

Марија Марковић
Михаило Грбић
Драгана Скочајић
Данијела Ђунисијевић-Бојовић

UDK: 630*232.32:577.175.1
Оригинални научни рад

УТИЦАЈ БАЛАНСА ФИТОХОРМОНА НА МУЛТИПЛИКАЦИЈУ ИЗДАНАКА И ОЖИЉАВАЊЕ ВРСТЕ *DIANTHUS SEROTINUS* WALDST. & KIT.

Абстракт: Испитан је утицај различитих концентрација фитохормона на умножавање и ожиљавање изданака врсте *Dianthus serotinus*. Све хранљиве подлоге су садржале MS минерални раствор, 3% сахарозу, 0.8% агар, $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ миоинозитола, $0,05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ тиамина, $0,25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ никотинске киселине и $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ глицина. У циљу пролиферације бочних изданака у основни медијум додати су ВАР (6-бензил-аминопурин) у концентрацијама $0,1\text{-}2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ и NAA (α -нафтилсирћетна киселина) у концентрацијама $0,1\text{-}1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Најбољи резултати постигнути су на медијуму са по $0,5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ВАР-а и NAA. Ожиљавање изданака је било најуспешније (73 %) на медијуму са $0,5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA.

Кључне речи: *Dianthus serotinus*, угрожене врсте, размножавање *in vitro*

EFFECT OF PHYTOHORMONE BALANCE ON SHOOT MULTIPLICATION AND ROOTING OF THE SPECIES *DIANTHUS SEROTINUS* WALDST. & KIT.

Abstract: The effect of different phytohormone concentrations on shoot multiplication and shoot rooting was researched on the species *Dianthus serotinus*. All nutritive media contained MS mineral solution, 3% sucrose, 0.8% agar, $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ mioinositol, $0,05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ thiamin, $0,25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ nicotinic acid and $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ glycine. For lateral shoot proliferation, the basic medium was supplemented with BAP (6-benzylaminopurine) in concentrations $0,1\text{-}2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and NAA (α -naphthalene-acetic acid) in concentrations $0,1\text{-}1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. The best results were achieved on the medium with

мр Марија Марковић, асистент, Универзитет у Београду - Шумарски факултет, Београд
др Михаило Грбић, ред. професор, Универзитет у Београду - Шумарски факултет, Београд
мр Драгана Скочајић, асистент, Универзитет у Београду - Шумарски факултет, Београд
мр Данијела Ђунисијевић-Бојовић, асистент, Универзитет у Београду - Шумарски факултет, Београд

0.5 mg·L⁻¹ BAP and NAA. Rooting was most successful (73%) on the medium with 0.5 mg·L⁻¹ NAA.

Key words: *Dianthus serotinus*, endangered species, propagation *in vitro*

1. УВОД

Пешчарски каранфил - *Dianthus serotinus* Waldst. & Kit. је панонски ендемит. То је вишегодишња, зељаста, бусенаста биљка, висине 30-40 cm, са листовима плави-часто зелене боје. Цветови су крем боје, благог мириса, са круничном лиском која је по ободу кончаста, а цвета од јула до септембра. Станиште чине суви, топли, осунчани, песковити терени, пешчане пустаре. Расте на песку који има неутралну до базну реакцију (pH=7,00-8,10) и веома је сиромашан хумусом (Гајић, 1986, Божа, 1999). Због изузетних декоративних особина, дугог периода цветања, особине да добро успева на сиромашним земљиштима, као и због отпорности на сушу, пешчарски каранфил се може примењивати у хортикултури, посебно на песковитим земљиштима. Погодан је за алпинетуме, сухозиде, цветне бордуре, ивице и сл. Данас се на иностраном тржишту може наћи и мањи број сорти *D. serotinus* са цветовима различитих боја.

D. serotinus се налази на светској „црвеној листи” флоре у категорији рањивог таксона. У Србији има статус крајње угроженог таксона и као природна реткост у Србији заштићен је законом (СГ РС бр. 66/91, 83/92 и 50/93). Присутан је само на подручју Суботичко-хоргошке пешчаре, у малом броју, где је угрожен ширењем пољопривредних површина и насеља, пошумљавањем и експлоатацијом на природном станишту (Божа, 1999).

Због свега наведеног, у циљу повећања бројности *D. serotinus* на природном станишту, за обогаћивање фонда ботаничких башти, као и ради његовог коришћења у хортикултури, неопходно га је размножити. Најпогоднији метод размножавања представља микропропагација јер се за кратко време од мале количине полазног материјала добија велики број биљака, чиме је притисак на природну популацију минималан. Она се последњих година често користи приликом размножавања великог броја угрожених врста, укључујући и *Dianthus* spp. (Фау, 1992, Ковач, 1995, Радојевић *et al.*, 1997, Mikulík, 1999, Venson *et al.*, 2000, Мишић, 2004, Марковић *et al.*, 2006).

Због тога је циљ овог рада био да се испита могућност увођења *D. serotinus* у културу *in vitro*, као и да се утврди утицај различитих концентрација фитохормона на мултипликацију и ожиљавање изданака, како би се одредили оптимални услови за микропропагацију ове врсте.

2. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД

За заснивање културе *in vitro* коришћено је семе сакупљено у јулу 2004. године на локалитету Суботичко-хоргошка пешчара. Семе је до употребе чувано у

папирној кеси, на собној температури. Површинска стерилизација семена извршена је коришћењем 4% раствора NaOCl (комерцијални препарат „Bella“) уз додатак 2-3 капи препарата Tween 20 у трајању од 20 минута, након чега је испирано три пута по пет минута стерилном дестилованом водом.

Семе је постављено на медијум без хормона, укупно 65 семена, и након 25 дана, са добијених клијаваца исецане су вршне и нодусне резнице и постављане на медијум са додатком хормона (6-benzil-aminopurina - BAP-a и α -naftil-sirćetne kiseline - NAA) у циљу пролиферације и умножавања бочних изданака.

Семе, нодусне и вршне резнице постављани су у теглице ($5 \times 5 \times 12$ cm), по 5 експлантата у сваку, које су садржале по 30-35 mL медијума и затворене су затварачима од алуминијумске фолије, газе и вате. Четири недеље након постављања вршних и нодусних резница, одређен је број изданака по експлантату, њихова дужина, као и број нодуса. Ожиљавање изданака обављено је на медијуму са или без хормона, у теглама (85×180 mm) које су садржале по 75 mL медијума и по 10 експлантата, током три недеље, након чега је утврђен проценат ожиљених изданака, као и дужина и број коренова.

Све хранљиве подлоге коришћене током мултипликације и ожиљавања изданака садржале су MS минерални раствор (Murashige, Skoog, 1962), 3% сахарозу, 0,8% агар, $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ мио-инозитола, $0,05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ тиамина, $0,25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ никотинске киселине и $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ глицина. Медијум на ком је извршена сетва семена *in vitro* садржао је $\frac{1}{2}$ MS минерални раствор, 3% сахарозу, 0,8% агар, $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ мио-инозитола, $0,025 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ тиамина, $0,125 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ никотинске киселине и $0,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ глицина.

За испитивање утицаја баланса цитокинина и ауксина на пролиферацију бочних изданака у основни медијум додати су BAP у концентрацијама $0,1$ - $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ и NAA у концентрацијама $0,1$ - $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (табела 1). Ожиљавање изданака обављено је на медијуму без хормона или са додатком NAA у концентрацијама од $0,05$, $0,1$ и $0,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. При том је рН вредност медијума подешена на 5,8 додавањем $0,1 \text{ N HCl}$ и $0,1 \text{ N NaOH}$ пре аутоклавирања на температури од 120°C и притиску од $1,5 \text{ atm}$ током 20 минута.

Табела 1. Садржај хормона у хранљивим подлогама за мултипликацију изданака

Table 1. Content of hormones in nutritive media for shoot multiplication

Медијум	1	2	3	4	5	6	7
BAP [$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$]	1	1	2	2	0,5	0,5	0,1
NAA [$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$]	1	0,5	0,5	1	0,5	0,1	0,1

Културе су гајене на температури $25 \pm 2^\circ\text{C}$, са фотопериодом од 16^{h} , при светлости флуоресцентних белих цеви „Гесла“ - Панчево и густиним фотонског флукса од $50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Током ових истраживања није било могућности да се спроведе и фаза аклиматизације.

Статистичка обрада података извршена је у одговарајућем програму за статистичку обраду података. Значајност разлика између средњих вредности утврђена је анализом варијансе (ANOVA, $p < 0,05$) и методом најмање значајне разлике. У фази мултипликације изданака сваки третман је обухватао три понављања са по 25 експлантата, а у фази оживљавања постављено је по 30 изданака у три понављања.

3. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Иницијална фаза

In vitro култура *D. serotinus* успешно је успостављена, а контаминације није било. Клијавост семена *in vitro*, веома је висока и износила је 97%, што се могло и очекивати јер и друге врсте каранфила углавном имају висок проценат клијавости. Тако је клијавост *D. zeyheri* ssp. *natalensis* износила 80% (Crouch, van Staden, 1993), а клијавост *D. giganteiformis* subsp. *kladovanus* 88 % (Марковић *et al.*, 2006).

Мултипликација

Након 28 дана по постављању, утврђен је број некротираних, витрификованих и нормално развијених експлантата који се могу искористити за субкултуру (табела 2). Експлантати који су остали непромењени сврстани су у категорију пропалих експлантата.

Табела 2. Стање експлантата после 28 дана гајења у култури *in vitro*

Table 2. Explant status after 28 days of culture *in vitro*

Тип експлантата Explant type		Вршне резнице Tip cuttings			Нодусне резнице Nodal cuttings		
Хормони/Hormones		N	ND	V	N	ND	V
BAР	NAA						
$mg \cdot L^{-1}$		%	%	%	%	%	%
1	1	22,9 bcd	77,1 bc	0,0 a	28,6 ab	71,4 c	0,0 a
1	0,5	15,9 abc	81,7 cd	2,4 a	40,9 ab	51,7 ab	7,4 a
2	0,5	35,8 d	64,2 abc	0,0 a	44,5 b	55,5 b	0,0 a
2	1	9,4 ab	81,1 cd	9,4 ab	42,0 ab	44,5 a	13,5 a
0,5	0,5	3,3 a	96,7 d	0,0 a	50,0 b	50,0 ab	0,0 a
0,5	0,1	30,0 cd	50,0 a	20,0 b	50,0 b	50,0 ab	0,0 a
0,1	0,1	40,0 d	60,0 ab	0,0 a	20,0 a	80,0 c	0,0 a

Легенда/Legend: N - некротирани / necrosis, ND - нормално развијени / normally developed, V - витрификовани / vitrified

Удео нормално развијених експлантата углавном је био задовољавајући, прелазећи 70% на више хранљивих подлога. На неколико хранљивих подлога испољиле

су се статистички значајне разлике у броју нормално развијених бусенова између нодусних и вршних резница. На подлогама са $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ВАР-а и $0,5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA, $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ВАР-а и $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA и на подлози са ВАР-ом и NAA по $0,5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ сваки, та разлика је била у корист вршних резница, а нодусне резнице су се успешно регенерисале у већем степену једино на медијуму са ВАР-ом и NAA, по $0,1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ сваки.

Витрификација се јављала ретко и у занемарљивом проценту. Једини изузетак представљају вршни експлантати на подлози са $0,5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ВАР-а и $0,1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA, где је било 20 % витрификованих експлантата, и поред релативно ниске концентрације цитокинина. С друге стране, на подлози са $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ВАР-а и $0,5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA витрификованих експлантата није ни било, мада се њихова појава могла очекивати, обзиром да високе концентрације цитокинина утичу на појаву витрификације (Винтерхалтер, Винтерхалтер, 1996).

За разлику од наших резултата, приликом микропропагације врсте *D. gratianopolitanus* утицај цитокинина на појаву витрификације је био изражен, као и утицај типа експлантата, при чему је проценат витрификације био знатно виши код вршних него код нодусних експлантата (Fraga *et al.*, 2004), што се у овом раду манифестовало једино на подлози са $0,5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ВАР-а и $0,1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA.

Код малог броја експлантата дошло је до појаве калуса који се јавио најчешће испод првог пара листова, на површини медијума, а ређе и дуж тих листова. Количина калуса била је незнатна, обично пречника до 5 mm , врло ретко до 10 mm , слично као и код врсте *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* (Марковић *et al.*, 2006).

Процент калусиралих резница није био велики. Максималне вредности износе 13,9% за нодусне и 12,6% за вршне резнице, а у односу на тип експлантата статистички значајних разлика у броју калусиралих експлантата није било. Насупрот томе, у раду са *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*, број калусиралих нодусних резница (48%) био је знатно већи од броја вршних резница које су калусирале (18%) (Марковић *et al.*, 2006).

Утицај ауксина на формирање калуса је био изражен, пошто на медијуму са $0,1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA нема калусиралих експлантата, а са повећањем концентрације NAA ($0,5$ и $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) калус се јавља код одређеног броја експлантата (0,9-13%). Таква појава је у литератури већ позната (Винтерхалтер, Винтерхалтер, 1996), а присутна је и приликом микропропагације других врста каранфила - *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* (Марковић *et al.*, 2006), *D. superbis* subsp. *superbis* (Mikulík, 1999), где, такође, с порастом концентрације ауксина у медијуму расте и број калусиралих експлантата.

Поред тога, у нашем раду се запажа и да је, при константној концентрацији NAA, број калусиралих експлантата знатно мањи на медијуму са $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ВАР-а (0,9-7%) него на подлози са $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ВАР-а (12-13,9%), због чега се може претпоставити да је и концентрација ВАР-а могла да утиче на удео калусиралих експлантата, а вероватно је дошло и до интеракције са NAA.

На свим медијумима одређен је укупан број изданака по експлантату, а минималан, максималан и просечан број изданака за оба типа резница приказани су у табели 3.

Табела 3. Број изданака по експланту после 28 дана гајења у култури *in vitro*
Table 3. Number of shoots per explant after 28 days in culture *in vitro*

Тип експлантата Explant type		Вршни експлантати Tip explants			Нодусни експлантати Nodal explants		
Хормони/Hormones		min	max	Сред. вр. Average	min	max	Сред. вр. Average
ВАР	НАА						
mg·L ⁻¹							
1	1	1	22	7,7 a	1	13	6,8 ab
1	0,5	1	32	7,4 a	1	31	5,0 a
2	0,5	1	17	8,4 a	1	13	3,6 a
2	1	1	36	9,0 a	1	34	9,8 b
0,5	0,5	2	34	10,7 a	1	32	7,6 ab
0,5	0,1	1	5	2,6 a	1	7	3,2 ab
0,1	0,1	1	9	5,8 a	3	5	4,0 ab

Број изданака по експланту био је прилично варијабилан и кретао се од 1 до чак 36 изданака на истој хранљивој подлози. Због тога, вероватно, и није било статистички значајних разлика у просечном броју изданака по експлантату на различитим хранљивим подлогама.

Такође, тешко је било уочити било какву правилност у погледу утицаја различитих концентрација ВАР-а на број формираних изданака, иако се могло очекивати да са повећањем концентрације ВАР-а број формираних изданака по експланту расте јер ВАР стимулише развој бочних пупољака. Приликом микропропагације *D. gratianopolitanus* утицај цитокинина на повећање броја избојака по експланту био је изражен и то при нивоу значајности од $p \leq 0,001$, а утицај интеракције концентрација цитокинина и ауксина при $p \leq 0,01$ (Fraga *et al.*, 2004). Међутим, у овом раду, утицај промене концентрације ВАР-а при константној концентрацији НАА и обрнуто, као ни утицај односа ВАР-а и НАА (1:1, 2:1, итд.) на број изданака по експлантату нису били изражени.

На број формираних изданака није утицао ни тип експлантата, јер добијене разлике нису биле статистички значајне. То, такође, не одговара резултатима које су добили Fгага и сарадници (2004), према којима је тип експлантата значајно утицао на број формираних изданака ($p \leq 0,001$).

Како је дужина изданака прилично варијабилна код појединачних експлантата, одлучено је да се направе одговарајуће дужинске категорије и дужина изданака изрази као учешће изражено у процентима у свакој од њих (табела 4).

Табела 4. Дужина изданака

Table 4. Shoot length

Хормони Hormones		Дужина избојака вршних резница Shoot length of tip cuttings				Дужина избојака нодусних резница Shoot length of nodal cuttings			
ВАР	НАА								
$mg \cdot L^{-1}$		1-10 mm	11-20 mm	20-30 mm	>30 mm	1-10 mm	11-20 mm	20-30 mm	>30 mm
1	1	66,3 ab	15,5 ab	7,1 ab	11,2 a	79,4 ab	2,9 ab	5,9 ab	11,8 abc
1	0,5	78,8 abc	10,7 ab	1,8 a	8,8 a	76,0 ab	7,6 a	5,8 ab	10,6 b
2	0,5	75,8 abc	11,7 ab	9,4 b	3,1 a	74,2 a	16,2 ab	9,6 b	0,0 a
2	1	80,0 bc	13,8 ab	5,3 ab	1,0 a	89,3 b	8,5 a	1,7 a	0,5 a
0,5	0,5	63,5 a	16,6 b	11,6 b	8,2 a	72,8 a	21,9 b	4,5 ab	0,8 ab
0,5	0,1	94,4 c	5,6 a	0,0 ab	0,0 a	100,0 b	0,0 a	0,0 ab	0,0 ab
0,1	0,1	73,8 abc	5,8 a	6,2 ab	14,2 a	43,8 a	12,5 ab	6,3 ab	37,5 c

Највећи број изданака на свим медијумима (63-94%), без обзира на тип експлантата, био је у дужинској категорији до 10 mm. Слични резултати су забележени и са другим врстама каранфила - *D. superbis* (Mikulík, 1999), *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* (Марковић *et al.*, 2006).

Утицај већих концентрација цитокинина на смањење броја изданака дужих од 20 mm може се уочити, мада су присутна велика преклапања између хомогених група. Тако се на подлогама са 2 $mg \cdot L^{-1}$ ВАР-а број експланата дужих од 20 mm кретао од 2,2-12,5%, на подлогама са 1 $mg \cdot L^{-1}$ ВАР-а од 10,6-18,3%, да би на медијумима са 0,1 $mg \cdot L^{-1}$ ВАР-а њихов број достигао чак 43.8% од укупног броја изданака.

Дужина изданака се мењала и са променом концентрације НАА. На подлози са 0,5 $mg \cdot L^{-1}$ ВАР-а и 0,1 $mg \cdot L^{-1}$ НАА није било ниједног изданка дужег од 20 mm, а повећањем концентрације НАА на 0,5 $mg \cdot L^{-1}$, при истој концентрацији ВАР-а, 5,3% изданака нодусних експланата и готово 20% изданака вршних експланата било је дуже од 20 mm.

Поред броја изданака по експлантату, одређен је и просечан број формираних нодуса по постављеном експлантату (табела 5).

Просечан број нодуса кретао се од 2,6-15,6 по експлантату, али су присутна и велика преклапања између хомогених група и разлике у броју нодуса на више хранљивих подлога нису биле статистички значајне. При том се концентрација ВАР-а кретала од 0,1-2 $mg \cdot L^{-1}$, а концентрација НАА од 0,1-1 $mg \cdot L^{-1}$, због чега можемо тврдити да концентрације додатих хормона углавном нису значајно утицале на број формираних нодуса. Сличне резултате са врстом *Nepeta rtanjiensis* добила је и Мишић (2004) према којој се просечан број аксиларних пупољака (нодуса) није значајно мењао са повећањем концентрације ВАР-а од 0,05-1 $mg \cdot L^{-1}$, али се за разлику од ових резултата, њихов број значајно повећао при концентрацијама ВАР-а од 2 и 4 $mg \cdot L^{-1}$.

Најмањи број нодуса, за оба типа експлантата, развио се на медијуму који садржи $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ВАР и $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA (2,6 и 3,2 нодуса, табела 5). На овом медијуму било је и највише изданака дужине до 10 *mm*, због чега се овакав резултат могао и очекивати.

Табела 5. Просечан број нодуса по постављеном експланту
Table 5. Average number of nodes per explant

Тип експлантата Explant type		Вршне резнице Top cuttings			Нодусне резнице Nodal cuttings		
Хормони/Hormones		<i>min</i>	<i>max</i>	Сред. вр. Average	<i>min</i>	<i>max</i>	Сред. вр. Average
ВАР	NAA						
$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$							
1	1	2	24	11,4 ab	0	23	11,0 ab
1	0,5	1	49	13,1 ab	0	36	8,1 ab
2	0,5	1	28	11,5 ab	1	11	5,1 a
2	1	0	56	12,2 ab	0	47	11,2 b
0,5	0,5	2	35	15,6 b	1	19	7,0 ab
0,5	0,1	2	7	3,2 a	0	5	2,6 a
0,1	0,1	2	16	8,3 ab	4	12	9,2 ab

На већини хранљивих подлога просечан број нодуса по вршном експлантату кретао се од 11,4-15,6, а по нодусном експлантату просечан број нодуса био је нешто мањи и углавном се кретао од 7-11,2. Ипак, само на медијумима који су садржали $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA и $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ или $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ВАР-а, разлике између вршних и нодусних експлантата су биле статистички значајне.

До спонтаног оживљавања у фази мултипликације није дошло што може бити последица присуства ВАР, који инхибиторно делује на формирање коренова.

Индекс мултипликације

На основу добијених резултата, како би се одредио оптималан баланс фитохормона у медијуму за мултипликацију, израчунат је индекс мултипликације, односно просечан број нових експлантата, добијених од једног постављеног експлантата, који се могу искористити за наредну субкултуру (табеле 6 и 7).

Просечан број вршних резница одговара просечном броју изданака по експлантату који је претходно одређен. Међутим, како су приликом одређивања просечног броја нодуса по експлантату узети у обзир сви нодуси, а не само они способни за субкултуру, њихов број је накнадно коригован.

Нодуси из чијих су се пупољака већ развили изданци нису могли бити искоришћени за субкултуру, па је број нодуса по експлантату умањен за број формираних изданака. Како један нодус има два аксиларна пупољка, од којих су понекад оба

развијена, а некад нису, онда је број нодуса способних за субкултуру израчунат по следећој формули:

$$\text{коригован број нодуса} = \text{број нодуса} - \text{број изданака} \times 0,8.$$

Табела 6. Индекс мултипликације вршних резница
Table 6. Multiplication index of tip cuttings

Хормони Hormones		Нор. раз. експлан. Norm. dev. explants	Прос. бр. нодуса Av. № of nodes	Кор. бр. нодуса Corr. № of nodes	Прос. бр. изданака Av. № of shoots	Потен. нодусне рез. Poten. nodal cuttings	Потен. вршне резнице Poten. tip cuttings
BAР	NAA						
$mg \cdot L^{-1}$		%					
1	1	77,1	11,4	5,3	7,7	4,1	6,0
1	0,5	81,7	13,1	7,2	7,4	5,8	6,1
2	0,5	64,2	11,5	4,8	8,4	3,1	5,4
2	1	81,1	12,2	5,1	9,0	4,1	7,3
0,5	0,5	96,7	15,6	7,1	10,7	6,8	10,3
0,5	0,1	50,0	3,2	1,1	2,6	0,6	1,3
0,1	0,1	60,0	8,3	3,7	5,8	2,2	3,5

Табела 7. Индекс мултипликације нодусних резница
Table 7. Multiplication index of nodal cuttings

Хормони Hormones		Нор. раз. експлан. Norm. dev. explants	Прос. бр. нодуса Av. № of nodes	Кор. бр. нодуса Corr. № of nodes	Прос. бр. изданака Av. № of shoots	Потен. нодусне рез. Poten. nodal cuttings	Потен. вршне резнице Poten. tip cuttings
BAР	NAA						
$mg \cdot L^{-1}$		%					
1	1	71,4	11,0	5,6	6,8	4,0	4,9
1	0,5	51,7	8,1	4,1	5,0	2,1	2,6
2	0,5	55,5	5,1	2,3	3,6	1,2	2,0
2	1	44,5	11,2	3,4	9,8	1,5	4,3
0,5	0,5	50,0	7,0	0,9	7,6	0,4	3,8
0,5	0,1	50,0	2,6	0,0	3,2	0,0	1,6
0,1	0,1	80,0	9,2	6,0	4,0	4,8	3,2

Коефицијент 0,8 је добијен под претпоставком да се око 40% изданака развило из два наспрамна аксиларна пупољка. Овај начин одређивања индекса мултипликације садржи одређену грешку, јер проценат наспрамних изданака варира код сваког експланта, али је та грешка занемарљива у коначном резултату. Како је, поред нормално развијених, било и витрификованих и пропалих експлантата, добијени број

потенцијалних вршних и нодусних резница је додатно умањен множењем процентом нормално развијених експлантата за сваки тип медијума.

Узимајући у обзир резултате приказане у табелама 6 и 7, затим квалитет формираних бусенова (дужина, број изданака), као и економску исплативост (цена хормона) за умножавање изданака врсте *D. serotinus* предаже се медијум који садржи по $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ВАР-а и NAA.

Ожиљавање

Састав хранљиве подлоге је значајно утицао на проценат ожиљавања изданака. На подлогама без хормона или са нижим концентрацијама NAA, проценат ожиљених експлантата био је прилично низак, на медијуму са $0,05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA - свега 10,6%, а на медијумима без хормона и са $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA - 34,7% и 39,5%, респективно.

Једино је на подлози са $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA био ожиљен нешто већи број изданака (72,8%), што је слабо у поређењу са ожиљавањем изданака других врста каранфила код којих се проценат ожиљавања кретао од 91-100%, и то углавном на медијуму без хормона (Радојевић *et al.*, 1997, Mikulik, 1999, Марковић *et al.*, 2006), али одговара резултатима добијеним са појединим култиварима *D. caryophyllus* и *D. gratianopolitanus* који се такође ожиљавају у нешто нижем проценту (62-80%) (Радојевић *et al.*, 1990, Fraga *et al.*, 2004).

Квалитет ожиљавања (дужина и број коренова) био је задовољавајући једино на подлози са $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA, где је велики број експлантата (70%) имао по 10-25 коренова, а дужина формираних коренова се претежно кретала 5-25 mm. Насупрот томе, на подлози без хормона, готово сви експланати (94 %) су имали по 1-5 коренова, дужине углавном до 10 mm.

Такође, уочљив је и утицај промене концентрације NAA на дужину и број формираних коренова. Винтерхалтер и Винтерхалтер (1996) наводе да са повећањем концентрације ауксина углавном расте и број коренова по експланту, али њихова дужина опада, међутим, код *D. serotinus* са повећањем концентрације NAA повећавали су се и број коренова и њихова дужина.

У периоду спровођења овог истраживања нисмо имали могућности за аклиматизацију добијених ожиљеница, због чега та фаза размножавања *in vitro* није спроведена. На основу резултата који су добијени са другим врстама каранфила, где се проценат аклиматизованих ожиљеница кретао од 80-100% (Kovac, 1995, Радојевић *et al.*, 1997, Fraga *et al.*, 2004, Марковић *et al.*, 2006), може се претпоставити да би и за *D. serotinus* тај удео био висок, али је потребно да се то потврди огледом.

5. ЗАКЉУЧЦИ

In vitro култура *D. serotinus* успешно је успостављена. Клијавост семена била је изузетно висока (97%), а контаминација није било. Оптималан медијум за мултипликацију изданака пешчарског каранфила садржи по $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ВАР-а и NAA, и на њему није било појаве витрификованих експлантата.

Додавање хормона у медијум за оживљавање је неопходно, а најбољи резултати (73% оживљених изданака) су постигнути на медијуму са $0,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ НАА. Добијени проценат оживљавања је задовољавајући, али би се провођењем додатних истраживања (утицај концентрација соли, додавање других ауксина и сл.) могао накнадно побољшати.

Метода приказана у овом раду може се успешно користити за умножавање и оживљавање изданака *D. serotinus*, једноставна је за примену, а фактор мултипликације је изузетно висок. Међутим, како би се примена методе микропропагације у размножавању *D. serotinus* оправдала и користила у практичном раду, неопходно је испитати и могућност аклиматизације *in vitro* биљака добијених овом методом.

ЛИТЕРАТУРА

- Benson E., Danaher J.E., Pimbley I.M., Anderson C.T., Wake J.E., Daley S., Adams L.K. (2000): *In vitro propagation of Primula scotica: a rare Scottish plant*, Biodiversity and Conservation 9 (711-726)
- Винтерхалтер Д., Винтерхалтер Б. (1996): *Култура in vitro и микропропагација биљака*, Ахиа П.О., Београд
- Божа П. (1999): *Dianthus serotinus Waldst. & Kit.*, „Црвена књига флоре Србије“, Министарство за животну средину Републике Србије, Биолошки факултет Универзитета у Београду, Завод за заштиту природе Републике Србије, Београд (252-254)
- Гајић М. (1986): *Флора и вегетација Субојичко-хорватске њешчаре*, Шумарски факултет Универзитета у Београду, Београд - Шумско газдинство, Суботица
- Ковач Ј. (1995): *Micropropagation of Dianthus arenarius subsp. bohemicus - an endangered endemic from the Czech Republic*, Botanic Gardens Micropropagation News 8 (106-108)
- Марковић М., Грбић М., Шинделић А. (2006): *Могућности микропропагације Dianthus giganteiformis ssp. kladovanus (Degen) Soko методом пролиферације бочних избојака*, Гласник Шумарског факултета 94, Универзитет у Београду - Шумарски факултет, Београд (171-181)
- Мишић Д. (2004): *Микропропагација риањске меливице (Nepeta rtanjensis Diklić & Milojević) као ефикасан начин ex situ заштите*, магистарски рад у рукопису, Биолошки факултет Универзитета у Београду, Београд
- Mikulík J. (1999): *Propagation of endangered plant species by tissue cultures*, Acta Universitatis Palackianae Olomucensis, Biologica 37 (27-33)
- Murashige T., Skoog F. (1962): *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*, Physiologia Plantarum 15 (473-497)
- Radojević Lj., Đorđević N., Petrović J. (1990): *In vitro culture techniques for carnation breeding*, Acta Horticulturae 280, (163-168)
- Радојевић Љ., Маринковић Н., Јевремовић С. (1997): *Вегетативно размножавање у култури мерисима и семената стабла Dianthus petraeus Waldst. et Kit. subsp. poeanus*, Гласник института за ботанику и Ботаничке баште Универзитета у Београду, 31 (73-77)

- Fay M.F. (1992): Conservation of rare and endangered plants using in vitro methods, *In Vitro Developmental Biology* 28 (1-4)
- Fraga M., Mertxe A., Ellul P., Borja M. (2004): *Micropropagation of Dianthus gratianopolitanus*, *HortScience* 39 (4) (112-115)
- Crouch N.R., van Staden J. (1993): *In vitro culture of Dianthus zeyheri subsp. natalensis, a South African carnation*, *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 35 (81-85)

Marija Marković
Mihailo Grbić
Dragana Skočajić
Danijela Đunisijević

EFFECT OF PHYTOHORMONE BALANCE ON SHOOT MULTIPLICATION AND ROOTING OF THE SPECIES *DIANTHUS SEROTINUS* WALDST. & KIT.

Summary

The species *Dianthus serotinus* is a Pannonian endemic which is present only in the area of the Sands Subotičko-horgoška Peščara. It is listed in the World Red List of flora in the category of vulnerable taxa. In Serbia, it has the status of extremely endangered taxa and it is protected by law (Boža, 1999). At the same time, *D. serotinus* is a species of extraordinary ornamentalness, suitable for horticultural purposes. To increase its abundance at its native site, and in the aim of its utilisation in horticulture, it was decided to propagate the autochthonous material.

This paper studies the possibility of its micropropagation, because by this method the pressure on natural population is minimal, and the multiplication factor is extremely high.

The culture in vitro was established from the seeds, and the explants in the multiplication stage were nodal and tip cuttings. All media used during multiplication and shoot rooting consisted of MS mineral solution, 3% sucrose, 0.8% agar, 100 mg·L⁻¹ mio-inositol, 0.05 mg·L⁻¹ thiamin, 0.25 mg·L⁻¹ nicotinic acid and 1 mg·L⁻¹ glycine.

Aiming at the proliferation of lateral shoots, we added BAP (6-benzyl-aminopurine) in concentrations 0.1-2 mg·L⁻¹ and NAA (α - naphthaleneacetic acid) in concentrations 0.1-1 mg·L⁻¹. The best results were achieved on the medium with 0.5 mg·L⁻¹ BAP and NAA.

Shoot rooting was performed on the medium without hormones or with addition of NAA in concentrations of 0.05, 0.1 and 0.5 mg·L⁻¹. The highest percentage of rooted explants (73 %) was on the medium with 0.5 mg·L⁻¹ NAA.

The method presented in this paper can be successfully used for *D. serotinus* shoot multiplication and shoot rooting, its application is simple, and the multiplication factor is exceptionally high. In further research, it is necessary to determine the degree of acclimatisation of the produced in vitro plants, which will enable its application in practice.