

Marković M., Grbić M., Đukić M. 2014. *Effect of sugar alcohol sorbitol on in vitro shoot development of Dianthus serotinus Waldst. et Kit.* Bulletin of the Faculty of Forestry 109: 113-124.

Марија Марковић
Михаило Грбић
Матилда Ђукић

UDK: 635.9.012:582.661.51
UDK: 58.085.2:581.165.7:582.661.51
Оригинални научни рад
DOI: 10.2298/GSF1409113M

УТИЦАЈ ШЕЋЕРНОГ АЛКОХОЛА СОРБИТОЛА НА РАЗВОЈ ИЗДАНАКА *DIANTHUS SEROTINUS* WALDST. ET KIT. У КУЛТУРИ *IN VITRO*

Извод: Циљ спроведених истраживања је био да се испита дејство различитих концентрација сорбитола на развој изданака *Dianthus serotinus* у фази мултипликације, у култури *in vitro*. Добијени резултати су показали да се дејство сорбитола разликује зависно од коришћене концентрације, као и од типа експланта, али да генерално посматрајући има позитиван ефекат. Присуство сорбитола у подлози је имало утицаја на промену рН вредности медијума након аутоклавирања и након гајења култура, што је могло да утиче на доступност поједних јона у подлози. Такође, добијени резултати указују на то да би сорбитол могао да се користи и као извор енергије приликом микропропагације ове врсте, што је потребно додатно истражити.

Кључне речи: микропропагација, *Dianthus serotinus*, сорбитол

EFFECT OF SUGAR ALCOHOL SORBITOL ON *IN VITRO* SHOOT DEVELOPMENT OF *DIANTHUS SEROTINUS* WALDST. ET KIT.

Abstract: The aim of this study was to investigate the effect of different concentrations of sorbitol on the development of the *in vitro* culture of *D. serotinus* in the multiplication phase. The obtained results showed that sorbitol generally had a positive effect, depending on its concentration and explant type. In addition, the presence of sorbitol affected the change of pH value of the media after autoclaving and after 25 days of *in vitro* culture, which could affect the availability of certain ions to plants. Therefore, the obtained results indicate that sorbitol can be used as an energy source for the *in vitro* culture of *D. serotinus*, but this should be further investigated.

Key words: micropropagation, *Dianthus serotinus*, sorbitol

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

Dianthus serotinus је једна од шест врста каранфила који су сврстани у IUCN (The International Union for Conservation of Nature) црвену листу флоре, где се налази у категорији рањивог (V) таксона (Вожа, 1999, Bilz, 2011). То је панонски ендемит, увршћен на листу Црвене књиге флоре Србије као крајње угрожен таксон и заштићен законом („Закон о заштити животне средине”, СГ РС бр. 66/91, 83/92 и 50/93; „Правилник о проглашењу и заштити строго заштићених и заштићених дивљих врста биљака, животиња и гљива”, СГ РС, бр. 5/2010 и 47/2011). *D. serotinus* је декоративна вишегодишња биљка, дугог периода цветања, пријатног мириса цветова, која добро успева на сиромашним земљиштима и отпорна је на сушу, због чега се може примењивати у хортикултури, посебно на песковитим земљиштима (Гајић, 1986, Вожа, 1999).

Због свега наведеног, током протеклих година спроведена су истраживања која су се бавила оптимизацијом протокола за микропропагацију ове врсте (Marković *et al.*, 2007, Marković *et al.*, 2013), методе која има значајну примену за брзо и ефикасно размножавање угрожених таксона (Pence, 1999). Тада је испитано дејство различитих фактора на развој и мултипликацију изданака *D. serotinus*, међу којима су: концентрација MS соли (Murashige i Skoog, 1962), концентрације ВАР (6-бензил-аминопурин) и NAA (α -нафтил-сирћетна киселина), рН вредност хранљиве подлоге, дејство различитих врста и концентрација шећера (сахароза, декстроза и фруктоза).

Додавање шећера у подлогу има посебан значај, пре свега као извор енергије и угљеника, али и као осмотски агенс. Иако је сахароза најзначајнији, а уједно и најчешће коришћен шећер, у медијум се могу додавати и други шећери: глукоза, малтоза, лактоза или фруктоза (Thogre *et al.*, 2008). Поред шећера, у подлогу се могу додавати и шећерни алкохоли (полиоли, полихидроксилни алкохоли) који обично не могу да буду метаболисани и због тога се често не могу користити као извор угљеника, али зато имају осмотску функцију модификујући водни потенцијал медијума. Међутим, алкохол сорбитол поједине врсте успешно усвајају и метаболишу. На пример, Thogre *et al.* (2008) наводе да додавање сорбитола у подлогу позитивно утиче на раст калуса јабуке, као и на раст изданака у култури *in vitro* неких врста из фамилије *Rosaceae*.

Додавање сорбитола у медијум има значаја у индукцији калуса, култури ћелија и протопласта, а пре свега за индукцију соматске ембриогенезе (Benkigane *et al.*, 2000, Rashid *et al.*, 2002, Hassan *et al.*, 2009), али се његово дејство разликује зависно од испитиване врсте и док се у неким случајевима (ембриогени калус кукуруза, нпр.) може користити чак и као једини извор угљеника, уз потпуно изостављање шећера у медијуму (Swedlund, Лосу, 1993), у другим ситуацијама (нпр. ембриогенеза код *Theobroma cacao* L.) нема никаквог ефекта (Traore, Guiltinan, 2006). Поред значаја у индукцији соматске ембриогенезе, сорбитол може имати позитивно дејство у микропропагацији неких врста (Magino *et al.*, 1991, 1993, Pua,

Chong, 1983, 1985). На пример, приликом микропропагације *Pyrus pyrifolia* Nak. 'Hosui' пролиферација бочних избојака била је најбоља на подлози са сорбитолом (у поређењу са подлогама са сахарозом, фруктозом, лактозом, декстрозом, малтозом и манитолом), а додавање сорбитола је имало позитивног ефекта и на ожиљавање изданака овог култивара (Kadota i Niimi, 2004). Такође, сорбитол је значајан криопротектант (Vasil, Thorpe, 1994).

Циљ овог рада је био да се испита дејство различитих концентрација сорбитола на развој изданака *D. serotinus* у фази мултипликације, имајући у виду специфично дејство и значај сорбитола, као и чињеницу да његово дејство на развој изданака у култури *in vitro* до сада није испитивано код врста из рода *Dianthus*, једино је коришћен у процесу криопрезервације врхова изданака *D. caryophyllus* L. (Uemura, Sakai, 1980). С обзиром на то да сорбитол може, а и не мора да буде метаболисан у култури *in vitro*, у овом експерименту у подлогу је додат са фруктозом - шећером који је према истраживањима Marković *et al.* (2013) имао најслабији ефекат на развој изданака *D. serotinus*.

Такође, имајући у виду да више концентрације шећера снижавају рН вредност подлоге (Thorpe *et al.*, 2008), извршена су мерења рН вредности подлога након аутоклавирања, као и после 25 дана гајења експланата у култури *in vitro*, јер биљке селективним усвајањем минералних соли из подлоге такође могу мењати рН вредност.

2. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА

Током истраживања коришћена су три типа експланата: једноодусне резнице, терминални пупољци и вршне резнице са једним апикалним и два аксиларна пупољка. Експланати су узети са изданака гајених у култури *in vitro* која је постављена на начин приказан у раду Marković *et al.* (2013). Коришћена је основна MS₀ подлога која је садржала MS неорганске и органске компоненте (Murashige, Skoog, 1962), агар (8 gL⁻¹) и по 0,5 mgL⁻¹ ВАР и NAA. За испитивање утицаја сорбитола на развој изданака *D. serotinus* у основну подлогу је додата мешавина фруктозе и сорбитола (50%:50%) у концентрацији 10 -70 gL⁻¹. За утврђивање промене рН вредности после аутоклавирања, као и након 25 дана гајења експланата, у основну MS₀ подлогу додати су сахароза, декстроза, фруктоза или мешавина фруктозе и сорбитола, у концентрацијама 10-70 gL⁻¹.

Пре аутоклавирања на температури од 121°C у трајању од 20 минута, рН вредност подлоге је подешена на 6,3 додавањем 0,1 N HCl и 0,1 N NaOH. Медијум је разливен у стаклене посуде димензија 5 x 5 x 13 cm, посуде су садржале по 25 mL⁻¹ медијума и у сваку је било постављено по 5 експланата истог типа. Експерименти су поновљени 3 пута, са по 20 експланата по третману.

Културе су гајене у условима дугог дана (16 h светла и 8 h мрака), при температури T= 25° ± 2°C. Коришћене су флуоресцентне беле цеви „Тесла” – Панчево, са густином фотонског флукса 50 μmol m⁻²s⁻¹.

Стање културе утврђено је 25. дана гајења када су извршена мерења следећих параметара: број изданака по експланту, број нодуса, дужина изданака. Добијени подаци су статистички обрађени коришћењем програма Statgraphics. Значајност разлика између средњих вредности утврђена је анализом варијансе (ANOVA), при нивоу значајности $p < 0.05$, као и методом најмање значајне разлике (LSD). Током статистичке анализе, за резултате приказане у процентима извршена је arcsin трансформација података чиме се добијају вредности које имају нормалну расподелу, а након статистичке обраде, добијене вредности су поново претворене у проценте како би се приказали у табелама.

3. РЕЗУЛТАТИ

Процент експланата који су регенерисали правилно развијене изданке разликовао се зависно од састава подлоге и типа експланата. Највећи проценат регенерације био је код вршних резница и кретао се од 35% до 73,3%, нешто мањи код терминалних пупољака (50-56,6%), а најнижи код нодусних резница (8,3-46,7%) (табела 1). Утицај концентрације сорбитола и фруктозе у подлози се различито испољио код различитих типова експланата. Тако код терминалних пупољака садржај фруктозе и сорбитола уопште није утицао на проценат регенерације јер су добијене разлике мале и нису статистички значајне. Нодусне резнице су се најбоље регенерисале са подлогама са 30-50 $g L^{-1}$ мешавине фруктозе и сорбитола, а код вршних резница значајно слабији резултати су били једино при високој концентрацији фруктозе и сорбитола (табела 1).

Табела 1. Регенерација изданака на подлогама са мешавином фруктозе и сорбитола
Table 1. Frequency of shoot regeneration on media supplemented with different concentrations of fructose and sorbitol

фруктоза + сорбитол fructose + sorbitol ($g L^{-1}$)	нодусне резнице single node cuttings	терминални пупољци shoot tips	вршне резнице shoots
10	18,3 ^b	55,0 ^a	73,3 ^a
30	46,7 ^a	56,6 ^a	66,7 ^a
50	41,6 ^a	51,6 ^a	70,0 ^a
70	8,3 ^b	50,0 ^a	35,0 ^b

Напомена / Note: Вредности које су означене истим словом се статистички значајно не разликују ($P < 0,05$) применом метода најмање значајне разлике / The values followed by different letters are significantly different at the $P < 0.05$ level according to the LSD test

Концентрација мешавине сорбитола и фруктозе у медијуму утицала је на просечан број изданака по експланту, најповољнијом се показала концентрација од 30 $g L^{-1}$ код сва три типа експланата (просечно 2,9-3,8 изданака). Разлике у просечном броју изданака између нодусних резница, вршних резница и терминалних пупољака на подлогама истог састава су биле незнатне (табела 2).

Табела 2. Просечан број изданака по експланту на подлогама са мешавином фруктозе и сорбитола

Table 2. Average number of shoots per explant on media with a mixture of fructose and sorbitol

фруктоза + сорбитол fructose + sorbitol (gL^{-1})	нодусне резнице single node cuttings	терминални пупољци shoot tips	вршне резнице shoots
10	1,3 ^b	1,1 ^b	1,3 ^c
30	3,1 ^a	2,9 ^a	3,8 ^a
50	1,6 ^b	1,7 ^b	2,4 ^b
70	1,5 ^b	2,3 ^a	1,7 ^c

Напомена / Note: Вредности које су означене истим словом се статистички значајно не разликују ($P < 0,05$) применом метода најмање значајне разлике / The values followed by different letters are significantly different at the $P < 0.05$ level according to the LSD test

Подлоге на којима се регенерисао мали број правилно развијених изданака, углавном су биле неповољне и за развој тих изданака. Тако, на подлози са $70 gL^{-1}$ мешавине фруктозе и сорбитола је свега 8,3% постављених нодусних резница регенерисало правилно развијене изданке (табела 1), а при том су и сви ти изданци били краћи од $10 mm$ (табела 3). Међутим, код свих типова експланата, на подлози са $10 gL^{-1}$ мешавине фруктозе и сорбитола формирали су се дужи изданци него на подлози са $50 gL^{-1}$ фруктозе и сорбитола (табела 3), на којој је проценат регенерације био виши (табела 1).

Табела 3. Дужина изданака *D. serotinus* на подлогама са мешавином фруктозе и сорбитола

Table 3. The length of shoots of *D. serotinus* on media with a mixture of fructose and sorbitol

F + S*	nodusne reznice single node cuttings			terminalni pupoljci shoot tips			vršne reznice shoots		
	<10 mm (%)	10-20 mm (%)	>20 mm (%)	<10 mm (%)	10-20 mm (%)	>20 mm (%)	<10 mm (%)	10-20 mm (%)	>20 mm (%)
10	34,8 ^d	65,2 ^b	0,0 ^a	81,4 ^b	12,9 ^b	5,7 ^a	5,1 ^b	70,5 ^a	24,4 ^a
30	18,9 ^{de}	81,1 ^a	0,0 ^a	53,8 ^c	46,2 ^a	0,0 ^b	14,7 ^a	55,6 ^b	29,7 ^a
50	90,5 ^b	9,5 ^c	0,0 ^a	84,1 ^{ab}	15,9 ^b	0,0 ^b	18,8 ^a	59,1 ^b	22,1 ^a
70	100,0 ^a	0,0 ^d	0,0 ^a	90,5 ^a	9,5 ^c	0,0 ^b	15,3 ^a	78,9 ^a	5,8 ^b

Легенда / Legend: *(F + S) - мешавина фруктозе и сорбитола / a mixture of fructose and sorbitol

Напомена / Note: Вредности које су означене истим словом се статистички значајно не разликују ($P < 0,05$) применом метода најмање значајне разлике / The values followed by different letters are significantly different at the $P < 0.05$ level according to the LSD test

Просечан број нодуса, слично као и просечан број изданака по експланту, био је највиши на подлогама са $30 gL^{-1}$ мешавине фруктозе и сорбитола (3,9-4,5), а разлике између коришћених типова експланата су биле мале (табела 4). Сувише

ниске и сувише високе концентрације мешавине фруктозе и сорбитола (10 gL^{-1} , 70 gL^{-1}) имале су неповољан ефекат на развој изданака, па је и просечан број формираних нодуса био низак, од 1,3 до 2,3 (табела 4).

Табела 4. Просечан број нодуса *D. serotinus* по експланту на подлогама са мешавином фруктозе и сорбитола

Table 4. Average number of nodes per explant on media with a mixture of fructose and sorbitol

fruktoza + sorbitol fructose + sorbitol (gL^{-1})	nodusne reznice single node cuttings	terminalni pupoljci shoot tips	vršne reznice shoots
10	1,3 ^c	1,5 ^c	1,7 ^c
30	4,5 ^a	3,9 ^a	4,2 ^a
50	3,3 ^{ab}	2,5 ^{bc}	2,7 ^b
70	2,3 ^b	2,1 ^{bc}	1,8 ^c

Напомена / Note: Вредности које су означене истим словом се статистички значајно не разликују ($P < 0,05$) применом метода најмање значајне разлике / The values followed by different letters are significantly different at the $P < 0.05$ level according to the LSD test

Табела 5. Промена pH вредности MS_0 подлоге са различитим садржајем шећера

Table 5. Change of pH value of MS_0 media supplemented with a different carbohydrate source

vrsta šećera carbohydrate source	koncentracija concentration gL^{-1}	pH pre autoklaviranja pH before autoclaving	pH nakon autoklaviranja pH after autoclaving	pH nakon 25 dana gajenja kulture in vitro pH after 25 days of in vitro culture
saharoza sucrose	10	6,3	5,6	4,8
	30	6,3	5,5	5,1
	50	6,3	5,3	4,9
	70	6,3	5,0	4,8
dekstroza glycose	10	6,3	5,4	4,5
	30	6,3	4,9	4,7
	50	6,3	4,8	4,5
	70	6,3	4,4	4,4
fruktoza fructose	10	6,3	4,2	4,3
	30	6,3	3,8	4,2
	50	6,3	3,7	3,9
	70	6,3	3,5	3,6
fruktoza+sorbitol fructose+sorbitol	10	6,3	4,9	4,3
	30	6,3	4,8	4,4
	50	6,3	4,4	4,2
	70	6,3	4,3	4,2

Приликом испитивања промене рН вредности подлоге након аутоклавирања и након гајења културе *D. serotinus* констатовано је да су на промену киселости подлоге утицали и тип шећера и његова концентрација (табела 5). Подлоге са фруктозом су након аутоклавирања биле киселије (рН 3,5-4,2) од подлога које су садржале сахарозу (рН 5,0-5,6) или декстрозу (рН 4,4-5,4). Такође, што је већа концентрација шећера била у подлози, то је рН вредност више опала након аутоклавирања. Додавање сорбитола је утицало на мањи пад рН вредности након аутоклавирања. На пример, подлога са 70 gL^{-1} мешавине фруктозе и сорбитола, која садржи 35 gL^{-1} фруктозе имала је након аутоклавирања рН вредност вишу (4,3) него подлоге само са фруктозом (рН 3,5-4,2). Међутим, након гајења културе, код свих подлога само са фруктозом рН вредност је незнатно порасла, док је рН вредност подлога у које је додат и сорбитол опала.

4. ДИСКУСИЈА

Додавање шећерног алкохола сорбитола је имало различит утицај на развој изданака *D. serotinus*, зависно од типа експланта. На пример, код терминалних пупољака регенерација изданака није зависила од садржаја фруктозе и сорбитола и кретала се од 50% до 56,6%, при чему је садржај фруктозе у наведеним подлогама износио $5\text{-}35 \text{ gL}^{-1}$. Поредићи добијене резултате са резултатима које су добили Marković *et al.* (2013), уочава се да нема значајније разлике у регенерацији изданака између подлоге са 70 gL^{-1} мешавине фруктозе и сорбитола (35 gL^{-1} садржај фруктозе, регенерација 50%) и подлоге само са фруктозом (30 gL^{-1} , регенерација 48,3%). У том случају можемо сматрати да додавање сорбитола нема ефекта на регенерацију правилно развијених изданака.

Аналогно томе, аназирајући податак да је регенерација нодусних и вршних резница на подлози са 30 gL^{-1} фруктозе износила 48,3% и 41,7% (Marković *et al.*, 2013), а њихова регенерација на подлози са 70 gL^{-1} мешавине фруктозе и сорбитола свега 8,3% (нодусне резнице) и 35,0% (вршне резнице), можемо претпоставити да је додавање сорбитола имало неповољан ефекат на регенерацију изданака.

С друге стране, ако посматрамо проценат регенерације вршних резница на подлози са 30 gL^{-1} фруктозе (41,7%) и на подлози са 30 gL^{-1} комбинације фруктозе и сорбитола (66,7%), затим на подлогама са 10 gL^{-1} фруктозе (18,3%) и са 10 gL^{-1} комбинације фруктозе и сорбитола (73,3%) очигледан је позитиван ефекат додавања сорбитола у медијум који се у мањој мери манифестовао и код нодусних резница и терминалних пупољака.

Посматрајући остале мерене параметре: просечан број нодуса и изданака по експланту, уочава се да су најповољније вредности, без обзира на тип експланта, добијене на подлози са 30 gL^{-1} мешавине фруктозе и сорбитола, док су најповољнији резултати на подлогама само са фруктозом добијени при концентрацији фруктозе од 30 gL^{-1} (Marković *et al.*, 2013). Због тога можемо претпоставити да се додавањем сорбитола може на неки начин допунити или чак надокнадити дејство

фруктозе. Међутим, механизам самог деловања сорбитола се на основу добијених резултата не може са сигурношћу објаснити. Слаб развој изданака на подлогама са 10 gL^{-1} фруктозе који је забележен у раду *Marković et al.* (2013) је био очекиван јер се неповољно дејство ниже концентрације шећера може објаснити ограниченом фотосинтетичком активношћу у *in vitro* условима због чега је за правилан развој културе неопходно додавање извора угљеника у подлогу (*Thorpe et al.*, 2008). Ипак, високе концентрације шећера могу бити неповољне за развој култура (*Stojičić et al.*, 2008, *Marković et al.*, 2013, *Perić et al.*, 2012), при чему долази до инхибирања њиховог раста. Редукована деоба ћелија и уопште раст биљака може бити и последица високог осмотског притиска хранљиве подлоге, јер тада долази до отежаног усвајања воде из те подлоге (*Kozai i Kubota*, 2005, *Thorpe et al.*, 2008). Пошто је сорбитол значајан осмотски агенс, на тај начин би се могло објаснити неповољно дејство подлога са 70 gL^{-1} мешавине фруктозе и сорбитола.

Међутим, поставља се питање зашто је подлога са 30 gL^{-1} фруктозе и сорбитола била повољнија од подлоге са 30 gL^{-1} фруктозе (*Marković et al.*, 2013) и у том случају се може претпоставити да *D. serotinus* може да користи сорбитол и као извор енергије. Уопште, позитивно дејство сорбитола у микропропагацији појединих врста и култивара може бити последица присуства ензима сорбитол оксидазе или сорбитол дехидрогеназе којима се сорбитол преводи у декстрозу, односно у фруктозу, чиме се омогућује његово даље метаболисање (*Magino et al.*, 1991, *Kadota, Niimi*, 2004).

Не треба заборавити ни везу између концентрације и врсте шећера у медијуму и промене рН вредности. Од рН вредности зависи које соли ће бити растворене у подлози, а она утиче и на усвајање компоненти медијума, односно доступност појединих јона, као и на чврстоћу подлоге са агаром (*George, de Klerk*, 2008, *Machakova et al.*, 2008, *Thorpe et al.*, 2008). Треба истаћи и чињеницу да и сама биљка током култивисања може значајно променити рН подлоге на којој расте (*Skirvin et al.*, 1986), диференцијалним усвајањем азота у виду нитрата (NO_3^-) или амонијума (NH_4^+) што је условљено почетном рН вредношћу хранљиве подлоге (*Pasqua et al.*, 1991).

Ипак, и поред тога, треба имати у виду да дуготрајно гајење култура на подлогама само са сорбитолом (више узастопних субкултура) може довести до недостатка бора јер се у медијуму могу створити комплексна једињења која везују бор и чине га биљкама недоступним (*George, de Klerk*, 2008). С обзиром да бор утиче на ниво ендогене IAA и на њену транслокацију у биљкама, недостатак бора се манифестује задржавањем IAA на месту синтезе, због чега биљке имају слабо развијен коренов систем.

5. ЗАКЉУЧЦИ

Спроведена истраживања су показала да додавање сорбитола у медијум повољно утиче на развој култура *D. serotinus*, али се његово дејство разликује

зависно од коришћене концентрације, као и од типа експланта. Такво дејство сорбитола може бити последица његовог утицаја на промену водног потенцијала и рН вредности медијума, чиме се мења доступност поједних јона у подлози. Такође, добијени резултати указују на то да би сорбитол могао да се користи и као извор енергије приликом микропропагације ове врсте, што је потребно потврдити додатним детаљнијим истраживањима.

Напомена: Рад је финансиран од стране Министарства просвете и науке републике Србије у оквиру пројекта бр. 43007 за период 2011-2014.

ЛИТЕРАТУРА

- Benkirane, H., Sabounji, K., Chlyah, A., Chlyah, H. (2000): *Somatic embryogenesis and plant regeneration from fragments of immature inflorescences and coleoptiles of durum wheat*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 61 (107-113)
- Bilz M. (2011): *Dianthus serotinus*. »IUCN Red List of Threatened Species« <http://www.iucn-redlist.org/details/165217/0>
- Boža P. (1999): *Dianthus serotinus Waldst. & Kit.*, »Crvena knjiga flore Srbije«, ured. Stevanović V., Ministarstvo za životnu sredinu republike Srbije, Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, Zavod za zaštitu prirode Republike Srbije, Beograd, (252 – 254)
- Gajić M. (1986): *Flora i vegetacija Subotičko-horgoške peščare*, Šumarski fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd - Šumsko gazdinstvo, Subotica
- George E.F., de Klerk G.J. (2008): *The Components of Plant Tissue Culture Media I: Macro- and Micro-Nutrients*. »Plant Propagation by Tissue Culture, 3rd Edition«, ured. George E.F., Hall M.A., De Klerk D.J., Springer, AA Dordrecht, Netherlands, (65-114)
- Hassan, M.U., Ahmed, Z., Munir, M., Malik, S.I., Shahzad K. (2009): *Effect of sorbitol in callus induction and plant regeneration in wheat*. African Journal of Biotechnology 8(23) (6529-6535)
- Kadota, M., Niimi, Y. (2004): *Influences of carbon sources and their concentrations on shoot proliferation and rooting of 'Hosui' Japanese pear*. HortScience 39(7) (1681-1683)
- Kozai C., Kubota T. (2005): *In vitro root zone environments and their effects on growth and development of plants*, »Photoautotrophic (sugar-free medium) Micropropagation as a New Micropropagation and Transplant Production System«, ured. Kozai T., Afreen F., Zobayed S.M.A., Springer Publishing, USA, (53-60)
- Machakova I., Zazimalova E., George E.F. (2008): *Plant Growth Regulators I: Introduction; Auxins, their Analogues and Inhibitors*, »Plant Propagation by Tissue Culture, 3rd Edition«, ured. George E.F., Hall M.A., De Klerk D.J., Springer, AA Dordrecht, Netherlands, (115-204)
- Marino, G., Bertazza, G., Magnanini, E., Altan, A.D. (1993): *Comparative effects of sorbitol and sucrose as main carbon energy sources in micropropagation of apricot*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 34 (235-244)
- Marino, G., Magnanini, E., Battistini, S., Righetti, B. (1991): *Effect of hormones and main carbon energy sources on in vitro propagation of apricot (Prunus armeniaca L.) cvs. 'San Cas-trese' and 'Portici'*. Acta Horticulturae 293 (355-362)

- Marković M., Grbić M., Skočajić D., Đunisijević - Bojović D. (2007): *Uticaj balansa fitohormona na multiplikaciju izdanaka i ožiljavanje vrste Dianthus serotinus Waldst. & Kit.*, Glasnik Šumarskog fakulteta 95, Univerzitet u Beogradu – Šumarski fakultet (83-94)
- Marković, M., Grbić, M., Djukić, M. (2013): *Micropropagation of the Endangered and Decorative Species Dianthus serotinus Waldst. et Kit.* Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca 41(2) (1-8)
- Murashige T., Skoog F. (1962): *A revised medium for growth and bioassays with tobacco tissue culture*, Physiologia Plantarum 15 (473–497)
- Pasqua G., Monacelli B., Altamura M.M. (1991): *Influence of pH on flower and vegetative bud initiation and development in vitro*, Cytobiosistemica 68 (111–121)
- Pence V.C. (1999): *The application of biotechnology for the conservation of endangered plants, Chapter 15, »Plant Conservation Biotechnology«*, ured. Benson E.E., Taylor and Francis, London, (227–241)
- Perić M., Dmitrović S., Živković S., Filipović B., Skorić M., Simonović A., Todorović S. (2012): *In Vitro Growth, Morphogenesis, and Acclimatization of Endangered Rindera umbellata (Waldst. & Kit.) Bunge.*, HortScience 47 (1123-1128)
- Pua, E.C., Chong, C. (1983): *Requirement for sorbitol (D-glucitol) as carbon source for in vitro propagation of Malus robusta No. 5.* Canadian Journal of Botany 62 (1545–1549)
- Pua, E.C., Chong, C. (1985): *Regulation of in vitro shoot and root regeneration in 'Mac spur' apple by sorbitol (D-glucitol) and related carbon sources.* Journal of American Society for Horticultural Science 110 (705–709)
- Rashid, H., Abdul Ghani, R., Zubeda, C. (2002): *Effect of media, growth regulators and Genotypes on Callus Induction and regeneration in wheat (Triticum aestivum).* Biotechnology. 1(1): 49-54.
- Skirvin, R.M., Chu, M.C., Mann, M.L., Young, H., Sullivan, J., Fermanian, T. (1986): *Stability of tissue culture medium pH as a function of autoclaving, time, and cultured plant material.* Plant Cell Reports 5 (292-294)
- Stojičić, D., Janosevic, D., Uzelac, B., Budimir, S. (2008): *Factors Influencing Germination And Growth Of Isolated Embryos Of Pinus Heldreichii.* Archives of biological sciences, 60(4) (673-679)
- Swedlund, B., Locy, R.D. (1993): *Sorbitol as the primary carbon source for the growth of embryogenic callus of maize.* Plant Physiology 103 (1339–1346)
- Thorpe T., Stasolla C., Yeung E.C., de Klerk G.J., Roberts A., George E.F. (2008): *The Components of Plant Tissue Culture Media II: Organic Additions, Osmotic and pH Effects, and Support Systems*, „Plant Propagation by Tissue Culture, 3rd Edition”, ured. George E.F., Hall M.A., De Klerk D.J., Springer, AA Dordrecht, Netherlands, (115- 174)
- Traore, A., Guiltinan, M. (2006): *Effects of carbon source and explant type on somatic embryogenesis of four cacao genotypes.* HortScience 41(3) (753–758)
- Uemura, M., Sakai, A. (1980): *Survival of carnation (Dianthus caryophyllus L.) shoot apices frozen to the temperature of liquid nitrogen.* Plant and Cell Physiology 21 (85-94)
- Vasil I.K., Thorpe T.A. (1994): *Plant Cell and Tissue Culture*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Marija Marković
Mihailo Grbić
Matilda Đukić

**EFFECT OF SUGAR ALCOHOL SORBITOL ON *IN VITRO* SHOOT DEVELOPMENT
OF *DIANTHUS SEROTINUS* WALDST. ET KIT.**

Summary

The aim of this study was to investigate the effect of different concentrations of sorbitol on the development of *in vitro* culture of *D. serotinus* in the multiplication phase. This very decorative species, *D. serotinus* has the status of extremely endangered taxon in Serbia and it is protected by law. To date the optimization of factors affecting the micropropagation of *D. serotinus* was performed including an investigation into the effect of different carbohydrates (sucrose, glucose, and fructose). Taking into account the fact that sugar alcohol sorbitol has significant influence on callus induction, cell and protoplast culture as well as on somatic embryogenesis induction, and that its effect has not been studied for any of *Dianthus* species, it was decided to investigate its effect on the shoot development of *D. serotinus* in the multiplication phase. The obtained results showed that sorbitol generally had a positive effect in comparison to a fructose based medium, depending on its concentration and explant type. In addition, the presence of sorbitol affected the change of pH value of the media after autoclaving and after 25 days of *in vitro* culture, which could affect the availability of certain ions to plants. Therefore, the obtained results indicate that sorbitol can be used as an energy source for the *in vitro* culture of *D. serotinus*, but this should be further investigated.

