu kao prvorođeno dijete oca Tomislava i majke Berte.

Pohađala je Osnovnu školu Ljubljanica u Zagrebu, a svoje srednjoškolsko obrazovanje je stekla u Općoj gimnaziji Tituša Brezovačkog u Zagrebu.

Prvu godinu prediplmoskog studija Biljne znanosti na Agronomskom fakultetu u Zagrebu je upisala u srpnju 2013. godine. Na diplomskom studiju 2016. godine nastavlja studiranje na smjeru Biljne znanosti.

Tijekom studija obavljala je praksu u laboratoriju Zavoda za Oplemenjivanje bilja, genetiku i biometriku.

U sklopu prakse i studija, steče dobre komunikacijske vještine, organizacijske vještine, a znanjem i vještinom daje značajan doprinos grupnom radu i u rješavanju problema.

Dobro se služi engleskim jezikom i poznaje osnove njemačkog i talijanskog jezika.