

Marković M., Grbić M., Đukić M. 2013. *The use of in vitro culture in dianthus propagation*. Bulletin of the Faculty of Forestry 107: 141-162.

Марија Марковић
Михаило Грбић
Матилда Ђукић

UDK: 58.085.2:581.165.7:582.661.51
Прегледни научни рад
DOI: 10.2298/GSF1307137M

ПРИМЕНА КУЛТУРЕ *IN VITRO* У РАЗМНОЖАВАЊУ КАРАНФИЛА

Извод: Култура *in vitro* је данас веома актуелна како у научном истраживању до сада недовољно истражених биљних врста тако и у комерцијалној производњи. У раду је дат осврт на историјат и методе културе *in vitro*. Дати су основни принципи и особине најчешће коришћених метода. Посебна пажња је посвећена примени различитих метода у размножавању каранфила (*Dianthus L.*). Издвојени су комерцијално значајни таксони, а дат је и приказ размножавања других врста каранфила који имају декоративна својства која их квалификују за примену у хортикултури.

Кључне речи: микропропагација, *Dianthus*, култура ткива

THE USE OF *IN VITRO* CULTURE IN DIANTHUS PROPAGATION

Abstract: Today, *in vitro* culture is of the great importance in both scientific investigation of under-researched plant species and plant production. In this paper, a review of development and methods of *in vitro* culture is presented. The main principles are given and the most commonly used methods are described. Special attention was paid to the propagation of *Dianthus* spp. Tissue culture of commercially important taxa is described in detail, and the review of propagation of other decorative *Dianthus* spp. that can be used as ornamental plants is also given.

Key words: micropropagation, *Dianthus*, tissue culture

мр Марија Марковић, асистент, Универзитет у Београду - Шумарски факултет, Београд (marija.markovic@sfb.bg.ac.rs)

др Михаило Грбић, редовни професор, Универзитет у Београду - Шумарски факултет, Београд

др Матилда Ђукић, редовни професор, Универзитет у Београду - Шумарски факултет, Београд

1. УВОД

1.1. Појам културе *in vitro*

Култура биљних ћелија, ткива и органа *in vitro*, или краће - култура биљака *in vitro*, представља гајење различитих биљних делова (експланата) одвојених од матичне биљке, на вештачкој хранљивој подлози (медијуму), у стерилним, контролисаним лабораторијским условима. Како су експланте изузетно малих димензија, размножавање биљака културом *in vitro* назива се још и микропропагација (Pierik, 1987, Hartmann *et al.*, 1990, Grbić, 2004). Поједини аутори (Vinterhalter и Vinterhalter, 1996, Nešković *et al.*, 2003) размножавање биљака културом *in vitro* дефинишу као микропропагацију у ширем смислу, док сам термин микропропагација користе за културу пупољака (апикалних или аксиларних).

Први покушаји гајења биљног ткива на хранљивим подлогама рађени су почетком прошлог века. Истраживачи су пошли од претпоставке да је свака биљна ћелија, укључујући и соматске, аутономна и генетски способна да регенерише целу биљку (тотипотентност). Први успешан експеримент извршио је Hannig 1904. године, гајећи незреле ембрионе неколико врста из породице Cruciferae (Brassicaceae). Све до открића ауксина (1928. год.), а потом и осталих биљних хормона (citoкинина, гиберелина и др.) успешних експеримената гајења биљних фрагмената било је мало. Након открића ауксина, током 1939., Gautheret, Nobécourt и White, независно један од другог, постигли су успех са гајењем биљног ткива (ћелије камбијума шаргарепе, *Daucus carota* L.) у култури. Њихови радови сматрају се првом правом културом ткива (Pierik, 1987).

У периоду који следи истраживања су била усмерена на индуковање ћелијских деоба, којима се најчешће добијало неиздиференцирано ткиво - калус, као и на одржавање добијеног калуса неограничено дуго у култури. Даљим истраживањима утврђено је да се, у одговарајућим условима, зависно од врсте, калус диференцира и поново регенерише биљне органе (органогенеза). Откриће биљних хормона, ауксина и citoкинина, као и откриће њиховог интерактивног дејства на диференцирање калуса представља прекретницу у развоју биљне културе *in vitro*. Данас постоји велики број синтетичких ауксина и citoкинина који налазе значајну примену не само у култури *in vitro*, већ и у производњи биљака генеративним путем (Ђукић, 1983, 1984, 1985, 1987, Ђунисијевић *et al.*, 2005, 2006, Grbić *et al.*, 2005, Ђукић *et al.*, 2007).

У зависности од концентрације, али и међусобног односа ових хормона, индуковани су различити биљни органи. Тако је створена могућност контроле органогенезе калуса, који може да се усмери у правцу регенерације изданака или коренова, а тиме и нове биљке. Такође, зависно од типа експланата и услова гајења (концентрација и врста хормона, састав подлоге - концентрације микро и макро елемената, витамина и др.), нови биљни органи могу се образовати из пупољака, врхова изданака, меристема, листова и др., без формирања калуса.

Због чињенице да је култура *in vitro* првобитно подразумевала добијање неиздиференцираног ткива (калуса) и његово даље гајење у култури, размножавање биљака у условима *in vitro* често се назива и размножавање културом ткива, што и није у потпуности адекватно јер биљке могу да се размножавају и културом различитих биљних органа (пупољци, листови, оваријуми, антере), културом ембриона, сетвом семена и др., при чему се калус често уопште и не формира.

Већ половином двадесетог века, истраживања се усмеравају на могућности примене културе *in vitro* у масовном размножавању биљака. Резултати добијени за поједине културе доводе до отварања првих комерцијалних лабораторија у којима се биљни материјал производи коришћењем одговарајућих техника културе *in vitro* што је значајно унапредило производњу појединих таксона. На пример, већ шездесетих година прошлог века микропропагација се користи у вегетативном размножавању орхидеја које се традиционалним методама размножавају веома тешко и споро, због чега су орхидеје, пре примене микропропагације, биле изузетно скупе и доступне само малом броју потенцијалних купаца (Pierik, 1987).

1.1. Класификација метода културе *in vitro*

Најпознатија класификација биљне културе *in vitro* извршена је према типу експланата. Pierik (1987) издваја шест основних група. То су:

- култура интактне биљке (сетва семена *in vitro*)
- култура ембриона (изолованих из семена)
- култура органа (пупољци, корен, изданци, антере итд.)
- култура калуса (најчешће настаје дедиференцирањем различитог ткива)
- култура ћелија (гајење појединачних ћелија добијених из калуса или из диференцираног ткива)
- култура протопласта (добијеног дигестијом ћелијског зида).

Наведене методе размножавања се, међутим, често међусобно комбинују, односно културе засноване једном методом касније се гаје применом неке друге. Тако се, на пример, културом ембриона добија неконтаминирани клијавац који се потом размножава одговарајућом методом културе органа (котиледони, апикални меристем, итд.) при чему се користи боља експресија тотипотентности код ембрионалних ткива. Такође, диференцирањем ћелија калуса могу се добити ембриони (соматска ембриогенеза) или различити органи (изданци, коренови), који се даље гаје применом неког другог метода културе *in vitro*.

Поред наведене класификације, често се помињу и друге које се делимично разликују, према различитим ауторима, али свака од њих обухвата исте методе које су различито груписане (Pierik, 1987, Hartmann *et al.*, 1990, Nešković, 1986, Nešković *et al.*, 2003). Зависно од врсте експланта и услова његовог гајења, регенерација може бити директна, без формирања калуса, и индиректна, када се најпре формира калус који се потом наново диференцира.

Тако Hartmann *et al.* (1990) помиње пет основних типова регенерације вегетативних органа:

- култура врхова меристема,
- пролиферација бочних изданака,
- индуковање адвентивних изданака,
- органогенеза,
- соматска ембриогенеза.

У култури врхова меристема најчешће се као експланте користе само вегетационе купе са 2 - 3 лисне примордије, чијим растом се могу добити изданци који су ослобођени вируса, и након ожиљавања здраве, безвирусне биљке.

Пролиферација бочних изданака настаје спречавањем доминације апикалног меристема и развојем бочних (пазушних или аксиларних) пупољака, при чему се као експланте користе изданци или нодусне резнице.

Термин органогенеза Hartmann *et al.* (1990) искључиво користе за регенерацију биљних органа из калуса, док Nešković *et al.* (2003) под појам органогенезе сврставају и директно формирање адвентивних изданака на површини постављеног експланта, јер се у оба случаја вегетативни органи формирају *de novo*, док културу врхова меристема и пролиферацију бочних изданака издвајају као групу метода којима се подстиче развој већ формираних зачетака органа.

Под соматском ембриогенезом подразумева се развој комплетног ембриона из ћелија вегетативног ткива које се могу добити коришћењем различитих типова експланата, директно или након формирања ембриогеног калуса.

1.1.2. Фазе размножавања у култури *in vitro*

Начин размножавања *in vitro* разликује се зависно од врсте, па чак и сорте. Међутим, све врсте током размножавања пролазе кроз мање или више исте фазе.

У почетној (иницијалној) фази узимају се експланте са биљака које су расле у природним условима или у стакленику и заснива се култура. Том приликом, експланте се обраде тако да се ослободе од патогена (стерилизација), како би се за следећу фазу размножавања - фазу мултипликације, обезбедио здрав полазни материјал. Стерилизација биљног материјала се најчешће врши коришћењем раствора NaOCl (0,5 - 4%), а нешто ређу примену има Ca(OCl)₂ и HgCl₂. (Vinterhalter i Vinterhalter, 1996, Nešković *et al.*, 2003, Grbić, 2004).

У фази мултипликације примењују се различите методе, а све оне имају за циљ добијање што већег броја изданака односно будућих биљчица. Најједноставније је са добијених изданака одсецати једнонодусне резнице и постављати их на свеж медијум. Grbić (1992) овај метод користи за умножавање изданака брестова, а Piegik (1987) наводи да се успешно примењује и приликом размножавања кромпира, крушке, ружа, бршљана, неких врба, парадајза и др.

У комерцијалној производњи мултипликација изданака се знатно чешће врши пролиферацијом бочних изданака. Тада се изданци добијени у иницијалној

фази преносе на медијум са релативно високим концентрацијама цитокинина, који се најчешће комбинују са ниским концентрацијама ауксина (Pierik, 1987, Vinterhalter и Vinterhalter, 1996). Пролиферацијом бочних изданака размножавање се одвија релативно брзо, генотип биљака остаје очуван (мутације су ретке), а добијене биљке су здраве, доброг пораста (Pierik, 1987). Индукција адвентивних изданака се ретко користи, постигнута је код мањег броја врста, а могућност појаве мутација је већа (Pierik, 1987, Hartmann *et al.*, 1990).

Ожиљавање изданака *in vitro* се врши на медијуму без хормона, обично са повећаном концентрацијом ауксина, а често и редукованом концентрацијом неорганских соли. Међутим, добијене *in vitro* биљке се морају аклиматизовати на услове спољашње средине јер специфични услови у култури *in vitro* (хетеротрофна исхрана у присуству релативно високе концентрације шећера, висока релативна влажност ваздуха и мања количина светлости и прилив CO₂ него код култура гајених конвенционалним методама) доводе до формирања биљака које имају измењену морфологију, анатомију и физиологију (Pospisilova *et al.*, 1999). Биљке које су расле у условима *in vitro* најчешће имају слабо развијену кутикулу због високе релативне влажности ваздуха која се у посудама креће 90 - 100%. Због тога може доћи до прекомерне евапорације преко кутикуле када се биљке пребаце у услове *in vivo*. Током аклиматизације дебелина листова се обично повећава, долази до развоја кутикуле и ефективног регулисања транспирације преко стома што води ка стабилном водном режиму. Такође, код аклиматизованих биљака повећан је и садржај хлорофила (Pospisilova *et al.*, 1999).

Имајући у виду да су коренови формиран у условима *in vitro* осетљиви и да не функционишу добро *in vivo*, да имају мало или су без коренских длачица, да брзо пропадају и да морају бити замењени новоформираним кореновима током процеса аклиматизације, понекад се добијени изданци ожиљавају као зелене резнице у класичним супстратима у условима *ex vitro*, уз коришћење миста или у условима високе влажности, истовремено са аклиматизацијом. (McClelland, 1990, Diaz-Perez *et al.*, 1995, Carvalho *et al.*, 2002). Тада се обично користе супстрати који имају примену и приликом ожиљавања резница конвенционалним методама (тресет, перлит, вермикулит, итд.), посебно припремљени тако да не садрже баналне контаминанте. На тај начин се скраћује и производни процес, јер се формирање кореновог система одвија истовремено са адаптацијом биљака на услове спољашње средине (Pierik, 1987, Hartmann *et al.*, 1990, Grbić, 2004).

2. ПРИМЕНА У БИЉНОЈ ПРОИЗВОДЊИ

Методе које се користе у култури *in vitro* немају подједнак значај у комерцијалној биљној производњи. Тако, сетва семена у условима *in vitro* је изузетно значајна при размножавању орхидеја јер је за клијање њиховог семена неопходна симбиоза са гљивама (микориза), а дејство гљива се може заменити одговарајућом хранљивом подлогом (Pierik, 1987). Међутим, за размножавање

различитих култивара орхидеја, много већи значај имају вегетативне методе културе *in vitro* (култура пупољака) (Marković *et al.*, 2012). Треба напоменути да се састав хранљиве подлоге мора подесити за сваки таксон посебно. Друга значајна примена сетве семена у условима *in vitro* огледа се у томе што се омогућава његово брже и поузданије клијање, а то има значаја приликом добијања нових сорти јер се при хибридизацији обично добије релативно мала количина семена и важно је да што више семена исклија.

Култура ембриона нема значајнију примену у биљној производњи, углавном се користи за превазилажење проблема везаних за клијање семена. На пример, код палме *Cocos nucifera* "Макарупо" постоји дормантност семена проузрокована инхибиторним материјама које се налазе у ендосперму па се експлантирањем ембриона *in vitro* брже добијају нове биљнице (Bonga, 1985, Grbić, 2003). Такође, културом ембриона могу се добити клијавци који се користе као безвирусне подлоге за калемљење у условима *in vitro* (микрoкалемљење) (Pierik, 1987, Hartmann *et al.*, 1990).

Треба напоменути да, иако култура калуса има значајну примену у фармацеутској индустрији, где се гаје ткива способна да синтетишу различите секундарне метаболите, она се, међутим, не користи у масовном размножавању биљака због могућности појаве генетичких промена услед релативно високих доза хормона које се користе за индукцију и одржавање калуса. Култура ћелија и протопласта има значаја за добијање клонираних ћелијских линија, које поред коришћења за различита биохемијска и цитолошка истраживања, имају значаја у синтези нових хибрида (соматска хибридизација).

У вегетативном, масовном размножавању биљака најчешће се користе пупољци (меристеми). Култура меристема је нашла значајну примену у комерцијалној производњи здравог садног материјала, нарочито код оних врста које су подложне вирусним и гљивичним обољењима (каранфил, гербер, малина, кромпир и многе друге). Досадашња истраживања и пракса су показали да је могуће културом врхова меристема добити потомство које није заражено вирусима ("virus-free"), као ни другим патогенима (гљиве, бактерије), чак иако је матична биљка заражена (Grbić, 1988, Vinterhalter i Vinterhalter, 1996, Pierik, 1987, Hartmann *et al.*, 1990, Grbić, 2004).

Вероватноћа добијања здравог потомства културом меристема у великој мери зависи од величине експланта. Што је он мањи, могућност елиминације вируса је већа. Hartmann *et al.* (1990) наводе да је гајењем врхова меристема величине 0,10 - 0,15 mm, елиминација вируса потпуна, али ипак заснивање културе са тако малим експлантима је теже, број експланата који пропадну је већи, а и гајење дуже траје. Поред тога, Nešković *et al.* (2003) наводе и да се гајењем вегетационе купе без лисних примордија добија само калус. Због тога, у пракси се најчешће користе експланте величине 0,25 - 1 mm, на којима се, поред вегетационе купе, налазе и две дисталне лисне примордије. Међутим, у том случају, могућност да су експланте заражени није у потпуности искључена, што се проверава одговарајућим тестовима (Vinterhalter и Vinterhalter, 1996, Hartmann *et al.*, 1990, Nešković *et al.*, 2003).

Провера заражености биљног материјала може се вршити на више начина. Код матичних биљака које су расле у условима *ex vitro* може се догодити да се присуство патогена не испољава, и тада се може применити метода индексације (Grbić, 2004) када се на подлогу (биљку коју испитујемо) калемимо одговарајућа племка, на којој ће се присуство патогена манифестовати уколико постоје у подлози.

Након успостављања *in vitro* културе потребно је проверити успешност стерилизације. Понекад се контаминације, уколико постоје, могу уочити већ неколико дана након заснивања културе када се на подлози јављају први симптоми. Међутим, поједини патогени организми, као што су бактерије из родова *Erwinia Winslow et al.* и *Pseudomonas Migula* или *Bacillus subtilis Cohn* могу остати унутар биљног материјала и по неколико месеци, а да њихово присуство не буде детектовано. Због тога се повремено узимају узорци - делови експланата и гаје на специфичним подлогама за детекцију одговарајућих патогена, најчешће гљива или бактерија, док су за утврђивање присуства вируса развијени посебни тестови (ELISA тест, нпр.). (Pierik, 1987, Hartmann *et al.*, 1990, Nešković *et al.*, 2003)

Поред успостављања културе меристема, за добијање безвирусних биљака користи се и излагање полазног материјала повишеним температурама ("heat-treatment") одређено време, од 20 - 40 дана па и до неколико месеци. Температуре се крећу око 35 - 38°C и најчешће се топлоти не излажу целе биљке, већ само њихови делови. Овај метод је ефикасан само против ограниченог броја вируса и неких патогена, јер је и биљни материјал осетљив на повишене температуре (Pierik, 1987, Hartmann *et al.*, 1990).

Потребно је напоменути да култура меристема често није начин размножавања биљака у условима *in vitro*, већ се користи само у иницијалној фази размножавања, како би се добиле здраве, безвирусне биљке, које ће се потом размножавати применом неког другог метода културе *in vitro*. Једна од наважнијих и најчешће коришћених метода у фази мултипликације изданака, нарочито у комерцијалној биљној производњи, је метод пролиферације бочних пупољака. Као експланте се углавном користе врхови изданака или нодусне резнице узете са изданака који су најчешће претходно добијени културом меристема и тако ослобођени од патогена. Ови експланте се гаје на медијуму одговарајућег састава у циљу спречавања апикалне доминације и стимулације развоја бочних пупољака. Састав медијума зависи од врсте биљке и најчешће се додају цитокинини и у нижој концентрацији ауксини.

3. ПРИМЕНА КУЛТУРЕ *IN VITRO* У РАЗМНОЖАВАЊУ ТАКСОНА РОДА *DIANTHUS*

Данас већина култивара сезонског цвећа и перена, укључујући и *Dianthus* spp. у комерцијалној производњи се размножава генеративно, сетвом F1 хибрида

(Anderson, 2005). Међутим, стварању одређеног F1 хибрида претходе године истраживања током којих се врши формирање чистих линија које адекватним укрштањем дају сорту жељених особина, често супериорнију од оба родитеља (хетерозис). Поред тога, код многих таксона постоји репродуктивна баријера којом се спречава самоопрашивање и тиме формирање хомозиготних линија, због чега је једна од алтернатива вегетативно размножавање жељених хетерозиготних генотипова (Anderson, 2005).

Класичне методе вегетативног размножавања каранфила укључују деоба бокора и резнице. Међутим, због малог фактора мултипликације, деоба бокора се користи само код мањих обима производње (Мијановић, 1979, Нау, 1996). Размножавање резницама се користи код малог броја врста каранфила. Најзначајнију примену има код *D. caryophyllus* L., врсте која је подложна патогенима, па се у том случају резнице обавезно узимају са безвирусних ("virus free") матичних биљака добијених културом ткива (Ball, 1991, Dole i Wilkins, 2004).

Посматрајући истраживања везана за културу *in vitro* врста рода *Dianthus*, први публиковани радови појавили су се релативно рано 1963. године (Stone, 1963) свега неколико година након открића кинетина - цитокинина (1955. године), и открића синергистичког дејства цитокинина и ауксина на формирање и раст вегетативних органа, 1957. године (Skoog и Miller, 1957). Stone (1963) је успоставио културу врхова меристема *D. caryophyllus* L. (величине од 0,2 mm до 1 mm) истражујући уједно и факторе који утичу на њихов развој. Меристеми су узимани са матичних биљака различите старости, током читаве године и гајени у епруветама на течном медијуму са "држачем" направљеним од филтер папира. Регенерисане биљке су ожиљене и успешност је зависила од величине експланта и времена када су они узети са матичних биљака. Током седамдесетих година публикована су и друга истраживања везана за културу *in vitro* *D. caryophyllus*. Међу њима треба поменути истраживања Petru и Landa (1974) који су најпре сетвом семена *in vitro* успоставили стерилну културу, а затим су са добијених клијаваца исецали хипокотил и апикални меристем из чега се развијао калус. Органогенезом калуса формирали су се изданци који су касније ожиљени, а потом је извршена аклиматизација добијених биљака на природне супstrate. Интересантно је поменути и истраживања која су спровели Roest и Boklemann (1981). Они су испитивали ефекат X-зрака на 6 култивара *D. caryophyllus* у зависности од генотипа и позиције експланта на резници (у односу на терминални пупољак) као и на мултипликацију изданака у култури *in vitro* и на ризогенезу.

До данас је публикован већи број радова везаних за пропагацију биљака *D. caryophyllus* коришћењем различитих типова експланата (сегменти стабла, листови, оваријуми, петиоле и сл.) и метода (пролиферација бочних изданка, култура суспензије ћелија, соматска ембриогенеза, органогенеза калуса) (Табела 1).

Поред наведених у табели 1, *D. caryophyllus* је коришћен и за друга истраживања везана за културу *in vitro*, као што су улога оксидативног стреса биљака у појави хиперхидричних експланата (Saher *et al.*, 2004), минерална исхрана под

Табела 1. Преглед резултата добијених културом *in vitro* врсте *D. caryophyllus*
 Table 1. Survey of studies of *in vitro* culture of *D. caryophyllus*

Референца Reference	Тип културе Type of culture	Експлант Explant	Резултати Results
Retig и Landa (1974)	органогенеза калуса	- врхови меристема - хипокотил	Успешно су регенерисани адвентивни изданци.
Earle и Langhans (1975)	култура изданака	- врхови изданака	Показан позитиван ефекат комбиновања ауксина и цитокинина у медијуму.
Davis <i>et al.</i> (1977)	култура меристема	- врхови меристема	Пролиферација меристема, елиминација вируса.
Roest и Bokelmann (1981)	култура изданака	- нодусне резнице	Испитан утицај генотипа и зрачења X-зрацима.
Lubomski и Jerzy (1989)	регенерација адвентивних изданака	- сегменти интернодија без аксиларних пулољака	Регенерисани адвентивни изданци и коренови, уз формирање калуса.
Radojević <i>et al.</i> (1990)	култура ћелија	- сегменти интернодија	Формиране вишећелијске колоније и микрокалус.
Radojević <i>et al.</i> (1990)	органогенеза калуса	- сегменти интернодија	Формиран калус, а након тога органогенезом калуса адвентивни изданци који су ожиљени, аклиматизовани и цветали; нису забележене мутације.
Radojević <i>et al.</i> (1990)	култура меристема	- врхови меристема	Пролиферација меристема, развој аксиларних пулољака.
Frey и Janick (1991)	регенерација адвентивних изданака	- крунични и чашични листићи - нодуси - интернодије - листови	Код испитиваних култивара регенерација није постигнута код сегмената интернодија, ни код листова. Највећи проценат регенерације забележен је из круничних листића, али је било соматоналних варијација.

Референца Reference	Тип културе Type of culture	Експлант Explant	Резултати Results
Miller <i>et al.</i> (1991)	регенерација адвентивних изданака	- аксиларни пупољци - листови - сегменти интернодија	Адвентивне примордије су се формирале на базалном крају пресека аксиларних пупољака, и из њих су се развили адвентивни изданци након 2-3 недеље; развој адвентивних изданака из листова и сегмената интернодија био је безуспешан.
Nugent <i>et al.</i> (1991)	регенерација адвентивних изданака	- крунични листићи - сегменти интернодија - цветна ложа	Највећи проценат формирања изданака био је код сегмената најмлађих интернодија; Биљке регенерисане из сегмената интернодија расле су брже од биљака регенерисаних из круничних листића или из цветне ложе.
Nakano и Mii (1992)	култура протопласта	- листови <i>in vitro</i>	Слаба регенерација изданака.
van Altvorst <i>et al.</i> (1992), van Altvorst <i>et al.</i> (1994)	регенерација адвентивних изданака	- листови са <i>in vitro</i> биљака - листови са биљака гајених у стакленику	Најбољи резултати - најмлађи листови, непосредно испод апикалног меристема. Није било аберантних биљака. Степен регенерације из листова са истог нодуса се разликовао.
Messegueur <i>et al.</i> (1993)	регенерација адвентивних изданака	- листови - базални делови цветва - крунични листићи	Регенерација из базалних делова цветова и круничних листића је успешна, али се јављају аберације. Адвентивни изданци на листовима су се формирали једино у базалном делу лиске.
Nakano <i>et al.</i> (1994)	регенерација адвентивних изданака	- листови - сегменти интернодија - крунични листићи	Највећи проценат регенерације адвентивних изданака из круничних листића. Степен регенерације зависи од стадијума развоја цветва у време исецања круничних листића, најслабији код потпуно отворених цветова.

ПРИМЕНА КУЛТУРЕ IN VITRO У РАЗМНОЖАВАЊУ КАРАНФИЛА

Референца Reference	Тип културе Type of culture	Експлант Explant	Резултати Results
van Aitvorst <i>et al.</i> (1995)	регенерација адвентивних изданака	- листови - сегменти интернодија - аксиларни пулољци	Степен регенерације изданака није зависио од величине аксиларног пулољка и његовог положаја у односу на апикални меристем, али јесте зависио од положаја листова и сегмената интернодија (експланти најближи апикалном меристему су показали највећи степен регенерације).
Plahi <i>et al.</i> (1995)	пролиферација бочних изданака	- нодусне резнице	Позитиван утицај релативно високих концентрација ВАР (2 mg/l, 3 mg/l).
Brar <i>et al.</i> (1995)	пролиферација бочних изданака	- аксиларни пулољци	Мультипликација изданака је зависила од генотипа (култивара), врсте и концентрације цитокинина.
Waiad <i>et al.</i> (1996)	регенерација адвентивних изданака	- сегменти интернодија	Експланти су гајени на течной подлози, подлози са агаром и на подлози са плутајућим носачем (Sigma). Максимална регенерација је постигнута на течной подлози са плутајућим носачем, нешто мања на подлози са агаром, а најмања код експланата гајених на течной подлози.
Kallak <i>et al.</i> (1997)	органогенеза калуса	- врхови изданака - нодуси - сегменти интернодија	Формирање адвентивних изданака зависило је од порекла калуса; калус добијен из сегмената интернодија није формирао адвентивне изданке. На органогенезу калуса значајно је утицао и генотип.
Sato <i>et al.</i> (2000)	култура оваријума	- оваријуми претходно опрашивани поленом третираним X-зрацима	Биљке су успешно регенерисане, а додатним истраживањима је потврђено да су дихаплоидне.

Референца Reference	Тип културе Type of culture	Експлант Explant	Резултати Results
Jain <i>et al.</i> (2001)	органогенеза калуса	- листови <i>in vitro</i>	Регенерација изданака из калуса је успешна, али је присутна витрификација, која је превазиђена додавањем гиберелинске киселине (GA_3 и бакто-пептона).
Pareek i Kothari (2003)	директна соматска ембриогенеза	- листови <i>in vitro</i>	Експланти су гајени у течном медијуму, а након 3 недеље формирали су се ембриони у стадијуму срца и торпеда, без претходног формирања калусног ткива. Из ембриона су успешно одгајене и аклиматизоване биљке.
Salehi (2005)	пролиферација бочних изданака	- врхови изданака - нодуси	Испитана могућност употребе универзалног медијума за 13 култивара. Успешно у фази мултипликације, неефикасно у фази ожиљавања.
Gharbia <i>et al.</i> (2008)	култура меристема	- врхови меристема	Елиминација вируса, утицај различитих концентрација регулатора раста на мултипликацију и ожиљавање изданака.
Kanwar i Kumar (2009)	органогенеза калуса	- листови - сегменти интернодија	На регенерацију изданака утицао је тип експланта из којег је добијен калус, као и тип регулатора раста који су коришћени.
Kharrazi <i>et al.</i> (2011)	пролиферација бочних изданака	- врхови изданака	Оптимизација састава медијума у циљу смањења витрификације.
Sayeed Hassan <i>et al.</i> (2011)	пролиферација бочних изданака	- врхови изданака - нодуси	Утицај регулатора раста на мултипликацију и ожиљавање изданака.
Ashmayi <i>et al.</i> (2012)	култура меристема	- врхови изданака	Утицај величине експланта на елиминацију вируса.

различитим условима проветравања култура (Dantas *et al.*, 2001), употреба мист-реактора у аклиматизацији (Coggell i Weathers, 2001), ожиљавање и аклиматизација трансгених биљака (Valassi *et al.*, 2003), порекло и транспорт IAA у ожиљавању резница (Garrido *et al.*, 2002), утицај хормона на прецветавање (Cook и van Staden, 1988), утицај типа подлоге (агар, течна подлога) на формирање изданака (Watad *et al.*, 1996), могућност криопрезервације врхова изданака (Halmalgyi и Lambardi, 2007) и многа друга која се баве оптимизацијом постојећих протокола и превазилажењем одређених проблема, као што је појава витрификације (Gimelli *et al.*, 1984, Fal *et al.*, 1999, Yadav Manoj *et al.*, 2003, Maјada *et al.*, 1998, Maјada *et al.*, 2000, Garrido *et al.*, 2002).

Већ дуже време се култура *in vitro* користи у комерцијалној производњи *D. caryophyllus*. Hartmann *et al.* (1990) наводе да се он лако размножава микро-пропагацијом (пролиферација бочних изданака) коришћењем врхова изданака као експаната. Како се ова врста успешно размножава и зеленим резницама, у циљу обезбеђивања здравог, безвирусног материјала, матичне биљке са којих се узимају резнице добијају се културом меристема (Kuzmičić и Jug-Dujaković, 1982, Hartmann *et al.*, 1990, Dole i Wilkins, 2004). Данас постоје многе компаније које се баве производњом резница *D. caryophyllus*, као што је "Ringel nursery" из Пољске (Ringel nursery, 2012) који продају ожиљене или неожиљене резнице, а резнице су узимане са матичних биљака добијених културом ткива и ослобођених вируса ("disease-free").

У микропропагацији *D. caryophyllus* велики проблем представља појава хиперхидричности (витрификација), која је присутна мање или више, зависно од култивара који се производи, али и од бројних других фактора. На пример, у истраживањима која су спровели Yadav *et al.* (2003) појава хиперхидричности је редукована мењањем концентрација јона магнезијума и гвожђа у подлози, с тим да су оптималне концентрације морале да се подешавају посебно за сваки испитивани култивар. Kever *et al.* (2004) и Saheg *et al.* (2004) су испитивали узроке хиперхидричности, пре свега као последицу физиолошког стреса биљке.

Истраживања везаних за културу *in vitro* других врста комерцијално значајних каранфила, у односу на *D. caryophyllus*, има мање. При том највећи број истраживања у култури *in vitro* везан је за врсте *D. barbatus* L. и *D. chinensis* L. Тако су Jethwani i Kothari (1993) гајили котиледоне обе врсте (*D. barbatus* i *D. chinensis*) индукујући адвентивне изданке на подлогама са ВАР и NAA које су потом ожиљавали на подлогама без хормона. Такође, Jethwani *et al.* (1994) су извршили микро-пропагацију наведене две врсте каранфила, културом врхова изданака, а Khowar *et al.* (2007) су размножавали *D. barbatus* културом меристема и нодусним резницама (само први нодус испод апикалног пупољка). Код врсте *D. chinensis* је постигнута и регенерација изданака из калуса (Jethwani i Kothari, 1996), а индукцију адвентивних пупољка *D. chinensis* на површини лисних сегмената, без формирања калуса, извршили су Kantia i Kothari (2002). Код *D. barbatus* адвентивни изданци су се формирали органогенезом калуса који је индукован из лисних експаната

(Pareek и Pareek, 2005). Формирани изданци су гајени на медијуму са GA_3 ради издуживања, потом су ожиљавани на MS подлози (Mugashige и Skoog, 1962) са 2 mgL^{-1} IBA, а добијене биљке су успешно аклиматизоване. Поред тога, Pareek и Kothari (2003) су описали успешан поступак директне соматске ембриогенезе (без формирања калуса) за *D. barbatus* и *D. chinensis* гајењем сегмената листова у култури *in vitro*, а Pareek *et al.* (2004) су размножили наведене две врсте користећи вршне и нодусне резнице као експланте.

Поред врста *D. barbatus* и *D. chinensis*, публикована су истраживања везана за културу ткива других каранфила. Тако су Montes *et al.* (1997) изоловали меристеме величине 0,2 - 0,5 mm, са апикалних и аксиларних пупољака *in vitro* биљчица *D. plumarius* L. које су добијене из семена. Fraga *et al.* (2004) су извршили елиминацију вируса, који представљају велики проблем у производњи врсте *D. gratianopolitanus* Vill., комбинацијом културе меристема и третмана повишеним температурама. Најпре су са матичних биљака које су расле у стакленику изоловали меристеме (величине 0,3 mm) који су се развили у изданке и гајили их 3 месеца на 24°C, а затим наредних 6 недеља на 37°C. Након тога су са преживелих изданака поново изоловали меристеме и цео поступак су понављали док тестови нису показали да су биљке ослобођене вируса. Добијене безвирусне биљке су потом размножавали пратећи утицај хормона на развој изданака и коренова, при том користећи као експланте врхове изданака (3 mm дужине), једнонодусне резнице, листове и оваријуме.

Сва наведена истраживања указују на то да култура *in vitro* има велики значај у производњи каранфила, било за масовну производњу жељених култивара, било у селекцији нових сорти. Поред директне примене у производњи биљака, култура *in vitro* има и значај за добијање семена F1 хибрида.

Данас већина култивара сезонског цвећа и перена, укључујући и таксоне рода *Dianthus* у комерцијалној производњи се размножава генеративно, сетвом F1 хибрида (Anderson, 2005). Сорте каранфила које се првенствено размножавају семеном припадају врстама: *D. barbatus*, *D. chinensis*, *D. carthusianorum* L., *D. arenarius* L., *D. deltoides* L. и *D. knappii* (Pant.) Asch. & Kanitz ex Borbás. Добијању F1 хибрида претходи формирање чистих линија и успостављање хомозиготног стања, које гарантује потомство униформних особина често супериорнијих од родитељских (хетерозис). Овај поступак често је дуготрајан и мукотрпан због честих репродуктивних баријера којима се спречава самоопрашивање (Anderson, 2005). То се може превазићи применом културе ткива (Suslow *et al.*, 2002), при чему се узгајају хаплоидна ткива и ћелије, код којих се одговарајућим третманима постиже удвајање хромозома и на тај начин се добијају хомозиготне, диплоидне биљке за знатно краће време него што би то било могуће класичним путем.

Иако у самој биљној производњи култура протопласта нема значаја, она је изузетно важна за синтезу нових сорти. Тако, на пример, Nakano и Mii (1993a) су извршили соматску хибридизацију врста *D. barbatus* и *D. chinensis* применивши

фузију протопласта, а потом су из тако добијених хибридних ћелија регенерисали калус и након 5 месеци органогенезом калуса - изданке. Изданци су ожиљени, а добијене биљке су цветале у условима *in vitro*. На основу боје цветова, броја хромозома и гDNA анализе утврђено је да су добијене биљке хибриди. Такође, применом исте методе извршена је и соматска хибридизација врста *D. chinensis* и *D. caryophyllus* (Nakano и Mii, 1993b).

Поред примене у размножавању комерцијално значајних таксона, култура *in vitro* има значаја и у размножавању каранфила који су пореклом са природних станишта. Наиме, последњих година вртови који "имитирају" природу и у којима су заступљене "дивље" биљке све више добија на значају (Hitchmough, 2008). Применом микропропагације омогућава се размножавање одабраних таксона без притиска на природну популацију, уз очување генетске разноврсности тих биљака (уколико се култура успоставља из семена). На овај начин, поред материјала за "природне вртове" може да се обезбеди и материјал чија садња треба да омогући активну рестаурацију природних предела, односно уношење и ширење врста које припадају потенцијалној вегетацији одређеног подручја. Разлог за то налазимо у потреби да се обезбеди довољна генотипска и фенотипска варијабилност која гарантује већи адаптивни потенцијал (Grbić, 1996). Фаворизовање аутохтоних врста је од изузетног значаја за одређено подручје јер се на тај начин смањује могућност уношења и ширења инвазивних и потенцијално инвазивних таксона који данас представљају озбиљан проблем и велику претњу опстанку природне вегетације (Obratov-Petković *et al.*, 2011, Popović и Marković, 2012, Popović *et al.*, 2012, Tomićević *et al.*, 2012). Због тога су спроведена различита истраживања везана за размножавање неинвазивних таксона (Kozomara *et al.*, 2003, Grbić *et al.*, 2012, Marković и Popović, 2012c), међу којима су и каранфили (*D. deltoides* L., *D. serotinus* Waldst. & Kit., *D. giganteiformis* Borbas ssp. *kladovanus* (Degen) Soo) који су аутохтони у Србији, малих захтева за негом и изузетних декоративних карактеристика (Marković *et al.*, 2006, 2007, Marković, 2008, Popović *et al.*, 2008, Marković и Popović, 2012a, 2012b). Међу наведеним каранфилима, *D. serotinus*, *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* су сврстани у категорију угрожених таксона, због чега њихово размножавање представља уједно и предуслов за њихову *in situ* и *ex situ* конзервацију, при чему, управо култура *in vitro* представља најпогоднији метод размножавања (Pence, 1999).

Напомена: Овај рад је реализован у оквиру пројекта "Истраживање климатских промена на животну средину: праћење утицаја, адаптација и ублажавање" (43007), који финансира Министарство за просвету и науку РС у оквиру програма Интегрисаних и интердисциплинарних истраживања за период 2011-2014. године

ЛИТЕРАТУРА

- Altvorst van, A.C., Koehorst, H.J.J., Bruinsma, T., Dons, J.J.M. (1994): *Improvement of adventitious shoot formation from carnation leaf explants*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture 37 (87-90)
- Altvorst van, A.C., Koehorst, H.J.J., Bruinsma, T., Jansen, J., Custers, J., De Jong, J., Dons, J.J.M. (1992): *Adventitious shoot formation from in vitro leaf explants of carnation (Dianthus caryophyllus L.)*, Scientia Horticulturae 51 (223-235)
- Altvorst van, A.C., Yancheva, S., Dons, H. (1995): *Cells within the nodal region of carnation shoots exhibit a high potential for adventitious shoot formation*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture 40 (151-157)
- Anderson, N.O. (2005): *Breeding Flower Seed Crops*. "lower Seeds, Biology and Technology" Ured. McDonald, M.B., Kwong, F.Y., CABI Publishing, CAB International, (53-86)
- Ashnayi, M., Kharrazi, M., Sharifi, A., Mehrvar, M. (2012): *Carnation Etched Ring Virus Elimination Through Shoot Tip Culture*. Journal of Biological & Environmental Sciences 6(17) (175-180)
- Ball, V. (1991): *The Ball Red Book*. 15th edn. Ball Publishing, Batavia, Illinois.
- Bonga, J.M. (1985): *Tissue Culture in Forestry*. Kluwer Academic Publishers Group. Dordrecht
- Brar, M.S., Al Khayri, J.M., Klingaman, G.L. (1995): *In vitro shoot multiplication of carnation axillary buds and nodes*, In Vitro 31 (3, Part 2) (61)
- Carvalho, L., Santos, P., Amâncio, S. (2002): *Effects of light intensity and CO₂ concentration during the acclimatisation of in vitro grapevine*, Vitis 41 (1-6)
- Cook, E.L., van Staden, J. (1988): *The carnation as a model for hormonal studies in flower senescence*, Plant Physiology and Biochemistry 26 (793-807)
- Correll, M.J., Weathers, P.J. (2001): *One-step, in vitro acclimatization of carnation using a mist reactor*, Biotechnology and Bioengineering 73(3) (253-8)
- Dantas, A.K., Majada, J.P., Fernández, B., Cañal, M.J. (2001): *Mineral nutrition in carnation tissue cultures under different ventilation conditions*. Plant Growth Regulation 33 (237-243)
- Davis, M.J., Baker, R., Hanan, J.J. (1977): *Clonal multiplication of carnation by micropropagation*. Journal of American Society for Horticultural Science 102 (48-53)
- Diaz-Perez, J.C., Shackel, K.A., Sutter, E.G. (1995): *Effects of in vitro-formed roots and acclimatization on water status and gas exchange of tissue-cultured apple shoots*, Journal of the American Society for Horticultural Science 120 (3) (435-440)
- Djukic, M., Grbic, M., Djunisijevic-Bojovic, D., & Skocajic, D. (2007): *Influence of plant hormones on seed germination of woody ornamentals*. Fifth International Conference "Propagation of Ornamental Plants" Book of abstracts, Sofia (103)
- Dole, J.M., Wilkins, H.F. (2004): *Floriculture*, Principles and Species. 2nd Ed. Pearson Prentice Hall, New Jersey
- Ђукић, М. (1983): *Утицај биорегулатора на клијање семена бреже (Betula pendula Roth)*. Glasnik Šumarskog fakulteta 60 (A), Univerzitet u Beogradu - Šumarski fakultet, Beograd (89-97)
- Ђукић, М. (1984): *Утицај неких регулатора на раст и развој клијавца бреже (Betula pendula Roth) potomstva istog stabla*. Glasnik Šumarskog fakulteta 62 (A), Univerzitet u Beogradu - Šumarski fakultet, Beograd (120-130)

- Đukić, M. (1985): *Uticaj giberelina i auksina na rast potomstava različitih genotipova breze (Betula pendula Roth)*. Glasnik Šumarskog fakulteta 64 (A), Univerzitet u Beogradu - Šumarski fakultet, Beograd (359-366)
- Đukić, M. (1987): *Upotreba i značaj regulatora rastenja u proizvodnji šumskih i ukrasnih sadnica*. Zbornik sažetaka priopćenja III Kongresa Biologa Hrvatske sa međunarodnim učešćem, Mali Lošinj, Hrvatska (92-93)
- Đunisijević, D., Đukić, M., Skočajić, D., Grbić, M. (2006): *Effect of kinetin, BA, TDZ and CPPU on sycamore heteroblastic seed germination*. XV FESPB Congress Federation of European Societies of Plant Biology, Book of abstracts, Lyon – France: HOR01 (016)
- Đunisijević, D., Grubišić D., Đukić, M., Grbić, M., & Skočajić, D. (2005): *Efekat sintetičkog citokinina – CPPU i drugih regulatora rastenja na klijanje heteroblastičnih semena javora (Acer pseudoplatanus L.)*. XVI simpozijum Društva za fiziologiju biljaka SCG. Program i izvodi saopštenja, Bajina Bašta (42)
- Earle, E.D., Langhans, R.W. (1975): *Carnation propagation from shoot tips cultured in liquid medium*. HortScience 10 (608–610)
- Fal, M.A., Majada, J.P., González, A., Tamés R.S. (1999): *Differences between Dianthus caryophyllus L. cultivar in in vitro growth and morphogenesis are related to their ethylene production*. Plant Growth Regulation 27 (2) (131-136)
- Fraga, M., Mertxe, A., Ellul, P., Borja, M. (2004): *Micropropagation of Dianthus gratianopolitanus*, Hort. Science 39 (4) (112-115)
- Frey, L., Janick, J. (1991): *Organogenesis in carnation*. Journal of the American Society for Horticultural Science 116 (1108-1112)
- Garrido, G., Cano, E.A., Arnao, M.B., Acosta, M., Sanchez-Bravo, J. (1996): *Influence of cold storage period and auxin treatment on the subsequent rooting of carnation cuttings*, Scientia Horticulturae 65 (73-84)
- Garrido, G., Guerrero, J.R., Cano, E.A., Acosta, M., Sánchez-Bravo, J. (2002): *Origin and basipetal transport of the IAA responsible for rooting of carnation cuttings*. Physiologia Plantarum 114 (2) (303-312)
- Gharbia, H.D., Atheel, N.Y., Mobasher, O. (2008): *Clonal propagation of Dianthus caryophyllus L. through tissues culture*. Journal of Duhok University 12 (1) (91-95)
- Gimelli, F., Ginatta, G., Ventura, R., Positano, S. and Buiatti, M. (1984): *Plantlet regeneration from petals and floral induction "in vitro" in the Mediterranean carnation (Dianthus caryophyllus L.)*. Rivista dell'ortoflorofrutticoltura italiana, 68 (107-121)
- Grbić M., Skočajić D., Đukić M., Đunisijević-Bojović D., Obratov-Petković D., Bjedov I. (2012): *Ožiljavanje reznica zelkove kao alternativne neinvazivne vrste „QUICK-DIP” i kontakt metodom*, Glasnik Šumarskog fakulteta 105, Univerzitet u Beogradu - Šumarski fakultet, Beograd (51-60), DOI:10.2298/GSF1205051G
- Grbić, M. (1988): *Razmnožavanje bukve (Fagus moesiaca (Maly) Czechtott) i kitnjaka (Quercus sessilis Ehrh.) IN VITRO kao osnove za intenziviranje naučnoistraživačkog rada i proizvodnje sadnica željenih osobina*. Propadanje šumskih ekosistema - uzroci, posledice i mere (II sveska), Igman, (66-71)
- Grbić, M. (1992): *Unapređenje rasadničke proizvodnje nekih brestova (Ulmus L.) autovegetativnim metodama razmnožavanja*. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu - Šumarski fakultet, Beograd.

- Grbić, M. (1996): *Specifičnost bioloških osobina sadnog materijala za potrebe uređenja prirodnih predela*. Ured. Lješević, M., Dabić, D., Planiranje i uređenje predela. Udruženje urbanista Srbije, Beograd (117-121)
- Grbić, M. (2003): *Dormantnost i klijanje semena - mehanizmi, klasifikacije i postupci*. Glasnik Šumarskog fakulteta 87, Univerzitet u Beogradu - Šumarski fakultet, Beograd (25 - 49)
- Grbić, M. (2004): *Vegetativno razmnožavanje ukrasnog drveća i žbunja*. I.P. "Tragovi", I.K.P. "Ne&Bo", Beograd.
- Grbić, M., Nikolić, A., Skočajić, D., Đukić, M., D., & Đunisijević, D. (2005): *Uticaj gibberelinske kiseline na klijanje semena Chionanthus virginicus L.* Glasnik Šumarskog fakulteta 91, Univerzitet u Beogradu - Šumarski fakultet, Beograd (89-96)
- Halmagyi, A., Lambardi, M. (2007): *Cryopreservation of carnation (Dianthus caryophyllus L.) using different approaches*. International Scientific Conference, Propagation of Ornamental Plants, Sofia, Bulgaria (35)
- Hartmann, T.H., Kester, E.D., Davies, T.F. (1990): *Plant Propagation - Principles and Practices*. Prentice Hall International Inc., London, UK
- Hitchmough, J. (2008): *New approaches to ecologically based, designed urban plant communities in Britain: do these have any relevance in the United States?* Cities and the Environment 1 (2) (1-15)
- Ilahi, I., Aziz, F., Jabeen, M. (1995): *Tissue culture studies for micropropagation of carnation (Dianthus caryophyllus L.)*. Pakistan Journal of Botany 27 (2) (411-415)
- Jain, A., Kantia, A., Kothari, S.L. (2001): *De novo differentiation of shoot buds from leaf callus of Dianthus caryophyllus L. and control of hyperhydricity*. Scientia Horticulturae 87 (319-326)
- Jethwani, V., Kothari, S.L. (1993): *Micropropagation of Dianthus barbatus and D. chinensis through cotyledonary node culture*. Plant Tissue Culture 2 (91-96)
- Jethwani, V., Kothari, S.L. (1996): *Phenylacetic acid induced organogenesis in cultured leaf segments of Dianthus chinensis*. Plant Cell Reports 15 (869-872)
- Jethwani, V., Sharma, V.K., Kothari, S.L. (1994): *Micropropagation of Dianthus chinensis and Dianthus barbatus through shoot tip culture*. Journal of Indian Botanical Society 73 (357-358)
- Kallak H., Reidla M., Hilpus I., Virumae K. (1997): *Effects of genotype, explant source and growth regulators on organogenesis in carnation callus*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 51 (127-135)
- Kantia, A., Kothari, S.L. (2002): *High efficiency adventitious shoot bud formation and plant regeneration from leaf explants of Dianthus chinensis L.* Scientia Horticulturae 96 (205-212)
- Kanwar J. K., Kumar S. (2009): *Influence of growth regulators and explants on shoot regeneration in carnation*. Horticultural Science 36(4) (140-146)
- Kharrazi, M., Nemati, H., Tehranifar, A., Bagheri, A., Sharifi, A. (2011): *In vitro culture of carnation (Dianthus caryophyllus L.) focusing on the problem of vitrification*. Journal of Biological & Environmental Sciences 1(13) (159-164)
- Khawar, Kh.M., Ozel, C.A., Arslan, O. (2007): *In vitro axenic culture of Turkish Sweet William (Dianthus barbatus L.) using shoot meristem and first axillary node*. International Scientific Conference, Propagation of Ornamental Plants, Sofia, Bulgaria (90)

- Kozomara, B., Vinterhalter, B., Skočajić, D., Grbić, M., & Radojević, Lj. (2003): *Veg-etativno razmnožavanje Chimonanthus praecox L. ožiljavanjem reznica i kulturom izdanaka in vitro*. XV simpozijum Jugoslovenskog društva za fiziologiju biljaka. Program i izvodi saopštenja, Vrdnik (68)
- Kuzmičić, I., Jug-Dujaković, M. (1986): *Praktični aspekti kulture tkiva u cvjećarstvu*. U: Teorijski i praktični aspekti kulture tkiva biljaka, str. 92-105. Jugoslovensko društvo za fiziologiju biljaka.
- Lubomski, M., Jerzy, M. (1989): *In vitro propagation of pot carnation from the stem inter-nodes*. Acta Horticulturae 251 (235-240)
- Majada, J.P., Centeno, M.L., Feito, I., Fernández, B., Sanchez-Tames, R. (1998): *Sto-matal and cuticular traits on carnation tissue culture under different ventilation conditions*. Plant Growth Regulation 25 (2) (113-121)
- Majada, J.P., Tadeo, F., Fal, M.A., Sánchez-Tamés, R. (2000): *Impact of culture vessel ven-tilation on the anatomy and morphology of micropropagated carnation*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 63 (3) (207-214)
- Marković M., Grbić M., Skočajić D., Đunisijević - Bojović D. (2007): *Uticaj ba-lansa fitohormona na multiplikaciju izdanaka i ožiljavanje vrste Dianthus sero-tinus Waldst. & Kit.*, Glasnik Šumarskog fakulteta 95, Univerzitet u Beogradu - Šumarski fakultet Beograd (83-94)
- Marković M., Popović M. (2012a): *Uticaj tipa eksplanta, sastava hranljive podloge i supstra-ta na ožiljavanje i aklimatizaciju vrste Dianthus deltoides L.*, Glasnik Šumarskog fakulteta 105, Univerzitet u Beogradu - Šumarski fakultet, Beograd (117-126)
- Marković M., Popović M. (2012b): *Germination of Dianthus deltoides L. and Dianthus pinifo-lius Sibth. & Sm. in ex vitro and in vitro conditions*. International Scientific Confer-ence: Forestry Science and Practice for the Purpose of Sustainable Development of Forestry, *Seed husbandry, nursery, reforestation and urban forests. Forest educa-tion*. 1 - 4th November, 2012, Banja Luka, Republic of Srpska/B&H.
- Marković M., Popović M. (2012c): *Propagation of Protected Magnolia x soulangeana Soul.-Bod. "Lennei" Trees by Softwood Cuttings*. ISC: Forestry Science and Practice for the Purpose of Sustainable Development of Forestry, *Seed husbandry, nursery, reforestation and urban forests. Forest education*. 1 - 4th November, 2012, Banja Luka, Republic of Srpska.
- Marković, M. (2008): *Mogućnost razmnožavanja vrste Dianthus deltoides L. metodom mik-ropropagacije*, magistarski rad, Univerzitet u Beogradu - Šumarski fakultet, Beograd.
- Marković, M., Grbić, M., Šindelić, A. (2006): *Mogućnost mikropropagacije Dianthus gi-ganteiformis ssp. kladovanus (Degen) Soo metodom proliferacije bočnih izdana-ka*. Glasnik Šumarskog fakulteta 94, Univerzitet u Beogradu - Šumarski fakultet, Beograd (171-179)
- Marković, M., Tanasić, M., Stojić, N., Bulatović, R., Jović, M., Vidojković, S., Stan-ković, D. (2012): *Unapređenje protokola za mikropropagaciju Phalaenopsis sp. direktnom regeneracijom izdanaka iz nodusnih reznica*, Glasnik Šumarskog fakulteta 106, Univerzitet u Beogradu - Šumarski fakultet, Beograd.(141-150), DOI: 10.2298/GSF1206141M
- McClelland, M.T. (1990): *The effects of in vitro and ex vitro root initiation on subsequent mi-crocutting root quality in three woody plants*. Plant Cell Tissue Organ Cult. 23 (115-123)

- Messeguer, J., Arconada, M.C., Mele, E. (1993): *Adventitious shoot regeneration in carnation (Dianthus caryophyllus L.)* Scientia Horticulturae 54 (153-163)
- Mijanović, O. (1979): *Cvečarstvo II deo*, Cvetne kulture za uzgoj na otvorenom polju, Univerzitet u Beogradu - Šumarski fakultet Beograd, Beograd.
- Miller, R.M., Kaul, V., Hutchinson, J.F., Richards, D. (1991): *Adventitious shoot regeneration in carnation (Dianthus caryophyllus L.) from axillary bud explants*. Annals of Botany 67 (35-42)
- Montes, S., Ramírez, L., Hernández, M.M., Santana, N., Martínez, D.L. (1997) *Varietal micropropagation of carnation (Dianthus caryophyllus L. i Dianthus plumarius L.) through meristem culture*. Cultivos Tropicales 18 (1) (7581)
- Murashige T, Skoog F. 1962. *A revised medium for growth and bioassays with tobacco tissue culture*. Physiologia Plantarum 15 (473–497)
- Nakano, M., Hoshino, Y., Mii, M. 1994. *Adventitious shoot regeneration from cultured petal explants of carnation*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 36 (15-19)
- Nakano, M., Mii, M. 1992. *Protoplast culture and plant regeneration of several species in genus Dianthus*. Plant Cell Reports 11 (225-228)
- Nakano, M., Mii, M., 1993a. *Somatic hybridization between Dianthus chinensis and Dianthus barbatus through protoplast fusion*. Theoretical and Applied Genetics 86 (1–5)
- Nakano, M., Mii, M., 1993b. *Interspecific somatic hybridization in Dianthus: selection of hybrids by the use of iodoacetamide inactivation and regeneration ability*. Plant Science 88 (203–208)
- Nau, J. (1996): *Ball perennial manual: Propagation and production*. Ball Publishing Co., Batavia, Illinois.
- Nešković, M. (1986): *Značaj kulture tkiva i ćelija u oplemenjivanju biljaka*. U: Teorijski i praktični aspekti kulture tkiva biljaka, str. 3-20. Jugoslovensko društvo za fiziologiju biljaka.
- Nešković, M., Konjević, R., Čulafić, L.J. (2003): *Fiziologija biljaka*. NNK - International, Beograd.
- Nugent, G., Wardley, R.T., Lu, C. (1991): *Plant regeneration from stem and petal of carnation (Dianthus caryophyllus L.)*. Plant Cell Reports 10 (477-480)
- Obratov-Petković D., Bjedov I., Skočajić D., Đunisijević-Bojović D., Đukić M., Grbić M. (2011): *Asteretum lanceolati - Ksenospontana zajednica na vlažnim i priobalnim staništima*, Glasnik Šumarskog fakulteta 103, Univerzitet u Beogradu - Šumarski fakultet, Beograd (73-92), DOI:10.2298/GSF1103073O
- Pareek, A., Kantia, A., Kothari, S.L. (2004): *In vitro cloning of ornamental species of Dianthus*. Indian Journal of Biotechnology 3 (263-266)
- Pareek, A., Kothari, S.L. (2003): *Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf cultures of ornamental species of Dianthus*. Scientia Horticulturae 98 (449-459)
- Pareek, A., Pareek, L.K. (2005): *De-novo differentiation of shoots of Dianthus barbatus from callus cultures*. Journal of Cell and Tissue Research 5 (327-329)
- Pence, V.C. (1999): *The application of biotechnology for the conservation of endangered plants, Chapter 15*. In: Benson EE (ed) Plant Conservation Biotechnology, Taylor and Francis, London (227–241)
- Petru, E., Landa, Z. (1974): *Organogenesis in isolated carnation plant callus tissue cultivated in vitro*. Biologia Plantarum 16 (450-453)

- Petru, E., Landa, Z. (1974): *Organogenesis in isolated carnation plant callus tissue cultivated in vitro*. *Biologia Plantarum* 16 (450-453)
- Pierik, R.L.M. (1987): *In Vitro Culture of Higher Plants*. Martinus Nijhoff Publishers.
- Popović M., Grbić M., Marković M. (2008): *Razmnožavanje Dianthus deltoides L. kulturom izdanaka*, Glasnik Šumarskog fakulteta 97, Univerzitet u Beogradu - Šumarski fakultet, Beograd (209-219)
- Popović M., Marković M. (2012): *Analiza asortimana perena u cvetnjacima beogradskih parkova sa posebnim osvrtom na invazivne taksone*, Glasnik Šumarskog fakulteta 106, Univerzitet u Beogradu - Šumarski fakultet, Beograd (169-182)
- Popović M., Marković M., Mihailović, B., Milutinović, J. (2012): *Floristic Analysis of Decorative Plant Species on Flowerbeds Planted on the Mt. Zlatibor with Special Attention on Invasiveness of the Recorded Species*. ISC: Forestry Science and Practice for the Purpose of Sustainable Development of Forestry, Forest ecology, climate change and biodiversity of forest ecosystems. 1 - 4th November, 2012, Banja Luka, Republic of Srpska.
- Pospisilova, J., Ticha, I., Kadlecěk, P., Haisel, D., Plzakova, S. 1999. *Acclimatization of micropropagated plants to ex vitro conditions*. *Biologia Plantarum* 42 (4) (481-497)
- Radojević, Lj., Đorđević, N., Petrović, J. 1990. *In vitro culture techniques for carnation breeding*. *Acta Horticulturae* 280 (163-168)
- Ringel nursery, 2012 http://www.ringelnursery.com/packing.asp?item_id=7 (pristupljeno 2012)
- Roest, S., Bokelmann, G.S. (1981): *Vegetative propagation of carnation in vitro through multiple shoot development*. *Scientia Horticulturae* 14 (357-366)
- Saher, S., Piqueras, A., Eladio, H., Olmos, E. (2004): *Hyperhidricity in micropropagated carnation shoots: the role of oxidative stress*. *Physiologia Plantarum* 120 (152-161)
- Salehi, H. (2005): *Can a general shoot proliferation and rooting medium be used for a number of carnation cultivars?* *African Journal of Biotechnology* 5(1) (25-30)
- Sato, S., Katoh, N., Yoshida, H., Iwai, S., Hagimori, M. (2000): *Production of doubled haploid plants of carnation (Dianthus caryophyllus L.) by pseudofertilized ovule culture*. *Scientia Horticulturae* 83 (301-310)
- Sayed Hassan, A.K.M., Munshi, J.L., Sultana, R., Jahan, M.A.A., Khatun, R. (2011): *High frequency in vitro regeneration of Dianthus caryophyllus L., a herbaceous perennial ornamental plant*. *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research* 46(4) (495-498) DOI: <http://dx.doi.org/10.3329/bjsir.v46i4.9597>
- Skoog F., Miller C. O. (1957): *Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro In: Biological action of growth substances*. XI Symposium of the Society of Experimental Biology, Cambridge University Press, 11 (118-131)
- Stone, O.M. (1963): *Factors affecting the growth of carnation plants from shoots apices*. *Annals of Applied Biology* 52 (199-209)
- Suslow, T.V., Thomas B.R., Bradford K.J. (2002): *Biotechnology provides new tools for plant breeding*. University of California, Division of Agriculture and Natural Resources, Agricultural Biotechnology in California Series, Publication 8043. <http://anrcatalog.ucdavis.edu>
- Tomićević J., Grbić M., Skočajić D., Radovanović D. (2012): *Stav javnosti grada Beograda o stranim invazivnim drvenastim vrstama*, Glasnik Šumarskog fakulteta 105, Univerzitet u Beogradu - Šumarski fakultet, Beograd (189-204)

- Valassi, I.N., Economou, A.S., Tsafaris, A.S. (2003): *Rooting and acclimatization in transgenic carnation microplants*. ISHS Acta Horticulturae 616: I International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants.
- Vinterhalter, D., Vinterhalter, B. (1996): *Kultura in vitro i mikropropagacija biljaka*, Axial P.O., Beograd.
- Watad, A.A., Ahroni, A., Zuker, A., Shejtman, H., Nissim, A., Vainstein, A. (1996): *Adventitious shoot formation from carnation stem segments: a comparison of different culture procedures*. Scientia Horticulturae 65 (313-320)
- Yadav Manoj, K., Gaur, A.K., Garg, G.K. (2003): *Development of suitable protocol to overcome hyperhydricity in carnation during micropropagation*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 72 (2) (153-156)

Marija Marković
Mihailo Grbić
Matilda Đukić

THE USE OF IN VITRO CULTURE IN DIANTHUS PROPAGATION

Summary

This paper is a survey of authors' studies and the literature regarding plant propagation using the methods of *in vitro* culture. The classifications of different methods of *in vitro* culture are presented, as well as the propagation phases. In addition, the advantages of tissue culture, including the application of meristem culture for obtaining the disease-free plants, are presented.

Special attention is paid to the propagation of *Dianthus* taxa. The most important commercially exploited *Dianthus* species is *D. caryophyllus* which is today primarily produced by tissue culture. For that reason, review of the research studies regarding the tissue culture of this species is presented in detail. In addition, the achievements in tissue culture of some other important *Dianthus* species (*D. barbatus*, *D. cinensis*, *D. plumarius*, etc.) are described.

Besides the detailed and useful information on the propagation of ornamental *Dianthus* species, in this study the importance and advantages of different methods of tissue culture in the production of *Dianthus* taxa are presented, thus indicating the direction of some future research in this field that will improve the applicability of the propagation by tissue culture.