

UDK: 588.7:582.669(497.11)  
Originalni naučni rad

LJILJANA RADOJEVIĆ, NEVENA MARINKOVIĆ, SLAĐANA JEVREMOVIĆ

**VEGETATIVNO RAZMNOŽAVANJE U KULTURI MERISTEMA I  
SEGMENTATA STABLA *DIANTHUS PETRAEUS* WALDST. ET KIT.  
SUBSP. *NOEANUS***

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Beograd

Radojević Lj., Marinković N., Jevremović S. (1997): *Vegetative propagation from meristem and stem segment cultures of Dianthus petraeus Waldst et Kit. subsp. noeanus.* – Glasnik Instituta za botaniku i botaničke bašte Univerziteta u Beogradu, Tom XXXI, 1-7.

Plant regeneration of wild carnation, *Dianthus petraeus* subsp. *noeanus* using meristem (clone „DP”) and stem segment cultures (clone „DPS”) was obtained. Meristems were cultivated on medium  $A_1 = A_0 + \text{IBA} (0.02 \text{ mgL}^{-1}) + \text{NAA} (0.2 \text{ mgL}^{-1}) + \text{Kin} (1.0 \text{ mgL}^{-1})$  and leaf rosettes were produced. Stem segment cultures were initiated on medium  $A_3 = A_0 + 2,4\text{-D} + \text{Kin} (1.0 \text{ mgL}^{-1}, \text{ each}) + 1\text{-prolin} (250 \text{ mgL}^{-1})$  on which organogenic calli were formed. Adventitious buds were observed after transfer of organogenic callus to  $A_1$  medium. Shoots multiplication were achieved for clones „DP” and „DPS” on media  $A_1$  and  $A_2 = A_0 + \text{IBA} (0.02 \text{ mgL}^{-1}) + \text{NAA} (0.2 \text{ mgL}^{-1}) + \text{BAP} (1.0 \text{ mgL}^{-1})$ . Vitrification of shoots were observed on medium with BAP. Shoots of both clones were rooted on media  $A_4$  and  $A_5 = A_0 + \text{IBA} (0.5\text{-}1.0 \text{ mgL}^{-1}, \text{ respectively}) + \text{Kin} (0.05 \text{ mgL}^{-1})$ . Plantlets were successfully adapted and grown in the greenhouse until flowering.

Key words: *Dianthus petraeus* Waldst. et Kit., adventitious buds, meristem culture, micropropagation, stem segment culture, organogenesis.

Ključne reči: *Dianthus petraeus* Waldst. et Kit., adventivni pupoljci, kultura meristema, mikropropagacija, kultura segmenata stabla, organogeneza.

## UVOD

*Dianthus petraeus* Waldst. et Kit. subsp. *noeanus* (fam. *Caryophyllaceae*), divlji karanfil, je endemit Balkanskog poluostrva, koji pripada submezijskom flornom elementu. Ova podvrsta, razređena do gusto buscnasta, višegodišnja biljka je rasprostranjena u Istočnoj Srbiji.

Rod *Dianthus* ima oko 300 vrsta, a samo izvesne vrste koje su značajne za evćearstvo su uvedene u kulturu *in vitro* (Spinski, Beck & McCrown, 1974; Crouch & van Staden, 1993). Najčešće proučavana vrsta je *Dianthus caryophyllus* L. Prvi put, Stone (1963) je umnožavao *D. caryophyllus* kulturom meristema, koju su primenjivali i drugi autori (Davis, Baker & Hanan, 1977; Shabde & Murashige, 1977). Regeneracija biljaka hortikulturnog karanfila je dobijena u kulturi segmenata stabla (Roest & Bokelmann, 1981; Radojević, Đorđević & Petrović, 1990), kao i u kulturi listova i različitih delova cveta (Miller *et al.*, 1991; Messeguer, Arconada & Mele, 1993).

Prema dostupnoj literaturi, nema podataka da je *D. petraeus* gajen u kulturu *in vitro*. Cilj našeg rada je bio da se primeni kultura *in vitro* radi očuvanja genofonda ove vrste u prirodnom staništu, kao i mogućnost umnožavanja divljeg karanfila u hortikulturne svrhe.

U ovom radu, su prvi put predstavljeni rezultati *in vitro* vegetativnog razmnožavanja *D. petraeus* primenjujući dve tehnike: 1. kulturu meristema i 2. kulturu segmenata stabla.

## MATERIJAL I METODE

Matične biljke *Dianthus petraeus* Waldst. et Kit. subsp. *noeanus* (veličine do 30 cm) sa lokaliteta Jelasićike klisure su korišćene za uspostavljanje kulture *in vitro*. Pojedinačni izdanci su izdvojeni iz busena, a potom su sterilisani u 4% vodenom rastvoru varikine prema prethodno opisanoj proceduri (Radojević *et al.*, 1990). A. Meristemi sa dve lisne primordije (0,5 mm) su bili gajeni na A<sub>1</sub> hranljivoj podlozi za mikropropagaciju, dok su B. segmenti stabla (1-2 mm) bili kultivisani na A<sub>3</sub> podlozi za indukciju kalusa. Sve hranljive podloge su sadržale MS mineralni rastvor (Murashige & Skoog, 1962), 2% saharozu, 0,6% agar i (u mgL<sup>-1</sup>): nikotinska kiselina 1,0; pantotenska kiselina 0,5; vitamin B<sub>1</sub> 1,0; biotin 0,1; riboflavin 0,1; folna 0,01; askorbinska kiselina 10,0 i kazein hidrolizat 100 (podloga A<sub>0</sub>).

### A Podloge za kulturu meristema

Podloga za formiranje lisnih rozeta u kulturi meristema sa dve lisne primordije je bila A<sub>1</sub> = A<sub>0</sub> + IBA (0,02 mgL<sup>-1</sup>) + NAA (0,2 mgL<sup>-1</sup>) + Kin (1,0 mgL<sup>-1</sup>). Umnožavanje izdanaka preko aksilarnih pupoljaka (klon „DP”) je proučavano na podlozi A<sub>1</sub> i/ili A<sub>2</sub> = A<sub>0</sub> + IBA (0,02 mgL<sup>-1</sup>) + NAA (0,2 mgL<sup>-1</sup>) + BAP (1,0 mgL<sup>-1</sup>).

## B Podloge za kulturu segmenata stabla

Podloga A<sub>3</sub> = A<sub>0</sub> + 2,4-D (1,0 mgL<sup>-1</sup>) + Kin (1,0 mgL<sup>-1</sup>) + l-prolin (250 mgL<sup>-1</sup>) je upotrebljena za indukciju kalusa u kulturi segmenata stabla. Radi diferencijacije i razvića adventivnih pupoljaka (AP), kalusi su sukcesivno gajeni na A<sub>1</sub> podlozi. Izdanci klona „DPS”, dobijeni organogenezom, su umnožavani na A<sub>1</sub> i/ili A<sub>2</sub> podlozi.

## C Podloge za ožiljavanje izdanka

Izdanci klona „DP” i „DPS” veličine 2-3 cm, su ožiljavani na podlozi A<sub>4</sub> = A<sub>0</sub> + IBA (0,5 mgL<sup>-1</sup>) + Kin (0,05 mgL<sup>-1</sup>) i A<sub>5</sub> = A<sub>0</sub> + IBA (1,0 mgL<sup>-1</sup>) + Kin (0,05 mgL<sup>-1</sup>).

Pre autoklaviranja, svim hranljivim podlogama pH = 5,8 je bio regulisan sa 1N NaOH. Kulture su rasle na 25±2°C, pri fotoperiodu od 16 h dan/8 h mrak (Fluorescentne lampe „Tesla”, Pančevo, 65W, 4500K).

Biljke su sadene u mešavinu treseta i perlita (3:1) i gajene u staklari do potpune fiziološke zrelosti.

## REZULTATI I DISKUSIJA

Meristemi sa dve lisne primordije *Dianthus petraeus* su formirali lisne rozete na podlozi A<sub>1</sub> = A<sub>0</sub> + IBA (0,02 mgL<sup>-1</sup>) + NAA (0,2 mgL<sup>-1</sup>) + Kin (1,0 mgL<sup>-1</sup>) posle tri nedelje u kulturi. Od ukupno kultivisanih eksplantata, 30% meristema je formiralo lisne rozete, prosečne veličine do 1 cm, koje su pokazivale tendenciju umnožavanja još u ranoj fazi kulture. Umnožavanje limnih rozeta na A<sub>1</sub> i/ili A<sub>2</sub> podlozi preko aksilarnih pupoljaka, formiran je klon „DP” (Figs. 1A i 3). Za mikropropagaciju *D. caryophyllus*, najčešće korišćeni auksini su IAA ili NAA, a od citokinina, Kin ili BAP. Davis *et al.* (1977) su objavili da je najbolje umnožavanje izdanaka bilo na podlozi sa NAA (0,2 mgL<sup>-1</sup>) + Kin (1 mgL<sup>-1</sup>). Kombinacija od dva auksina (IBA i NAA), koja je bila upotrebljena u podlozi za umnožavanje kod dvanaest sorata hortikulturnog karanfila (Radojević *et al.*, 1990, 1994) primenjena je i za umnožavanje izdanaka divljeg karanfila.

Posle 15 dana u kulturi segmenata stabla divljeg karanfila, 41% eksplantata su formirali organogeni kalus sa zelenim nodulama na podlozi A<sub>3</sub> = A<sub>0</sub> + 2,4-D + Kin (1,0 mgL<sup>-1</sup>, svaki) + l-prolin (250 mgL<sup>-1</sup>). Na organogenom kalusu koji je gajen na podlozi A<sub>1</sub>, primećena je diferencijacija i formiranje AP posle 60 dana gajenja. Ovi rezultati su bili u saglasnosti sa rezultatima, Earle & Langhans, (1972) koji su koristili 2,4-D za indukciju kalusa *D. caryophyllus*, ali adventivni izdanci su se formirali posle prenošenja kalusa na podlogu sa NAA. Dalje razviće i umnožavanje AP u zelene izdanke postignuto je subkulturom na A<sub>1</sub> podlozi (Fig. 2A) i/ili na A<sub>2</sub> podlozi (Fig. 2B), što je označeno kao klon „DPS”.

Prema radovima Miller *et al.*, (1991) i Woo & Park, (1993), umesto kinetina korišćen je BAP (0,5-5 mgL<sup>-1</sup>) u podlogama za umnožavanje izdanaka. U našem radu, proučavali smo umnožavanje izdanaka oba klona divljeg karanfila sa kinetinom (podloga A<sub>1</sub>; Figs. 1A i 2A) i BAP (podloga A<sub>2</sub>; Figs. 1B i 2B). Rezultati prikazani u Tab. 1 su pokazali da je umnožavanje bilo efikasnije u prisustvu BAP za klon „DPS” sa indeksom umnožavanja 4,93, dok za klon „DP” nije bilo razlike u indeksu umnožavanja sa Kin (2,66) odnosno BAP (2,95).

Tab. 1. – Uticaj auksina i citokinina na umnožavanje izdanaka klona „DP” i „DPS”  
*Dianthus petraeus*

Effect of auxins and cytokinins on shoots multiplication of *Dianthus petraeus*, clone „DP” i „DPS”

Klon	Hranljiva podloga (hormoni u $\text{mgL}^{-1}$ )	N <sup>o</sup> kultivisanih izdanaka	N <sup>o</sup> novoformiranih izdanaka	Indeks umnožavanje
Clone	Medium (hormones in $\text{mgL}^{-1}$ )	cultivated shoots	<i>de novo</i> formed shoots	Multiplication index
"DP"	A <sub>1</sub>	103	275	2,66±0,33*
	A <sub>2</sub>	156	461	2,95±0,07
"DPS"	A <sub>1</sub>	152	454	2,98±0,41
	A <sub>2</sub>	108	533	4,93±0,68

A<sub>1</sub> = A<sub>0</sub> + IBA (0,02) + NAA (0,2) + Kin (1,0)

A<sub>2</sub> = A<sub>0</sub> + IBA (0,02) + NAA (0,2) + BAP (1,0)

\*Prosečna vrednost na osnovu četiri ponavljanja; standardna greška na nivou značajnosti  $p < 0,05$ .

\*Average value for four replicates; standard error at significance  $p < 0,05$ .

U izvesnim kulturama, kod oba klona, BAP ( $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ ) je uticao na pojavu vitrifikovanih izdanaka (Fig. 4), što nije utvrđeno kod kultura gajenih na podlozi sa Kin. Pojava vitrifikacije je poznata u literaturi kod izvesnih hortikulturnih sorata karanfila (Roest & Bokelmann, 1981). Prema rezultatima Messeguer *et al.*, (1993) koncentracija BAP veća od  $1 \text{ mgL}^{-1}$  je povećavala broj vitrifikovanih izdanaka.

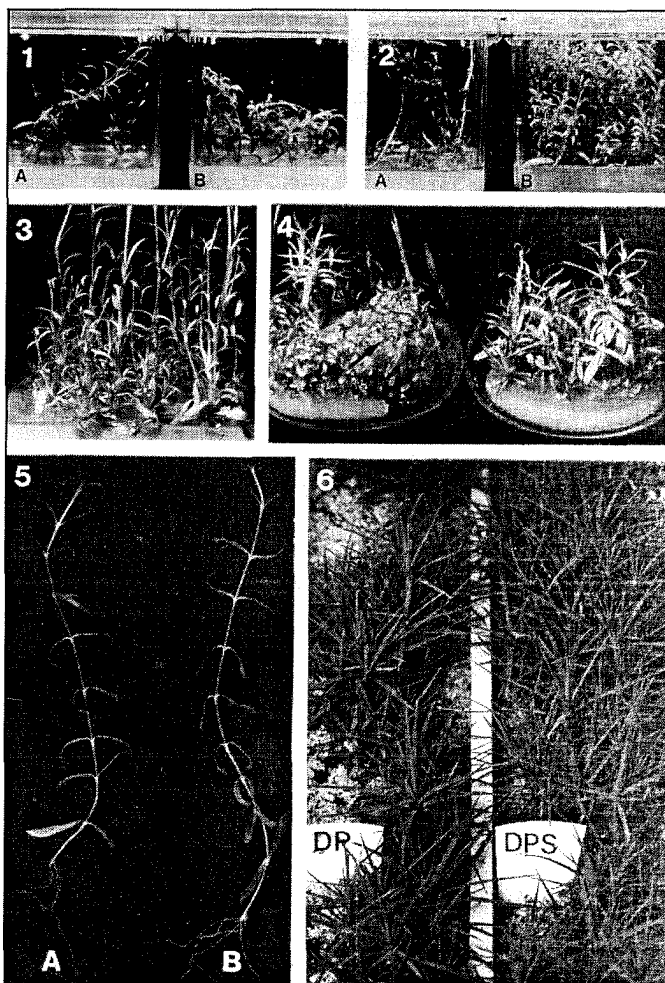
Tab. 2. – Uticaj indol-3-buterne kiseline i kinetina na ožiljavanje izdanaka *D. petraeus* (klon „DPS”)

Influence of indole-3-butyric acid and kinetine on shoots rooting of *D. petraeus* (clone „DPS”)

Hranljiva podloga (hormoni u $\text{mgL}^{-1}$ )	N <sup>o</sup> izdanaka na ožiljavanju	% ožiljenih izdanaka	N <sup>o</sup> analiziranih ožiljenih biljaka	Prosečna vrednost dužina biljke (cm)	N <sup>o</sup> dužina koren/biljci	dužina (cm)
Medium (hormones in $\text{mgL}^{-1}$ )	N <sup>o</sup> shoots on rooting	% rooted shoots	N <sup>o</sup> analyzed rooted plants	Average plant length (cm)	N <sup>o</sup> length root/plant	length (cm)
A <sub>4</sub>	63	70	60	6,42	1,76	1,40
A <sub>5</sub>	89	91	87	7,88	3,30	1,80

A<sub>4</sub> = A<sub>0</sub> + IBA (0,5) + Kin (0,05)

A<sub>5</sub> = A<sub>0</sub> + IBA (1,0) + Kin (0,05)



Figs. 1-6. – Mikropropagacija *Dianthus petraeus*. Fig. 1. – Izdanci klona „DP” u ranoj fazi umnožavanja na podlozi A<sub>1</sub> (Fig. 1 A) i A<sub>2</sub> (Fig. 1 B); Fig. 2. – Umnožavanje „DPS” na podlozi A<sub>1</sub> (Fig. 2 A) i podlozi A<sub>2</sub> (Fig. 2 B); Fig. 3. – Izdanci klona „DP” u kasnijoj fazi umnožavanja na podlozi A<sub>1</sub>; Fig. 4. – Vitifikovani izdanci, (strelica) klona „DPS” na podlozi A<sub>2</sub>; Fig. 5. – Ožiljene biljčice klona „DPS” sa A<sub>4</sub> (Fig. 5 A) i A<sub>5</sub> podloge (Fig. 5 B); Fig. 6. – Biljke karantila klona „DP” i „DPS” u kasnoj fazi aklimatizacije.

Micropropagation of *Dianthus petraeus* Fig. 1. – Shoots of clone „DP” in early multiplication phase on A<sub>1</sub> (Fig. 1 A) and A<sub>2</sub> medium (Fig. 1 B); Fig. 2. – Shoot multiplication of clone „DPS” on A<sub>1</sub> (Fig. 2 A) and A<sub>2</sub> medium (Fig. 2 B); Fig. 3. – Shoots of clone „DP” in later multiplication phase in A<sub>1</sub> medium;

Fig. 4. – Shoots vitrification, (arrow) of „DPS” clone on A<sub>2</sub> medium; Fig. 5. – Rooted plants of „DPS” clone from A<sub>4</sub> (Fig. 5 A) and A<sub>5</sub> medium (Fig. 5 B); Fig. 6. – Plants of carnation clone „DP” and „DPS” in greenhouse during acclimatization.

Izdanci karanfila, u kulturi *in vitro*, se najčešće ožiljavaju na podlogama bez hormona (Leshem, 1986) ili sa auksinima (Petru & Landa, 1974). Izdanci divljeg karanfila, su ožiljavani na podlozi  $\Lambda_4$  i  $\Lambda_5 = \Lambda_0 + \text{IBA}$  ( $0,5-1,0 \text{ mgL}^{-1}$ , respektivno) + Kin ( $0,05 \text{ mgL}^{-1}$ ). Ožiljavanje izdanaka (7 i 27%) klona „DP” je bilo slabije, nego kod izdanaka klona „DPS” (70 i 91%, Tab. 2). Kod oba klona, procenat ožiljavanja je bio veći pri IBA ( $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ ). Pored toga, kod klona „DPS”, IBA je povećavala dužinu i broj korenova i veličinu biljke (Tab. 2, Fig. 5). Ovi rezultati su slični rezultatima ožiljavanja kod *cv. D. caryophyllus* (Radojević *et al.*, 1990; 1994).

Aklimatizovane biljke klona „DP” (90%) i „DPS” (100%) su odgajane u staklari do potpune fiziološke zrelosti i imale su sličnu žbunastu formu i boju cvetova kao biljke iz prirodnog staništa (Fig. 6).

Naši rezultati pokazuju da se ove dve tehnike *in vitro* mogu uspešno koristiti za vegetativno razmnožavanje divljeg karanfila, jer se regeneracija izdanaka odvijala brzo. Sličan morfogenetski odgovor divljeg karanfila u kulturi *in vitro* u odnosu na odgovore sorata hortikulturnog karanfila, nam ukazuje da se i druge značajne spp. *Dianthus* mogu vegetativno razmnožavati po jednom od ovih protokola.

#### ZAHVALNICA

Najsrdahnije se zahvaljujemo prof. dr V. Stevanović za dostavljanje biljnog materijala iz prirodnog staništa.

Rad je finansiran od strane Ministarstva za nauku i tehnologiju Srbije, projekat 03E21.

#### LITERATURA

- Chouch, N.R. & van Staden, J. (1993): *In vitro* culture of *Dianthus zeyheri* sub. *natalensis*, a South African carnation. – *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 35, 81-85.
- Davis, M.J., Baker, R. & Hanan, J.J. (1977): Clonal multiplication of carnation by micro-propagation. – *J. Am. Soc. Hort Sci.* 102, 48-53.
- Earle, E.D. & Langhaus, R.W. (1975): Carnation propagation from shoot tips cultured in liquid medium. – *Hort Science* 10, 608-610.
- Leshem, B. (1986): Carnation plantlets from vitrified plants as a source of somaclonal variation. – *Hort Science* 21, 320-321.
- Messeguer, J., Arconada, M.C. & Mele, E. (1993): Adventitious shoot regeneration in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). – *Scientia Horticulturae* 54, 153-163.
- Miller, R.M., Kaul, V., Hutchinson, J.F., Maheswaran, G. & Richards, D. (1991): Shoot regeneration from fragmented flower buds of carnation (*Dianthus caryophyllus*). – *Ann. Bot.* 68, 563-568.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. – *Physiol. Plant.* 15, 473-497.
- Petru, E. & Landa, Z. (1974): Organogenesis in isolated carnation plant callus tissue cultivated *in vitro*. – *Biol. Plant.* 16, 450-453.
- Radojević, Lj., Đorđević, N. & Petrović, J. (1990): *In vitro* culture techniques for carnation breeding. – *Acta Horticulture* 280, 163-168.
- Radojević, Lj., Marinković, N., Zdravković-Korać, S. & Jevremović, S. (1994): Primena različitih postupaka *in vitro* kulture u mikropropagaciji afričke ljubičice, hrizanteme i karanfila. – *Savremena poljoprivreda* 42(6), 117-128.
- Roest, S. & Bokelmann, G.S. (1981): Vegetative propagation of carnation *in vitro* through multiple shoot development. – *Sci. Hort.* 14, 357-366.
- Shabde, M. & Murashige, T. (1977): Hormonal requirements of excised *Dianthus caryophyllus* L. shoot apical meristem *in vitro*. – *Amer. J. Bot.* 64(4), 443-448.

- Spinski, P., Beck, G.E. & McCrown, B.H. (1974): Callus cultures of *Dianthus* species. – Hort Science 9, 14.
- Stone, O.M. (1963): Factors affecting the growth of carnation plants from shoot apices. – Ann. Appl. Biol. 52, 199-209.
- Woo, S.H. & Park, J.M. (1993): Multiple shoot culture of *Dianthus caryophyllus* using mist culture system. – Bio. Tech. 7(10), 697-702.

### Summary

LJILJANA RADOJEVIĆ, NEVENA MARINKOVIĆ, SLADANA JEVREMOVIĆ

#### VEGETATIVE PROPAGATION FROM MERISTEM AND STEM SEGMENT CULTURES OF *DIANTHUS PETRAEUS* WALDST. ET KIT. SUBSP. *NOEANUS*

Institute for Biological Research „Siniša Stanković,” Belgrade

Plant regeneration of *Dianthus petraeus* subsp. *noeanus* was achieved through micropropagation from meristem culture (clone „DP”) and from adventitious buds regenerated from organogenic calli in stem segments culture (clone „DPS”). Meristems consisting of two leaf primordia formed numerous leaf rosettes on medium  $A_1 = A_0 + \text{IBA} (0.02 \text{ mgL}^{-1}) + \text{NAA} (0.2 \text{ mgL}^{-1}) + \text{Kin} (1.0 \text{ mgL}^{-1})$ . Stem segments were cultivated on  $A_3 = A_0 + 2,4\text{-D} (1.0 \text{ mgL}^{-1}) + \text{Kin} (1.0 \text{ mgL}^{-1}) + \text{l-prolin} (250 \text{ mgL}^{-1})$  on which they subsequently formed organogenic calli. After transfer of organogenic calli on  $A_1$  medium adventitious buds were observed. Multiplication of shoots, of clone „DP” and „DPS” were achieved on media  $A_1$  and/or  $A_2 = A_0 + \text{IBA} (0.02 \text{ mgL}^{-1}) + \text{NAA} (0.2 \text{ mgL}^{-1}) + \text{BAP} (1.0 \text{ mgL}^{-1})$ . Shoots of both clone were rooted on media  $A_4$  and  $A_5 = A_0 + \text{IBA} (0.5\text{-}1.0 \text{ mgL}^{-1}, \text{ respectively}) + \text{Kin} (0.05 \text{ mgL}^{-1})$ . Rooting for clone „DP” (7 and 27%) and „DPS” (70 and 91%) depended on the concentration of IBA (0.5-1.0, respectively). Carnation plantlets were grown in the greenhouse until flowering.