

UDK: 581.165.7.085.2:582.661.51

Прегледни рад

DOI: 10.2298/GSF1511083M

ПРИМЕНА КУЛТУРЕ *IN VITRO* У РАЗМНОЖАВАЊУ УГРОЖЕНИХ ТАКСОНА РОДА *DIANTHUS* L.

др Марија Марковић, доц., Универзитет у Београду – Шумарски факултет (marija.markovic@sfb.bg.ac.rs)

др Михаило Грбић, редовни професор, Универзитет у Београду – Шумарски факултет

др Матила Ђукић, редовни професор, Универзитет у Београду – Шумарски факултет

Извод: У раду је дат приказ истраживања везаних за *in vitro* размножавање 30 угрожених таксона рода *Dianthus* L. Установљени протоколи размножавања су анализирани и сумирани, при чему су дати основни принципи, методе и препоруке. Установљени протоколи се могу користити за размножавање угрожених каранфила у циљу добијања материјала за садњу на природно станиште. Такође, добијени резултати представљају основу за *ex situ* конзервацију испитиваних таксона, пре свега њихово краткорочно или дугорочно складиштење (криопрезервација).

Кључне речи: угрожене врсте, *Dianthus*, микропропагација, размножавање ендемичних таксона

УВОД

Последњих година се посвећује велика пажња очувању биодиверзитета и интензивно се ради на *ex situ* и *in situ* заштити угрожених биљних таксона. До данас су публикована бројна истраживања која се баве њиховим размножавањем, најчешће методом микропропагације који се показао као врло ефикасан (Cruz-Cruz et al., 2013, Fay, 1992, 1994, Guerrant et al., 2004, Pence, 1999). Због тога, у многим ботаничким баштама и међународним организацијама, као што су The European Botanic Gardens Consortium, који обухвата око 800 ботаничких башти Европе (<http://www.botanicgardens.eu>), Botanic Gardens Conservation International, чији чланови су око 700 ботаничких башти из 118 земаља света (<http://www.bgci.org>) или Plant Conservation Alliance (<http://www.nps.gov/plants/index.htm>), постоје програми за *ex situ* конзервацију угрожених таксона који обухватају и њихово размножавање микропропагацијом. Само у Краљевској ботаничкој башти Кју у Великој

Британији (The Royal Botanic Gardens, Kew) до 1998. године било је преко 500 угрожених врста које су размножене културом ткива у циљу њихове *ex situ* заштите (Fay, Chase, 1998).

У Србији су до данас спроведена истраживања која се баве микропропагацијом угрожених биљних врста, међу којима су и балкански ендемит и терцијарни реликт *Ramonda serbica* Pančić (Sabovljević et al., 2008), *Nepeta rtanjensis* Diklić et Milojević (Mišić et al., 2005a, 2005b), *Rindera umbellata* (Waldst. et Kit.) Bunge (Perić et al., 2012), балкански ендемит *Salvia brachyodon* Vandas (Mišić et al., 2006), као и многе друге укључујући и неке ретке и угрожене врсте маховина (Vujičić et al., 2012, Sabovljević et al., 2012).

Сам поступак размножавања биљака овом методом је сложен и одвија се у строго контролисаним лабораторијским условима који се разликују, зависно од врсте која се гаји. Због тога, размножити неку врсту методом микропропагације уједно подразумева и спровођење детаљних истраживања ради утврђивања оптималних услова под којима ће продукција квалитетног садног материјала бити најефикаснија.

Род *Dianthus* L.

Род *Dianthus* (familia Caryophyllaceae) обухвата око 400 врста које су пореклом из Европе, Азије, Северне Америке и неколико из Јужне Америке. Најчешће расту као вишегодишње полужбунасте, а ређе као једногодишње или двогодишње биљке (Josifović, 1970, Mijanović, 1976, Cullen et al., 1989). Многе врсте које припадају роду *Dianthus* данас имају значајну примену у хортикултури (Ball, 1992, Nau, 1996, Dole i Wilkins, 2004). Међу њима највећи значај има *D. caryophyllus* L., пре свега као резани цвет. Такође, велики комерцијални значај има турски каранфил, *D. barbatus* L. који се код нас примењује као сезонско цвеће на цветњацима (двогодишњи расад), а има значаја и као резани цвет. Значајну примену имају и *D. chinensis* L., *D. carthusianorum* L., *D. plumarius* L., *D. x allwoodii* hort. (*D. plumarius* x *D. caryophyllus*), *D. deltoides* L., *D. gratianopolitanus* Vill., *D. arenarius* L. и *D. knappii* (Pant.) Asch. et Kuntz ex Borbás (Dole i Wilkins, 2004, Nau, 1996, Marković, Popović, 2012a,b, Popović et al., 2008, Marković et al., 2013b, 2014a,b).

Међутим, велики број таксона рода *Dianthus* је препознат као угрожен и сврстан у различите категорије, зависно од степена угрожености. На светској црвеној листи флоре (IUCN), налази се чак 13 таксона: *D. diutinus* Kit. ex Schult., *D. charadzeae* Gagnidze & Gvin., *D. serotinus* Waldst. & Kit., *D. schemachensis* Schischk., *D. raddeanus* Vierh., *D. nitidus* Waldst. & Kit., *D. morisianus* Vals., *D. marizii* Samp., *D. kubanensis* Schischk., *D. hypanicus* Andr., *D. grossheimii* Schischk., *D. bicolor* Adam., *D. andronakii* Woronov ex Schischk. (Ali-Zade, Ekim, 2014, Bilz, 2013, Caldas, 2013, Ekim, 2014, Fenu et al., 2013, Ferakova et al., 2013, Gagnidze et al., 2014, Király, Stevanović, 2013, Litvinskaya, 2014, Melnyk, 2013, Nerseryan, Ali-Zade, 2014, Nerseryan et al., 2014). Међу њима су 3 (*D. serotinus*, *D. diutinus* и *D. nitidus*) присутне на подручју Србије, с тим да се *D. nitidus* у Србији јавља као посебна подврста (*D. nitidus* ssp. *lakusicii*) (Ferakova et al., 2013). Поред наведена три таксона, која су у Србији заштићена законом, у категорију строго заштићених врста су сврстани и *D. behriorum* Bornm., *D. giganteiformis* Borbas subsp. *kladovanus* (Degen) Soó, *D. moesiacus* Vis. & Pančić, *D. monadelphus*

Vent. subsp. *pallens* (Sm.) Greuter & Burdet T. Wraber, *D. scardicus* Wettst., *D. superbus* L. subsp. *superbus*, *D. trifasciculatus* Kit. subsp. *trifasciculatus*, *D. viridescens* G. C. Clementi, *D. viscidus* Vory & Chaub. („Службени гласник РС“, бр. 5/10 и 47/11, „Правилник о проглашењу и заштити строго заштићених и заштићених дивљих врста биљака, животиња и гљива“). Такође, према истом Правилнику, у категорији заштићених врста налазе се: *D. gracilis* Sibth. & Sm. subsp. *armerioides* (Griseb.) Tutin, *D. microlepis* Boiss. subsp. *microlepis*, *D. pelviformis* Heuffel, *D. pinifolius* Sibth. & Sm., *D. sylvestris* Wulfen subsp. *bertisceus* Rech. Поред тога, Tomović, Stevanović (2010) наводе да је *Dianthus* један од 5 родова најбогатијих по бројности ендемичних таксона у Србији.

Све наведено иде у прилог чињеници да је роду *Dianthus* припада велики број угрожених таксона, чијој *ex-situ* конзервацији треба посветити посебну пажњу.

РАЗМНОЖАВАЊЕ УГРОЖЕНИХ ВРСТА КАРАНФИЛА

До сада је спроведен велики број истраживања која су се бавила оптимизацијом протокола за размножавање угрожених таксона каранфила различитим методама културе *in vitro* (tabela 1).

Анализирајући истраживања приказана у табели 1, можемо уочити да је код већине таксона иницијална култура успостављена сетвом семена *in vitro* чиме се постиже очување генетске варијабилности (Pence, 1999, Johnson, 2002). Међу њима су: *D. superbus* ssp. *superbus*, *D. spiculifolius*, *D. henteri*, *D. nardiformis*, *D. giganteus* subsp. *banaticus*, *D. glacialis* ssp. *gelidus*, *D. nardiformis*, *D. fruticosus*, *D. petraeus* ssp. *simonkaianus*, *D. pyrenaicus*, *D. serotinus*, *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* и други. Код неких таксона су коришћени други иницијални експлантациони материјали, па је тако код *D. arenarius* ssp. *bohemicus* и *D. balbisii* ssp. *liburnicus* култура *in vitro* успостављена коришћењем једнонодусних резница. *D. petraeus* ssp. *noeanus* је размножен културом меристема и гајењем сегмената стабљика на којима се образовао орга-

ногени калус из ког су се развили адвентивни пупољци (Radojević et al., 1997) а култура *in vitro* код *D. petraeus* је заснована коришћењем врхова изданака (Tsoktouridis et al., 2013). Слично, *D. giganteus* ssp. *croaticus* и *D. ciliatus* ssp.

dalmaticus су размножени гајењем сегмената стабљика и формирањем адвентивних пупољака, мада се на појединим подлогама формирао и ембриогени калус.

Табела 1. Преглед досадашњих истраживања размножавања *in vitro* угрожених каранфила

Таксон	Распрострањење	Референца
<i>D. alpinus</i> L.	North-East of Alps	Cristea et al., 2006b
<i>D. anatolicus</i> Boiss.	Turkey	Cristea et al., 2006a
<i>D. arenarius</i> L. ssp. <i>bohemicus</i> (Novák) O. Schwarz	Czech Republic	Kovac, 1995
<i>D. balbisii</i> Ser. ssp. <i>liburnicus</i> (Bartl.) Pign.	Southeastern Europe: Albania; Bosnia and Herzegovina; Croatia; Italy; Montenegro; Slovenia	Berardi et al., 2004
<i>D. callizonus</i> Schott et Kotschy	Romania- South Carpathians	Catana et al., 2010, Paunescu, Holobiuc, 2003, Cristea et al., 2004, Holobiuc i Blindu, 2006, Holobiuc et al., 2009,
<i>D. ciliatus</i> Guss. ssp. <i>dalmaticus</i> (Čelak.) Hayek	Albania, Croatia	Radojević et al., 2006, 2010
<i>D. dobrogensis</i> Prodan	Romania, Bulgaria	Holobiuc et al., 2010a, Cristea, 2010
<i>D. ferrugineus</i> Mill. subsp. <i>liburnicus</i> (Bartl.) Tutin	Northern and Western Italy, former Yugoslavia	Cristea et al., 2006b
<i>D. fruticosus</i> L.	Greece	Papafotiou, Stragas, 2009
<i>D. giganteiformis</i> ssp. <i>kladovanus</i>	Romania, Serbia	Marković et al., 2006
<i>D. giganteus</i> d'Urv. ssp. <i>croaticus</i> (Borbás) Tutin	Croatia, Slovenia	Radojević et al., 2006, 2010
<i>D. giganteus</i> d'Urv. subsp. <i>banaticus</i> (Heuff. ex Griseb. et Schenk) Tutin.	Romania, Serbia	Pop, Pamfil, 2011
<i>D. glacialis</i> Haenke ssp. <i>gelidus</i> (Schott, Nyman & Kotschy) Tutin	South and East the Carpathians	Cristea et al., 2006b, Holobiuc et al., 2009, 2010b
<i>D. gratianopolitanus</i> Vill.	Alps	Cristea et al., 2006b
<i>D. henteri</i> Heuff. ex Griseb. et Schenk	Romania	Cristea et al., 2010
<i>D. lusitanus</i> Brot.	Iberian Peninsula	Cristea et al., 2006a
<i>D. mainensis</i> Shaulo & Erst	Altai-Sayan Mountains	Erst et al., 2014
<i>D. nardiformis</i> Janka	Bulgaria, Romania	Holobiuc et al., 2009, Holobiuc et al., 2010c
<i>D. petraeus</i> Waldst. & Kit. ssp. <i>simonkaianus</i> (Péterfi) Tutin	Carpathians and the Balkan Mts	Cristea et al., 2006a,b

Таксон	Распрострањење	Референца
<i>D. petraeus</i> Waldst. et Kit. ssp. <i>noeanus</i> (Boiss.) Tutin	Bulgaria, Macedonia, Serbia	Radojević et al., 1997
<i>D. petraeus</i> Waldst. et Kit. ssp. <i>simonkaianus</i> (Péterfi) Tutin	Romania	Miclaus et al., 2003
<i>D. pratensis</i> M. Bieb. subsp. <i>racovitzae</i> (Prodan) Tutin	Romania	Cristea, 2010
<i>D. pyrenaicus</i> Pourr.	Pyrenees Mts.,	Cristea et al., 2006a, Marcu et al., 2006
<i>D. serotinus</i> Waldst. & Kit.	Pannonian endemit	Marković et al., 2007, 2013a, 2014a, 2014b
<i>D. spiculifolius</i> Schur	Carpathians	(Butiuc-Keul et al., 2001, Cristea et al., 2002, 2004, 2006b, 2013a,b, Holobiuc i Blindu, 2006, Holobiuc et al., 2009, 2010b, Pop, Pamfil, 2011
<i>D. superbus</i> L. ssp. <i>speciosus</i> (Reinchenb) Pawl.	Moroieni, Romania	Cristea et al., 2004, Holobiuc i Blindu, 2006
<i>D. superbus</i> L. ssp. <i>superbus</i> Domin	Czech Republic	Mikulik, 1999
<i>D. tenuifolius</i> Schur.,	Romania	Cristea et al., 2004, Holobiuc i Blindu, 2006, Holobiuc et al., 2009
<i>Dianthus trifasciculatus</i> Kit. ssp. <i>parviflorus</i> Stoj. & Acht.	Romania, Bulgaria	Holobiuc et al., 2013
<i>D. petraeus</i> Waldst. et Kit.	Greece	Tsoktouridis et al., 2013

У фази мултипликације код више таксона експлантациони су били нодусне резнице и терминални пупољци, међу њима су *D. spiculifolius*, *D. henteri*, *D. serotinus*, *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*, *Dianthus petraeus* ssp. *simonkaianus*, *D. nardiformis*, док код *D. superbus* ssp. *superbus*, *D. tenuifolius*, *D. callizonus*, *D. superbus* ssp. *speciosus*, *D. glacialis* ssp. *gelidus* само нодусне резнице (табела 1).

Код свих наведених таксона, превасходно је испитивано дејство различитих врста и концентрација фитохормона на развој у култури *in vitro*. Међутим, код неких таксона су спроведена додатна истраживања. Тако је, код *D. giganteus* ssp. *banaticus* испитивана могућност криопрезервације (Jarda et al., 2011), а код *D. spiculifolius* и *D. glacialis* ssp. *gelidus* утврђен је протокол за успостављање банке гена (Holobiuc et al., 2009), при чему је позитиван ефекат имало додавање манитола као осмотског фактора у медијум (Butiuc-Keul et al., 2001, Cristea et al.,

2002, Holobiuc et al., 2010b, Pop i Pamfil, 2011). Код *D. serotinus* испитан је ефекат додавања сорбитола у медијум (Marković et al., 2014a), који је важан криопротектант (Vasil, Thorpe, 1994), а има и значаја у индукцији калуса, култури ћелија и протопласта, индукцији соматске ембриогенезе (Benkirane et al., 2000, Rashid et al., 2002, Hassan et al., 2009). Такође, спроведена су и истраживања унапређења постојећих протокола микропропагације *D. tenuifolius*, *D. callizonus*, *D. spiculifolius*, *D. superbus* ssp. *speciosus* (Cristea et al., 2004, Holobiuc i Blindu, 2006), а код *D. spiculifolius* испитана је генетска стабилност биљака добијених *in vitro*, при чему је утврђено да је генетска варијабилност популације сачувана применом одговарајућег протокола микропропагације, док је соматско клонско варирање *in vitro* биљака минимално (Cristea et al., 2014). Код врсте *D. serotinus* је први пут код рода *Dianthus* испитано дејство различитих врста и концентрација шећера на развој култура

у фази мултипликације, а с обзиром да расте на песку алкалне реакције, истражен је и утицај рН вредности медијума (Marković et al., 2013a).

Поред наведених, рађена су и истраживања којима је био циљ да се индукује соматска ембриогенеза код угрожених каранфила ради производње синтетичког семена (Holobiuc et al., 2009). Истраживања су обухватила таксоне *D. tenuifolius*, *D. callizonus*, *D. spiculifolius* и *D. glacialis* subsp. *gelidus*, а у медијум је додаван манитол како би се индуковао умерени осмотски стрес који проузрокује смањен раст културе, али подстиче соматску ембриогенезу. Добијени соматски ембриони су успешно клијали.

ДИСКУСИЈА

Стерилна култура *in vitro* је успешно успостављена код каранфила приказаних у табели 1. У случајевима када је коришћено семе као иницијални материјал, клијавост се разликовала зависно од таксона. Код неких је била висока, преко 80% (*D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*, *D. giganteus* subsp. *banaticus*, *D. mainensis*, *D. pinifolius*, *D. serotinus*), код неких је била нешто нижа, 60-70% (*D. spiculifolius*, *D. ciliatus* ssp. *dalmaticus*), а код појединих таксона је била релативно ниска, испод 60% (*D. henteri* - 52,5%, *D. giganteus* ssp. *croaticus* - 42%). Код већине каранфила није забележена појава дормантности (*Baskin*, *Baskin*, 2005) која представља велики проблем код неких других врста (*Grbić et al.*, 2005, 2006, 2014a,b, *Samuilov et al.*, 2014). Пошто су у питању различите врсте каранфила, клијавост зависи пре свега од саме посматране врсте, као и од године урода, али не треба занемарити дејство супстанце коришћене за стерилизацију. У већини анализираних протокола (табела 1) коришћен је NaOCl који је оксидативно средство, и његов позитиван ефекат се огледа у прекидању дормантности семена растварањем и оксидацијом инхибитора клијања (*Frank, Larson*, 1970, *Miyoshi, Mii*, 1995, 1998), али и у делимичној деградацији семењаче (*Lee et al.*, 2007). Међутим, не треба заборавити да NaOCl може имати и токсично дејство на биљно ткиво, јер уколико је заостао на површини семена након испирања, може да утиче на

уграђивање аминокиселина у протеине (*Abdul-Baki*, 1974). Конкретан утицај NaOCl на клијање семена је истраживан, а добијени резултати се разликују пре свега зависно од испитиване врсте, затим од концентрације раствора, као и од дужине третирања семена (*Khah i Passam*, 1992, *Watkinson, Pill*, 1998). Такође, додавање гибберелинске киселине (GA_3) може имати позитиван утицај на клијавост (*Watkinson, Pill*, 1998), што је забележено и код *D. henteri* (*Cristea et al.*, 2010) чије семе је стерилисано водоник пероксидом (4% H_2O_2), и на медијуму са 100 mg/L GA_3 клијавост је била 100%, док на истом медијуму без GA_3 - свега 75%.

Предност коришћења семена за успостављање стерилне културе, поред очувања генетске варијабилности, огледа се и у знатно нижем степену контаминације у односу на коришћење нодусних резница. То је нарочито уочљиво код *D. giganteus* ssp. *banaticus*, *D. henteri* и *D. spiculifolius* где се контаминираност нодусних резница кретала од 35% до 65%, а контаминираност семена истих врста није прелазила 7% (*Pop, Pamfil*, 2011).

Након успостављања стерилне културе, спроводи се фаза мултипликације изданака. Зависно од посматраног таксона разликује се проценат регенерације правилно развијених изданака, фактор мултипликације, код неких је забележена и појава витрификације (*D. serotinus*, нпр.), али и поред тога, резултати су задовољавајући и нису забележени већи проблеми ни код једног анализираниог таксона (табела 1). Слично, и у фази оживљавања, код неких таксона је проценат оживљавања изузетно висок (нпр., *D. superbus* ssp. *superbus* - 100%, *D. mainensis* - 100%, *D. petraeus* ssp. *noeanus* - 91%), код неких нешто нижи (нпр., *D. arenarius* ssp. *bohemicus* - 85%), али уопштено посматрајући, резултати су задовољавајући.

Када је у питању аклиматизација анализираних таксона, показано је да састав супстрата може имати утицај на проценат аклиматизације (*Marković et al.*, 2014b). Међутим, значајан напредак се може постићи коришћењем фотоаутотрофног система микропропагације чија примена је успешно испитана код 9 угрожених таксона у Румунији (*Cristea*, 2010, *Cristea et al.*, 2002).

ЗАКЉУЧЦИ

Култура *in vitro* има значајну практичну примену у размножавању угрожених таксона, што анализирана истраживања потврђују. Међутим, примена резултата тих истраживања је више-струка. Не само да се установљени протоколи

могу користити за размножавање испитиваних таксона у циљу добијања материјала за реинтродукцију и аугментацију њихових популација, већ и добијени резултати чине основу за додатна истраживања везана за краткорочно или дугорочно складиштење ових биљака (криопрезервација).

IN VITRO PROPAGATION OF ENDANGERED *DIANTHUS* TAXA

dr Marija Marković, doc., University of Belgrade – Faculty of Forestry (marija.markovic@sfb.bg.ac.rs)

dr Mihailo Grbić, full profesor, University of Belgrade – Faculty of Forestry

dr Matilda Đukić, full profesor, University of Belgrade – Faculty of Forestry

Abstract: The review of recent researches regarding the *in vitro* culture of 30 endangered *Dianthus* taxa is presented in this paper. Various *in vitro* protocols developed for selected rare and threatened *Dianthus* taxa are analysed in order to provide a useful synthesis of the data obtained with the main principles, techniques and **recommendations** for further research and practice. The recapitulated data presented in this review can be used as a tool for the micropropagation of other endangered *Dianthus* taxa, enabling their propagation and obtaining a sufficient amount of plants for reintroduction. In addition, the obtained results represent the basis for *ex situ* conservation of the investigated taxa, especially for medium-term and long-term conservation (cryopreservation).

Key words: endangered species, *Dianthus*, micropropagation, endemic taxa propagation

INTRODUCTION

In the past few years a lot of attention has been paid to the preservation of biodiversity, and intensive work has been conducted in *ex situ* and *in situ* conservation of endangered plant species. To date, many studies regarding the propagation of endangered plants have been published, in which micropropagation was the most commonly used method, due to its efficiency (Cruz-Cruz *et al.*, 2013, Fay, 1992, 1994, Guerrant *et al.*, 2004, Pence, 1999). For that reason, many botanical gardens and international organisations for wildlife conservation, e.g. The European Botanic Gardens Consortium, which comprises of about 800 european botanical gardens (<http://www.botanicgardens.eu>), Botanic Gardens Conservation

International, which includes about 700 botanical gardens from 118 countries (<http://www.bgci.org>) or Plant Conservation Alliance (<http://www.nps.gov/plants/index.htm>), have programs for *ex situ* conservation of endangered plant taxa including suitable micropropagation protocols.

For example, until 1998 in the The Royal Botanic Gardens - Kew, more than 500 endangered plant species were propagated by tissue culture for the purpose of their *ex situ* conservation (Fay, Chase, 1998).

To date, a lot of studies have been conducted in Serbia on the micropropagation of many endangered plants, including the Balkan endemic species and tertiary relict - *Ramonda serbica* Pančić (Sabovljević *et al.*, 2008), *Nepeta rtanjensis* Diklić *et* Milojević (Mišić *et al.*, 2005a, 2005b), *Rinde-*

ra umbellata (Waldst. et Kit.) Bunge (Perić et al., 2012), the Balkan endemic *Salvia brachyodon* Vandas (Mišić et al., 2006), and many others, including some rare and endangered moss species (Vujičić et al., 2012, Sabovljević et al., 2012).

The procedure of micropropagation is complex and performed in controlled laboratory conditions that vary depending on the species and cultivar. Therefore, it is necessary to conduct detailed studies to determine the optimal conditions for an effective mass production of selected taxa.

Genus *Dianthus* L.

Dianthus (familia Caryophyllaceae) is a genus of about 400 species mainly native to Europe, Asia, North America with a few species from South America. The species are mostly herbaceous perennials, and a few are annual or biennial (Josifović, 1970, Mijanović, 1976, Cullen et al., 1989). Many *Dianthus* species are important horticultural crops (Ball, 1992, Nau, 1996, Dole i Wilkins, 2004). The most important among these species is carnation (*D. caryophyllus* L.), primarily in the international cut flower market. In addition, Sweet William (*D. barbatus* L.) has a great commercial importance as a popular ornamental biennial in gardens and as a cut flower. Other horticulturally important *Dianthus* species include *D. chinensis* L., *D. carthusianorum* L., *D. plumarius* L., *D. × allwoodii* hort. (*D. plumarius* × *D. caryophyllus*), *D. deltoides* L., *D. gratianopolitanus* Vill., *D. arenarius* L. and *D. knappii* (Pant.) Asch. et Kanitz ex Borbás (Dole i Wilkins, 2004, Nau, 1996, Marković, Popović, 2012a,b, Popović et al., 2008, Marković et al., 2013b, 2014a,b).

However, there is a large number of endangered *Dianthus* taxa, classified in different categories according to the degree of endangerment. As many as 13 of those taxa are included in the IUCN Red List of Threatened Species, including *D. diutinus* Kit. ex Schult., *D. charadzeae* Gagnidze & Gvin., *D. serotinus* Waldst. & Kit., *D. schemachensis* Schischk., *D. raddeanus* Vierh., *D. nitidus* Waldst. & Kit., *D. morisianus* Vals., *D. marizii* Samp., *D. kubanensis* Schischk., *D. hypanicus* Andrz., *D. grossheimii* Schischk., *D. bicolor* Adam., *D. andronakii* Woronov ex Schischk. (Ali-Zade, Ekim, 2014, Bilz, 2013, Caldas, 2013, Ekim, 2014, Fenu et al., 2013,

Ferakova et al., 2013, Gagnidze et al., 2014, Király, Stevanović, 2013, Litvinskaya, 2014, Melnyk, 2013, Nerseryan, Ali-Zade, 2014, Nerseryan et al., 2014). Three of them (*D. serotinus*, *D. diutinus* and *D. nitidus*) are native to Serbia, but in the case of *D. nitidus* only the subspecies *D. nitidus* ssp. *lakusicii* has been recorded in its territory (Ferakova et al., 2013). Besides the 3 taxa mentioned, which are protected by law in Serbia, the taxa *D. behriorum* Bornm., *D. giganteiformis* Borbas subsp. *kladovanus* (Degen) Soó, *D. moesiacus* Vis. & Pančić, *D. monadelphus* Vent. subsp. *pallens* (Sm.) Greuter & Burdet T. Wraber, *D. scardicus* Wettst., *D. superbus* L. subsp. *superbus*, *D. trifasciculatus* Kit. subsp. *trifasciculatus*, *D. viridescens* G. C. Clementi, *D. viscidus* Bory & Chaub. are also included in the category of strictly protected species (Official Gazette of RS “, no. 5/10 and 47/11, “ Rulebook on declaration and protection of strictly protected and protected species of plants, animals and fungi”). In addition, according to the same Rulebook, the taxa *D. gracilis* Sibth. & Sm. subsp. *armerioides* (Griseb.) Tutin, *D. microlepis* Boiss. subsp. *microlepis*, *D. pelviformis* Heuffel, *D. pinifolius* Sibth. & Sm., *D. sylvestris* Wulfen subsp. *bertisceus* Rech. are included in the category of protected species. Furthermore, Tomović and Stevanović (2010) argued that *Dianthus* is one out of five genera which are the richest in the number of endemic taxa in Serbia. All that implies that the genus *Dianthus* includes a large number of endangered taxa and that special attention should be paid to their ex-situ conservation.

PROPAGATION OF ENDANGERED *DIANTHUS* SPECIES

To date, many studies have been conducted in order to optimize the protocol for the *in vitro* propagation of endangered *Dianthus* taxa (Table 1).

When the studies presented in Table 1 are analyzed, it can be observed that the initial *in vitro* culture in the majority of taxa is established from seed in order to preserve genetic variability (Pence, 1999, Johnson, 2002). Among them are *D. superbus* ssp. *superbus*, *D. spiculifolius*, *D. henteri*, *D. nardiformis*, *D. giganteus* subsp. *banaticus*, *D. glacialis* ssp. *gelidus*, *D. nardiformis*, *D. fruticosus*,

D. petraeus ssp. *simonkaianus*, *D. pyrenaicus*, *D. serotinus*, *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* etc. In some taxa other initial explants are used, such as in the case of *D. arenarius* ssp. *bohemicus* and *D. balbisii* ssp. *liburnicus*, where *in vitro* culture was established from single-node cuttings. *D. petraeus* ssp. *noeanus* is propagated using meristem-tip culture, followed by the formation of adventitious buds developed from organogenic

callus formed on stem segments (Radojević et al., 1997). Similarly, during the propagation of *D. giganteus* ssp. *croaticus* and *D. ciliatus* ssp. *dalmaticus* adventitious buds developed on cultivated stems segments, with the occasional emergence of embryogenic callus. An *in vitro* culture of *D. petraeus* was established using shoot tips (Tsoktouridis et al., 2013).

Table 1. A survey of the studies of *in vitro* culture of endangered *Dianthus* species

Taxon	Distribution	Reference
<i>D. alpinus</i> L.	North-East of Alps	Cristea et al., 2006b
<i>D. anatolicus</i> Boiss.	Turkey	Cristea et al., 2006a
<i>D. arenarius</i> L. ssp. <i>bohemicus</i> (Novák) O. Schwarz	Czech Republic	Kovac, 1995
<i>D. balbisii</i> Ser. ssp. <i>liburnicus</i> (Bartl.) Pign.	Southeastern Europe: Albania; Bosnia and Herzegovina; Croatia; Italy; Montenegro; Slovenia	Berardi et al., 2004
<i>D. callizonus</i> Schott et Kotschy	Romania- South Carpathians	Catana et al., 2010, Paunescu, Holobiuc, 2003, Cristea et al., 2004, Holobiuc i Blindu, 2006, Holobiuc et al., 2009,
<i>D. ciliatus</i> Guss. ssp. <i>dalmaticus</i> (Čelak.) Hayek	Albania, Croatia	Radojević et al., 2006, 2010
<i>D. dobrogensis</i> Prodan	Romania, Bulgaria	Holobiuc et al., 2010a, Cristea, 2010
<i>D. ferrugineus</i> Mill. subsp. <i>liburnicus</i> (Bartl.) Tutin	Northern and Western Italy, former Yugoslavia	Cristea et al., 2006b
<i>D. fruticosus</i> L.	Greece	Papafotiou, Stragas, 2009
<i>D. giganteiformis</i> ssp. <i>kladovanus</i>	Romania, Serbia	Marković et al., 2006
<i>D. giganteus</i> d'Urv. ssp. <i>croaticus</i> (Borbás) Tutin	Croatia, Slovenia	Radojević et al., 2006, 2010
<i>D. giganteus</i> d'Urv. subsp. <i>banaticus</i> (Heuff. ex Griseb. et Schenk) Tutin.	Romania, Serbia	Pop, Pamfil, 2011
<i>D. glacialis</i> Haenke ssp. <i>gelidus</i> (Schott, Nyman & Kotschy) Tutin	South and East the Carpathians	Cristea et al., 2006b, Holobiuc et al., 2009, 2010b
<i>D. gratianopolitanus</i> Vill.	Alps	Cristea et al., 2006b
<i>D. henteri</i> Heuff. ex Griseb. et Schenk	Romania	Cristea et al., 2010
<i>D. lusitanus</i> Brot.	Iberian Peninsula	Cristea et al., 2006a

Taxon	Distribution	Reference
<i>D. mainensis</i> Shaulo & Erst	Altai-Sayan Mountains	Erst et al., 2014
<i>D. nardiformis</i> Janka	Bulgaria, Romania	Holobiuc et al., 2009, Holobiuc et al., 2010c
<i>D. petraeus</i> Waldst. & Kit. ssp. <i>simonkaianus</i> (Péterfi) Tutin	Carpathians and the Balkan Mts	Cristea et al., 2006a,b
<i>D. petraeus</i> Waldst. et Kit. ssp. <i>noeanus</i> (Boiss.) Tutin	Bulgaria, Macedonia, Serbia	Radojević et al., 1997
<i>D. petraeus</i> Waldst. et Kit. ssp. <i>simonkaianus</i> (Péterfi) Tutin	Romania	Miclaus et al., 2003
<i>D. pratensis</i> M. Bieb. subsp. <i>racovitzae</i> (Prodan) Tutin	Romania	Cristea, 2010
<i>D. pyrenaicus</i> Pourr.	Pyrenees Mts.,	Cristea et al., 2006a, Marcu et al., 2006
<i>D. serotinus</i> Waldst. & Kit.	Pannonian endemit	Marković et al., 2007, 2013a, 2014a, 2014b
<i>D. spiculifolius</i> Schur	Carpathians	(Butiuc-Keul et al., 2001, Cristea et al., 2002, 2004, 2006b, 2013a,b, Holobiuc i Blindu, 2006, Holobiuc et al., 2009, 2010b, Pop, Pamfil, 2011
<i>D. superbus</i> L. ssp. <i>speciosus</i> (Reinchenb) Pawl.	Moroieni, Romania	Cristea et al., 2004, Holobiuc i Blindu, 2006
<i>D. superbus</i> L. ssp. <i>superbus</i> Domin	Czech Republic	Mikulik, 1999
<i>D. tenuifolius</i> Schur.,	Romania	Cristea et al., 2004, Holobiuc i Blindu, 2006, Holobiuc et al., 2009
<i>Dianthus trifasciculatus</i> Kit. ssp. <i>parviflorus</i> Stoj. & Acht.	Romania, Bulgaria	Holobiuc et al., 2013
<i>D. petraeus</i> Waldst. et Kit.	Greece	Tsoktouridis et al., 2013

At the multiplication stage, the mainly used explants of the species *D. spiculifolius*, *D. henteri*, *D. serotinus*, *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*, *Dianthus petraeus* ssp. *simonkaianus*, *D. nardiformis* were nodal cuttings and terminal buds, and of the species *D. superbus* ssp. *superbus*, *D. tenuifolius*, *D. callizonus*, *D. superbus* ssp. *speciosus*, *D. glacialis* ssp. *gelidus* only nodal cuttings (Table 1).

The effect of different types and concentrations of phytohormones on plant development in in vitro culture was primarily investigated for all the above mentioned taxa. However, there were some additional researches. Thus, *Jarda et al. (2011)* investigated the possibility of cryopreservation of *D. giganteus* ssp. *banaticus*, and *Holobiuc et al. (2009)* determined the protocol for the establishment of a gene bank of *D. spiculifolius* and *D. glacialis* ssp. *gelidus*. In addition, it was assessed that in many cases mannitol had a positive effect as an osmotic factor in the medium (*Butiuc-Keul et al., 2001, Cristea et al., 2002, Holobiuc et al., 2010b, Pop i Pamfil, 2011*). *Marković et al. (2014a)* investigated the effect of the sugar alcohol sorbitol on in vitro growth of *D. serotinus*. Sorbitol is an important cryoprotectant (*Vasil, Thorpe, 1994*), which is also significant for callus induction, in cell and protoplast culture, and

for somatic embryogenesis induction (Benkirane et al., 2000, Rashid et al., 2002, Hassan et al., 2009). Furthermore, the possibilities of improving the protocols of the micropropagation of *D. tenuifolius*, *D. callizonus*, *D. spiculifolius*, *D. superbus* ssp. *speciosus* were examined (Cristea et al., 2004, Holobiuc i Blindu, 2006), and the genetic stability of *D. spiculifolius* microplants was tested, finding that the genetic variability of the populations was preserved, with minimal appearance of somaclonal variation, using the appropriate micropropagation protocol (Cristea et al., 2014). In addition, it was the first time that the influence of the type and concentrations of sugars on *in vitro* growth was tested for *Dianthus* spp for *D. serotinus*, as well as the effect of the pH value of media, as it grows on the alkaline (Marković et al., 2013a).

In addition, some studies were performed in order to induce somatic embryogenesis for the production of synthetic seeds of endangered *Dianthus* spp. (Holobiuc et al., 2009). Those investigations included *D. tenuifolius*, *D. callizonus*, *D. spiculifolius* and *D. glacialis* subsp. *gelidus*, and mannitol was added to the medium in order to induce moderate osmotic stress, which reduces the growth of culture, but promotes somatic embryogenesis. The obtained somatic embryos germinated successfully.

DISCUSSION

Sterile *in vitro* cultures of *Dianthus* spp. listed in Table 1 were successfully established. In the cases where the seeds were used as the initial material, germination differed depending on the species. In some cases the germination rate was high, reaching over 80% (*D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*, *D. giganteus* subsp. *banaticus*, *D. mainensis*, *D. pinifolius*, *D. serotinus*). In some cases it was lower, reaching 60-70% (*D. spiculifolius*, *D. ciliatus* ssp. *dalmaticus*), and in some cases it was low, reaching below 60% (*D. henteri* - 52,5%, *D. giganteus* ssp. *croaticus* - 42%). The majority of *Dianthus* spp. had no seed dormancy (Baskin, Baskin, 2005), which is a great problem in the propagation of some other species (Grbić et al., 2005, 2006, 2014a,b, Samuilov et al., 2014). Besides the species and the year of harvesting,

sterilization agent can also influence germination capacity. In the propagation of the species listed in Table 1, the most commonly used agent was NaOCl which has an oxidative effect, and can break seed dormancy by partial degradation of the seed coat (Lee et al., 2007) and the oxidation of inhibitors of seed germination (Frank, Larson, 1970, Miyoshi, Mii, 1995, 1998). However, NaOCl can be toxic to plant tissue if it remains on the seed surface after rinsing, influencing the incorporation of amino acids into proteins (Abdul-Baki, 1974). Investigations of the influence of NaOCl on seed germination showed that results can be different depending on the species, solution concentration and duration of the treatment (Khah i Passam, 1992, Watkinson, Pill, 1998). Also, the addition of the gibberellic acid (GA3) can have a positive impact on germination (Watkinson, Pill, 1998), which was recorded for *D. henteri* (Cristea et al., 2010) after sterilization with hydrogen peroxide (4% H₂O₂). On the medium supplemented with 100 mg/L GA3 germination was 100%, while on the same medium without GA3 it was only 75%.

In addition to preserving the genetic variability, the other advantage of using the seeds for establishing *in vitro* cultures, is the significantly lower contamination rate compared to the one in the use of nodal cuttings. This is especially noticeable in the case of the micropropagation of *D. giganteus* ssp. *banaticus*, *D. henteri* and *D. spiculifolius*, where the contamination rate of nodal cuttings ranged between 35% and 65%, while the contamination rate of seed did not exceed 7% (Pop, Pamfil, 2011).

At the multiplication stage, the regeneration rate and multiplication factor differed depending on the *Dianthus* species. In some cases, vitrification was recorded (e.g. *D. serotinus*), but in spite of that, the results were satisfactory and there have been no major problems with any of the analyzed taxa (Table 1).

Similarly, the rooting percentage of some taxa was very high (e.g. *D. superbus* ssp. *superbus* - 100%, *D. mainensis* - 100%, *D. petraeus* ssp. *noeanus* - 91%). In some cases it was slightly lower (e.g. *D. arenarius* ssp. *bohemicus* - 85%), but in general, the results are satisfactory.

Regarding the acclimatization stage, it was shown that the composition of the substrate

influences the acclimatization rate (Marković *et al.*, 2014b). However, a significant improvement can be achieved when an photoautotrophic micropropagation system is used. The application of this system has been successfully tested for 9 endangered taxa in Romania (Cristea, 2010, Cristea *et al.*, 2002).

CONCLUSIONS

This survey showed that *in vitro* culture has a significant practical application in the propagation of endangered taxa. However, besides the use of the obtained protocols for the propagation of plants in order to obtain plant material for reintroduction and augmentation of the existing populations, the obtained results are also the basis for additional research of medium-term and long-term conservation (cryopreservation) of this species.

Note: This paper was supported by the Ministry of Education and Science of the Republic of Serbia within the project no. 43007 for the period 2011-2015.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

Abdul-Baki, A. A. (1974): Hypochlorite and tissue sterilization, *Planta* 115 (373-376)

Ali-Zade, V., Ekim, T. (2014): *Dianthus schemachensis*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 23 October 2014.

Ball V. (1991): *Ball Red Book*, Geo J. Ball Publishing, West Chicago (684-685)

Baskin C.C., Baskin J.M. (2005): Seed Dormancy in Wild Flowers. »Flower Seeds, Biology and Technology«, Ured. McDonald M.B., Kwong F.Y., CABI Publishing, CAB International, (163-186)

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)

Berardi G., Roncasaglia R., Scaravelli D., Dradi G. (2004): *In vitro* propagation of *Dianthus balbisii* Ser. ssp. *liburnicus* (Bartl.) Pign. by shoot tip culture. 5 th IVCHB Symposium I, 12-14 September, 2004, Debrecen, Hungary, p. 164

Bilz, M. (2013): *Dianthus serotinus*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 23 October 2014.

Botanic Gardens Conservation International, from: <http://www.bgci.org> (accessed 2013)

Butiuc-Keul A., Şuteu A., Munteanu-Deliu C., Deliu C. (2001): Study on the *in vitro* preservation of *Dianthus spiculifolius* Schur. *Contribuții Botanice* 36 (137-143)

Caldas, F.B. (2013): *Dianthus marizii*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 23 October 2014.

Catana R., Mitoi E.M., Helepciuc F., Holobiuc I. (2010): *In vitro* Conservation under Slow Growth Conditions of Two Rare Plant Species from Caryophyllaceae family. *Electronic Journal of Biology*, 6(4) (86-91)

Changyan, N. (2014): *Dianthus grossheimii*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 23 October 2014.

Cristea V. (2010): Photoautotrophic *in vitro* culture of endemic and endangered *Dianthus* species from Romania. *Todesco, Cluj-Napoca*, 227 p.

Cristea V., Brummer A.T., Jarda L., Miclaus M. (2010): *In vitro* culture initiation and phytohormonal influence on *Dianthus henteri* – a Romanian endemic species, *Romanian biotechnological letters, Supplement* 15 (1) (25-33)

Cristea V., Crăciunaş C., Marcu D., Palada M., Butiuc-Keul A. (2014): Genetic stability during *in vitro* propagation of *Dianthus spiculifolius* Schur. *Propagation of Ornamental Plants* 14 (26-31)

Cristea V., Miclăuş M., Marcu D., Halmágyi A. (2006a): *In vitro* multiplication and conservation of some horticultural - important taxons of *Achillea*, *Dianthus* and *Paradisea* Genera. XXII International Symposium - Section Ornamentals, Eds. Mercuri A., Shiva T., 11-15 September, Sanremo, Italy, p 31

- Cristea V., Miclaus M., Puscas M., Deliu C. (2002): Influence of hormone balance and in vitro photoautotrophy on *Dianthus spiculifolius* Schur. micropropagation, *Contributii Botanice* 37 (145-153)
- Cristea V., Miclaus M., Puscas M., Deliu C., (2004): Conservative micropropagation of some endemic or rare species from the *Dianthus* L. genus, V International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding, *ISHS Acta Horticulturae* 725 (357-364)
- Cristea V., Puscas M., Miclăuș M., Deliu C. (2006b): Conservative micropropagation of some endemic or rare species from the *Dianthus* genus. *Acta Horticulturae* 725 (357-364)
- Cristea, V., Jarda, L., Holobiu, I. (2013a): Ex situ conservation of three endemic and/or endangered *Dianthus* species, *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 41 (73-78)
- Cristea, V., Palada, M., Jarda, L., Butiu, K. (2013b): Ex situ in vitro conservation of *Dianthus spiculifolius*, endangered and endemic plant species. *Studia Universitatis Babeş-Bolyai Biologia* 58(1) (57-69)
- Cruz-Cruz C.A., González-Arno, M.T., Engelmann F. (2013): Biotechnology and Conservation of Plant Biodiversity. *Resources* 2(2) (73-95)
- Cullen J., Knees S., Cubey S. (1989): *The European Garden Flora*, Volume 3, Cambridge University Press, Cambridge, UK (185)
- Ekim, T. (2014): *Dianthus andronakii*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 23 October 2014.
- Erst, A.A., Erst A.S., Shaulo, D.N. (2014): In vitro Propagation of *Dianthus mainensis*, an Endemic Plant from the West Sayan (North Asia). *Taiwania*, 59(2) (106–110)
- European Botanic Gardens Consortium, from: <http://www.botanicgardens.eu> (accessed 2013)
- Fay M.F. (1992): Conservation of rare and endangered plants using in vitro methods, *In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant* 28 (1-4)
- Fay M.F. (1994): In what situations is in vitro culture appropriate to plant conservation? *Biodiversity and Conservation* 3 (176-183)
- Fay M.F., Chase M.W. (1998): The role of in vitro and molecular techniques in the conservation of threatened species, *Museologia Scientifica* 14 Supplement (313-318)
- Fenu, G., Mattana, E., Bacchetta, G. (2013): *Dianthus morisianus*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 23 October 2014.
- Ferakova, V., Meredá, P., Hodálová, I., Eliáš, P., Petrovič, D., Stevanović, V. (2013): *Dianthus nitidus*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 23 October 2014.
- Frank, A. B., Larson, K. L. (1970): Influence of oxygen, sodium hypochlorite, and dehulling on germination of green needlegrass seed, *Crop Science* 10 (6) (679-682)
- Gagnidze, R., Shetekauri, S. & Batsatsashvili, K. (2014): *Dianthus charadzeae*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 23 October 2014.
- Grbic M., Skocajic D., Djukic M., Djunisijevic Bojovic D., Markovic M. (2014a): Ispitivanje osobina semena *Vachellia Farnesiana* (L.) Wight i Arn. Kao potencijalno primenljive vrste u Srbiji u uslovima klimatskih promena, *Glasnik Šumarskog fakulteta* 110, Univerzitet u Beogradu - Šumarski fakultet, Beograd (33-44)
- Grbić M., Nikolić A., Skočajić D., Đukić M., Đunisijević D. (2005): Uticaj giberelinske kiseline na klijanje semena *Chionanthus virginicus* L., *Glasnik Šumarskog fakulteta* 91, Univerzitet u Beogradu - Šumarski fakultet, Beograd (89-96)
- Grbić M., Skočajić D., Đukić M., Đunisijević D. (2006): Predsetveni tretmani za otklanjanje dormantnosti semena *Hovenia dulcis* Thunb., *Glasnik Šumarskog fakulteta* 93, Univerzitet u Beogradu - Šumarski fakultet, Beograd (49-57)
- Grbić M., Skočajić D., Đukić M., Đunisijević-Bojović D., Obratov-Petković D., Bjedov I. (2014b): Otklanjanje dormantnosti semena judinog drveta regulatorima rasteinja, *Glasnik Šumarskog fakulteta* 109, Univerzitet u Beogradu - Šumarski fakultet, Beograd (73-84)

- Guerrant, EO Jr., Havens K., Maunder M. (2004): Ex Situ Plant Conservation: Supporting Species Survival in the Wild, Island Press. Covelo
- 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)
- Holobiuc I, Catana R, Cristea V (2010c): Researches concerning in vitro cultures optimization of the vulnerable species *Dianthus nardiformis* Janka. Analele Universitatii din Oradea - Fascicula Biologie 17(1) (116-121)
- Holobiuc I., Blîndu R., Cristea V. (2009a): Researches concerning in vitro conservation of the rare plant species *Dianthus nardiformis* Janka. Biotechnology & Biotechnolical Equipment 23 (2) (221-224)
- Holobiuc I., Helepciuc F., Catana R., Aldea F. (2010a): Ex situ conservation using biotechnological methods in the rare and endemic species *Dianthus dobrogensis* Prodan. Biotechnology, Series F, Proceedings of the 3rd International Symposium „New Researches in Biotechnology“ SimpBTH2010, University of Agronomical Sciences and Veterinary Medicine, Bucharest, Romania, pp. 40
- Holobiuc, I., Blîndu, R. (2006): Improvement of the micropropagation and in vitro medium-term preservation of some rare *Dianthus* species, Contributii Botanice 41 (2) (143-151)
- Holobiuc, I., Catană R., Voichiğă C., Helepciuc F. (2013): In vitro introduction of *Dianthus trifasciculatus* Kit ssp. *parviflorus* as ex situ preservation method. Oltenia - Studii si comunicari stiintele naturii 29 (93-100)
- Holobiuc, I., Mitoi, M., Blîndu, R, Helepciuc, F. (2010b): The establishment of an in vitro gene bank in *Dianthus spiculifolius* Schur. and *D. glacialis* ssp. *gelidus* (Schott Nym. et Kotschy) Tutin: II. Medium-term cultures characterization in minimal growth conditions. Romanian Biotechnological Letters 15 (2) (5111-5119)
- Holobiuc, M, Blîndu, R, Mitoi, M, Helepciuc, F, Cristea, V. (2009b): The establishment of an in vitro gene bank in *Dianthus spiculifolius* Schur. and *D. glacialis* ssp. *gelidus* (Schott Nym. et Kotschy). The initiation of a tissues collection and the characterization of the cultures in minimal growth conditions. Annals of Forest Research 52 (14-26)
- Jarda L., Cristea V., Halmagyi A., Plada M. (2011): In vitro culture initiation and cryopreservation of endemic taxa *Dianthus giganteus* ssp. *banaticus*. Acta Horticulturae 918 (153-160)
- Johnson K. (2002): In vitro conservation including rare and endangered plants, heritage plants and important agricultural plants, Eds. Taji A; Williams R., »The Importance of Plant Tissue Culture and Biotechnology in Plant Sciences«, University of New England, Armidale, Australia, pp. 79-90.
- Josifović M. (1970): Flora SR Srbije II, Srpska Akademija Nauka i Umetnosti, Odeljenje prirodno-matematičkih nauka, Beograd
- Khah E.M., Passam H.C. (1992): Sodium Hypochlorite Concentration, Temperature and Seed Age Influence Germination of Sweet Pepper, HortScience 27(7) (821-823)
- Király, G. & Stevanović, V. (2013): *Dianthus diutinus*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 23 October 2014.
- Kováč J. (1995): Micropropagation of *Dianthus arenarius* subsp. *bohemicus*- an endangered endemic from the Czech Republic, Botanic Gardens Micropropagation News 8 (106-108)
- Lee, Y. I., Lu, C. F., Chung, M. C., Yeung, E. C., Lee, N. (2007): Developmental changes in endogenous abscisic acid concentrations and asymbiotic seed germination of a terrestrial orchid, *Calanthe tricarinata* Lindl., Journal of American Society for Horticultural Science 132 (246-252)
- Litvinskaya, S. (2014): *Dianthus kubanensis*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 23 October 2014.
- Marković, M., Grbić, M., Djukić, M. (2013a): Micropropagation of the Endangered and Decorative Species *Dianthus serotinus* Waldst. et Kit. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca 41(2) (1-8)
- Marković M., Grbić M., Đukić M. (2013b): Primena kulture in vitro u razmnožavanju karanfila, Glasnik Šumarskog fakulteta 107, Univerzitet u Beogradu - Šumarski fakultet, Beograd (141-162)

- Marković M., Grbić M., Đukić M. (2014a): Uticaj šećernog alkohola sorbitola na razvoj izdanaka *Dianthus serotinus* Waldst. et Kit. u kulturi in vitro, Glasnik Šumarskog fakulteta 109, Univerzitet u Beogradu - Šumarski fakultet, Beograd (113-124)
- Marković M., Grbić M., Skočajić D., Đukić M. (2014b): Uticaj tipa eksplanta na ožiljavanje i aklimatizaciju vrste *Dianthus serotinus* Waldst. i Kit., Glasnik Šumarskog fakulteta 109, Univerzitet u Beogradu - Šumarski fakultet, Beograd (125-136)
- 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 (83-94)
- Marković M., Popović M. (2012a): Uticaj tipa eksplanta, sastava hranljive podloge i supstrata na ožiljavanje i aklimatizaciju vrste *Dianthus deltooides* L., Glasnik Šumarskog fakulteta 105, Univerzitet u Beogradu - Šumarski fakultet, Beograd (117-126)
- Marković M., Popović M. (2012b): Germination of *Dianthus deltooides* L. and *Dianthus pinifolius* Sibth. & Sm. in ex vitro and in vitro conditions. International Scientific Conference: 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/B&H.
- Marković, M., Grbić, M., Šindelić, A. (2006): Mogućnost mikropropagacije *Dianthus giganteiformis* ssp. *kladovanus* (Degen) Soo metodom proliferacije bočnih izdanaka. Glasnik Šumarskog fakulteta 94 (171-179)
- Melnyk, V. (2013): *Dianthus hypanicus*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 23 October 2014.
- Mijanović O. (1976): Cvećarstvo II – Cvetne kulture za uzgoj na otvorenom polju, Šumarski fakultet, Beograd
- Mikulík J. (1999): Propagation of endangered plant species by tissue cultures, Acta Universitatis Palackianae Olomucensis, Biologica 37 (27-33)
- Misic D., Maksimovic V., Todorovic S., Grubisic D., Konjevic R. (2005b): Influence of carbohydrate source on *Nepeta rtanjensis* growth, morphogenesis and nepetalactone production in vitro. Israel Journal of Plant Science 53 (103–108)
- Mišić D., Ghalawenji N., Grubišić D., Konjević R. (2005a): Micropropagation and Reintroduction of *Nepeta rtanjensis*, an Endemic and Critically Endangered Perennial of Serbia, Phytion 45 (9-20)
- Mišić D., Grubišić D., Konjević R. (2006): Micropropagation of *Salvia brachyodon* through nodal explants, Biologia Plantarum 50 (473-476)
- Miyoshi, K., Mii, M. (1998): Stimulatory effects of sodium and calcium hypochlorite, pre-chilling and cytokinins on the germination of *Cypripedium macranthos* seed in vitro, Physiologia Plantarum 102 (481–486)
- Nau, J. (1996): Ball perennial manual: Propagation and production. Ball Publishing Co., Batavia, Illinois.
- Nerseryan, A., Ali-Zade, V. (2014): *Dianthus bicolor*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 23 October 2014.
- Nerseryan, A., Ali-Zade, V., Ekim, T. (2014): *Dianthus raddeanus*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 23 October 2014.
- Paunescu, A., Holobiuc I. (2003): Conservation of endemic species *Dianthus callizonus* Schott and Kotsky using in vitro techniques, Revue Roumaine de Biologie, Serie Biologie Vegetale 48 (3–7)
- 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. et Kit.) Bunge., HortScience 47 (1123-1128)
- Plant Conservation Alliance, from: <http://www.nps.gov/plants/index.htm> (accessed 2013)

- Popović M., Grbić M., Marković M. (2008): Razmnožavanje *Dianthus deltooides* L. kulturom izdanaka, Glasnik Šumarskog fakulteta 97 (209-219)
- Radojević Lj., Čalić-Dragosavac D, Stevanović B. & Stevanović V. 2010. In vitro culture of several endemic species of genus *Dianthus* from Serbia and neighboring regions. 10th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighbouring regions, Vlasina, 17-20 June, 2010, pp. 75-76
- Radojević Lj., Špirić J, Stevanović B & Stevanović V. 2006. In vitro culture of several endemic species *Dianthus* in Balkan Peninsula. XXII Inter. Sym. Section Ornamentals 11-15 Sep. Sanremo, Italy, p 36.
- 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)
- Sabovljević A., Sabovljević M., Rakic T., Stevanovic B. (2008): Establishment of procedures for in vitro maintenance, plant regeneration and protoplast transfection of the resurrection plant *Ramonda serbica* Panč., Belgian Journal of Botany 141 (178-184)
- Sabovljević M., Vujčić M., Sinzar-Sekulić J., Segarra-Moragues J.G., Papp B., Skoric M., Dragacević L., Sabovljević A. (2012): Reviving, in vitro differentiation, development and micropropagation of the rare and endangered moss *Bruchia vogesiaca* (Bruchiaceae), HortScience 47(9) (1347–1350)
- Samuilov S., Đunisijević Bojović D., Đukić M., Raković J. (2014): Uticaj povećanih koncentracija Zn na klijanje semena i rast sejanaca *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle, Glasnik Šumarskog fakulteta 110, Univerzitet u Beogradu - Šumarski fakultet, Beograd (145-158)
- Tomović, G., Stevanović, V. (2010): Balkanski endemiti u flori jugoistočne i južne Srbije. - X Simpozijum o flori jugoistočne Srbije i susednih regiona, Apstrakti, Niš, (12-13)
- Tsoktouridis, G., Grigoriadou, K., Doua, E., Nikolaidou, A., Menexes, G., Maloupa, E. (2013): In vitro shoot proliferation, rooting, and acclimatization of four diverse *Dianthus* petraeus W. et K. genotypes using TDZ, NAA, and IBA. Propagation of Ornamental Plants, 13 (4) (181-188)
- Vasil I.K., Thorpe T.A. (1994): Plant Cell and Tissue Culture, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Vujčić M., Sabovljević A., Sinzar-Sekulić J., Skoric M., Sabovljević M. (2012): In vitro development of the rare and endangered moss *Molendoua hornschuchiana* (Hook.) Lindb. ex Limpr. (Pottiaceae, Bryophyta). HortScience 47(1) (84-87)
- Watkinson J.I., Pill W.G. (1998): Gibberellic Acid and Presowing Chilling Increase Seed Germination of Indiangrass (*Sorghastrum nutans* (L.) Nash.), HortScience 33(5) (849-851)