

UNIVERZITET U BEOGRADU

ŠUMARSKI FAKULTET

Marija J. Markovi

Razmnožavanje nekih ugroženih vrsta
karanfila (*Dianthus* L.) metodom
mikropropagacije

doktorska disertacija

Beograd, 2014.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF FORESTRY

Marija J. Markovi

Propagation of some endangered
carnation species (*Dianthus* L.) using
micropropagation method

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014.

Mentor:

Dr Mihailo Grbić, redovni profesor
Univerziteta u Beogradu - Šumarskog fakulteta

Komisija:

Dr Matilda Đukić, redovni profesor
Univerziteta u Beogradu - Šumarskog fakulteta

Dr Jelena Tomićević-Dubljević, vanredni profesor
Univerziteta u Beogradu - Šumarskog fakulteta

Dr Dragana Stojičić, vanredni profesor
Univerziteta u Nišu - Prirodno matematičkog fakulteta

Dr Danijela Đunisijević-Bojović, docent
Univerziteta u Beogradu - Šumarskog fakulteta

Датум одбране:

KLJUČNA DOKUMENTACIONA INFORMACIJA

Redni broj (RB)	
Identifikacioni broj (IBR)	
Tip dokumenta (TD):	Monografska publikacija
Tip zapisa (TZ):	Tekstualni štampani dokument
Vrsta rada (VR):	Doktorska disertacija
Autor (AU):	Mr Marija Marković
Mentor / Ko-mentor (MN):	Dr Mihailo Grbić, redovni profesor Univerziteta u Beogradu - Šumarskog fakulteta
Naslov rada (NR):	Razmnožavanje nekih ugroženih vrsta karanfila (<i>Dianthus L.</i>) metodom mikropropagacije
Jezik publikacije (JZ):	Srpski / latinica
Jezik izvoda (JI):	Srpski / engleski
Zemlja publikovanja (ZP):	Srbija
Geografsko područje (UGP):	Srbija
Godina (GO):	2014
Izdavač (IZ):	Autorski reprint
Mesto i adresa (MA):	11 030 Beograd, Kneza Višeslava 1
Fizički opis rada (br.pogl./str./tab./sl./graf . / /pril.):	7 poglavlja, 287 stranica, 312 literaturnih navoda, 149 tabela, 33 slike
Naučna oblast (NO):	Biotehničke nauke
Uža naučna oblast:	Pejzažna arhitektura i hortikultura
UDK:	
Čuva se (ČU):	Biblioteka Šumarskog fakulteta, Kneza Višeslava 1, 11030 Beograd, Srbija
Važna napomena (VN):	Nema

RAZMNOŽAVANJE NEKIH UGROŽENIH VRSTA KARANFILA (*DIANTHUS* L.) METODOM MIKROPROPAGACIJE

Rezime

Cilj sprovedenih istraživanja bio je utvrđivanje potpunog i detaljnog protokola mikropropagacije ugroženih taksona *D. serotinus*, *D. pinifolius* i *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* ime bi bilo omogućeno brzo i efikasno dobijanje velikog broja biljaka, bez pritiska na prirodnu populaciju. Sterilna kultura *in vitro* uspešno je uspostavljena korišćenjem semena kao polaznog materijala, što omogućava očuvanje genetske varijabilnosti populacije, a klijavost semena je bila visoka: 88% - *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*, 92% - *D. pinifolius* i 96% - *D. serotinus*. U fazi multiplikacije ispitano je dejstvo različitih koncentracija fitohormona BAP i NAA, tipa eksplanta, koncentracije MS soli i različite pH vrednosti hranljive podloge. Kod sva tri ispitivana taksona najuspešnija regeneracija izdanaka je bila na podlogama sa niskom koncentracijom hormona: 0,44 μM BAP i 0,54 μM NAA, uz korišćenje vršnih reznica kao tipa eksplanta. Kod *D. serotinus* i *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* povoljnije su se pokazale podloge sa 1/2MS koncentracijom mineralnih soli, dok kod *D. pinifolius* treba koristiti MS podloge.

Optimalna pH vrednost hranljive podloge u fazi multiplikacije za *D. pinifolius* iznosi 5,8. Suprotno očekivanjima za *D. serotinus*, koji na svom prirodnom staništu raste na alkalnom zemljištu (pH = 8,0), optimalna pH vrednost podloge takođe je 5,8, dok su zadovoljavajući i rezultati postignuti i pri pH = 6,8. *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* se uspešno može gajiti na podlogama čija je pH vrednost 5,8 ili 6,3. Povećanje pH vrednosti podloga uticalo je na pojavu vitifikacije, inhibiranje rasta izdanaka i na pojavu nekroza.

Kod sva tri ispitivana karanfila, najpovoljnijom se pokazala saharoza u koncentraciji 30 gL^{-1} kao izvor ugljenika u podlogama za umnožavanje izdanaka, a zadovoljavajući i rezultati su dobijeni i korišćenjem 30 gL^{-1} dekstroze, dok fruktozu treba izbegavati. Takođe, pokazano je da opadanje pH vrednosti nakon autoklaviranja zavisi

od vrste i koncentracije še era i da najmanje opada kada se koristi saharoza, a najviše ukoliko je u podlozi fruktoza.

Ožiljavanje eksplanta *in vitro* bilo je uspešno kod sva tri ispitana taksona *D. serotinus* (86%), *D. pinifolius* (96%) i *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* (95%). Podloge za ožiljavanje treba da sadrže 2,68 μ M NAA, ali *D. serotinus* i *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* treba ožiljavati na podlogama sa 1/2MS koncentracijom soli, a *D. pinifolius* treba ožiljavati na MS podlogama. Tako e, kod *D. serotinus* kao eksplante u fazi ožiljavanja koristiti nodusne reznice i terminalne pupoljke, kod *D. pinifolius* uspešno se mogu koristiti nodusne, vršne reznice i terminalni pupoljci, a pri ožiljavanju *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* koristiti vršne reznice. Ožiljavanje na podlogama bez agara istovremeno sa aklimatizacijom, uz dodatak sterilnog peska ili perlita kao potporne komponente se ne preporu uje ni kod jednog od ispitivanih karanfila zbog velikog procenta nekrotiranih izdanaka.

Aklimatizaciju ožiljenih *in vitro* biljaka na prirodne supstrate treba vršiti u mešavini treseta i peska u odnosu 4 : 1, pri emu je postignuti procenat aklimatizacije prelazio 88% kod *D. serotinus*, 95% kod *D. pinifolius* i dostigao je 90% kod *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*. Sadni materijal dobijen tokom ovih istraživanja je vitalan, a aklimatizovane biljke su naredne godine cvetale i produkovale seme visoke klijavosti: *D. serotinus* (94,3%), *D. pinifolius* (72%) i *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* (68%).

Ključne reči: *D. serotinus*, *D. pinifolius*, *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*, kultura *in vitro*, ugrožene vrste, izvor ugljenika, pH vrednost podloge, ožiljavanje *in vitro* i *ex vitro*, aklimatizacija

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number (ANO):	
Identification number (INO):	
Document type (DT):	Monograph documentation
Type of record (TR):	Textual printed document
Contents code (CC):	Doctoral dissertation
Author (AU):	M. Sc. Marija Marković
Menthor (MN):	Ph. D. Mihailo Grbić, full professor of University of Belgrade – Faculty of Forestry
Title (TI):	Propagation of some endangered carnation species (<i>Dianthus</i> L.) using micropropagation method
Language of text (LT):	Serbian/ Latin alphabet
Language of abstract (LA):	Serbian / English
Country of publication (3II):	Serbia
Locality of publication (LP):	Belgrade
Publication year (PY):	2014
Publisher (PU):	The authors reprint
Publication place (PP):	11 030 Belgrade, Kneza Višeslava 1
Physical description (PD):	7 chapters, 287 pages, 312 references, 149 tables, 33 figures
Scientific field (SF):	Biotechnological sciences
Scientific discipline (SD):	Landscape architecture and horticulture
UC:	
Holding data (HD):	Library of Faculty of Forestry, Kneza Višeslava 1, 11030 Belgrade
Note (N):	-

PROPAGATION OF SOME ENDANGERED CARNATION SPECIES (*DIANTHUS* L.) USING MICROPROPAGATION METHOD

Summary

The aim of conducted research was to determine the complete and detailed protocol for the micropropagation of endangered taxa *D. serotinus*, *D. pinifolius* i *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*. In that way, rapid and efficient propagation of large number of plants will be enabled, without overharvesting of the natural populations. Sterile *in vitro* culture was established using the seed as a initial material, and the germination *in vitro* was high: 88% - *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*, 92% - *D. pinifolius* i 96% - *D. serotinus*.

In the multiplication phase, the effect of different concentrations of phytohormones BAP and NAA, explant type, concentration of MS salts and influence of different pH value of the media, were investigated. The most successfull shoot regeneration of all three investigated taxa was on the media supplemented with low hormone concentration: 0,44 μM BAP and 0,54 μM NAA, when terminal cuttings were used as explants. For micropropagation of *D. serotinus* and *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* best results were achieved on half-strength MS media, however, for *D. pinifolius* the MS concentration of mineral salts should be used.

The optimal pH value in the multiplication phase for *D. pinifolius* is 5.8. The species *D. serotinus* grows on alkaline soils (pH = 8,0) in its natural habitat, but contrary to expectations, the optimal pH value of medium was 5.8, and the good results was also achieved on media with pH = 6.8. *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* can be grown successfully on media with pH value 5.8 or 6.3. Increasing the pH value of the media caused vitrifications, inhibitions of growth and shoot necrosis.

Regarding carbohydrate source, for all three investigated taxa, the best results were obtained using 30 gL^{-1} sucrose, and the good results were also achieved on media supplemented with 30 gL^{-1} glucose. However, adding fructose in the multiplication media should be avoided. Also, research showed that decrease of pH value after autoclaving depends on type and concentration of the sugar, and the decreasing is minimal when sucrose is added in media, and it is maximal when the fructose is added.

The rooting of explants *in vitro* was successful for all three investigated taxa: *D. serotinus* (86%), *D. pinifolius* (96%) i *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* (95%). The rooting media should be supplemented with 2,68 μ M NAA. However, *D. serotinus* and *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* should be rooted on half strength MS media, and *D. pinifolius* should be rooted on MS media. Also, the nodal cuttings and terminal buds should be used as rooting explants of *D. serotinus*, nodal and terminals cuttings as well as terminal buds could be used equally for rooting of *D. pinifolius*, and for rooting of *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* the terminal cuttings should be used. Rooting of explants on agar-free media together with acclimatization, with addition of sterile sand or perlite as a support component, should be avoided due to high percent of necrotic explants.

The acclimatization of rooted *in vitro* plants on natural substrates should be performed in mixture of peat and sand (4: 1). The acclimatization rate of *D. serotinus* was more than 88%, *D. pinifolius* - 95%, and *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* - 90%. Survived plants obtained during this investigations were vigorous, they flowered the next year, producing the seeds which germinated in high rate: *D. serotinus* (94,3%), *D. pinifolius* (72%) i *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* (68%).

Key words: *D. serotinus*, *D. pinifolius*, *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*, *in vitro* culture, endangered species, carbohydrate source, pH value of the media, rooting *in vitro* and *ex vitro*, acclimatization

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. TAKSONOMSKE, BIOLOŠKE I EKOLOŠKE KARAKTERISTIKE ISTRAŽIVANIH TAKSONA	6
1.1.1. Rod <i>Dianthus</i> L.	6
1.1.1.1. <i>Dianthus serotinus</i> Waldst. et Kit.	8
1.1.1.2. <i>Dianthus pinifolius</i> Sibth. et Sm.	11
1.1.1.3. <i>Dianthus giganteiformis</i> Borbas subsp. <i>kladovanus</i> (Degen) Soo	14
1.2. RAZMNOŽAVANJE KARANFILA KONVENCIONALNIM METODAMA	17
1.2.1. Generativno razmnožavanje	17
1.2.2. Vegetativno razmnožavanje	20
1.3. RAZMNOŽAVANJE KARANFILA KULTUROM <i>IN VITRO</i>	23
1.3.1. Istorijat, klasifikacija i metode biljne kulture <i>in vitro</i>	23
1.3.1.1. Kultura intaktne biljke.....	27
1.3.1.2. Kultura embriona.....	28
1.3.1.3. Kultura organa.....	30
1.3.1.4. Kultura kalusa.....	34
1.3.1.5. Kultura elija i protoplasta	35
1.3.2. Sinteti ko seme.....	37
1.3.3. Banke gena	37
1.3.4. Faze razmnožavanja u kulturi <i>in vitro</i>	38
1.3.2.1. Inicijalna faza	38
1.3.2.2. Multiplikacija izdanaka	39
1.3.2.3. Formiranje korenova i aklimatizacija biljaka.....	41
1.3.5. Komponente medijuma	44
1.4. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA	47
1.4.1. Primena kulture <i>in vitro</i> u razmnožavanju <i>Dianthus</i> spp.	47
1.4.1.1. Razmnožavanje ugroženih vrsta karanfila	50

1.5. STRATEGIJA REINTRODUKCIJE DOBIJENIH BILJAKA NA PRIRODNA STANIŠTA	52
1.5.1. Reintrodukcija - osnove i principi.	53
1.5.1.1. Faktori koje treba razmotriti prilikom reintrodukcije.....	53
2. CILJ RADA	62
3. MATERIJAL I METOD RADA	63
3.1. INICIJALNI MATERIJAL ZA KULTURU <i>IN VITRO</i>	63
3.2. HRANLJIVE PODLOGE I USLOVI ZA RAZVOJ KULTURA	65
3.3. USPOSTAVLJANJE STERILNE KULTURE	67
3.4. FAZA MULTIPLIKACIJE	67
3.4.1. Uticaj balansa hormona na razvoj izdanaka	68
3.4.2. Uticaj pH vrednosti hranljive podloge na razvoj izdanaka	69
3.4.3. Uticaj koncentracije i vrste šeera na razvoj izdanaka.....	71
3.5. FAZA OŽILJAVANJA	73
3.6. AKLIMATIZACIJA DOBIJENIH <i>IN VITRO</i> BILJAKA.....	74
3.7. MERENI PARAMETRI I STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	76
4. REZULTATI.....	78
4.1. USPOSTAVLJANJE STERILNE KULTURE	78
4.2. FAZA MULTIPLIKACIJE ISPITANIH TAKSONA: <i>D. SEROTINUS</i> , <i>D. PINIFOLIUS</i> I <i>D. GIGANTEIFORMIS SSP. KLADOVANUS</i>	78
4.2.1. Uticaj balansa hormona na razvoj izdanaka	78
4.2.1.1. Vitalnost eksplanata	78
4.2.1.2. Broj izdanaka.....	96
4.2.1.3. Dužina izdanaka	102
4.2.1.4. Broj nodusa.....	112
4.2.1.5. Dužina internodija	118
4.2.2. Uticaj pH vrednosti hranljive podloge na razvoj izdanaka <i>D. serotinus</i> , <i>D. pinifolius</i> , <i>D. giganteiformis ssp. kladovanus</i>	124
4.2.2.1. Vitalnost eksplanata	124
4.2.2.2. Broj izdanaka.....	136
4.2.2.3. Dužina izdanaka	141

4.2.2.4. Broj nodusa.....	148
4.2.3. Uticaj vrste i koncentracije še era na razvoj izdanaka <i>D. serotinus</i> , <i>D. pinifolius</i> i <i>D. giganteiformis</i> ssp. <i>kladovanus</i>	154
4.2.3.1. Vitalnost eksplanata	154
4.2.3.2. Broj izdanaka.....	169
4.2.3.3. Dužina izdanaka	176
4.2.3.4. Broj nodusa.....	187
4.2.3.5. Promena pH vrednosti podloge nakon autoklaviranja i gajenja kulture	192
4.3. FAZA OŽILJAVANJA ISPITANIH TAKSONA	195
4.3.1. Ožiljavanje na podlogama sa agarom.....	196
4.3.1.1. Procenat ožiljavanja	196
4.3.1.2. Broj korenova	202
4.3.1.3. Dužina najdužeg korena	208
4.3.2. Ožiljavanje na podlogama bez agara.....	211
4.4. FAZA AKLIMATIZACIJE BILJAKA DOBIJENIH <i>IN VITRO</i>	225
5. DISKUSIJA	234
5.1. USPOSTAVLJANJE STERILNE KULTURE	234
5.2. FAZA MULTIPLIKACIJE	236
5.2.1. Uticaj balansa hormona na razvoj izdanaka	236
5.2.2. Uticaj pH vrednosti hranljive podloge na razvoj izdanaka	241
5.2.3. Uticaj koncentracije i vrste še era na razvoj izdanaka.....	244
5.3. OŽILJAVANJE.....	250
5.3.1. Ožiljavanje na podlogama sa agarom.....	250
5.3.2. Ožiljavanje na podlogama bez agara.....	252
5.4. AKLIMATIZACIJA	253
6. ZAKLJU CI	254
7. LITERATURA	259

1. UVOD

Posljednjih decenija zaštita biodiverziteta sve više dobija na značaju. Na osnovu sprovedenih naučnih analiza i studija donose se odgovarajuća pravna akta (zakoni, uredbе, naredbe, deklaracije, kodeksi, konvencije, rezolucije, strategije) na međunarodnom ili nacionalnom nivou, na osnovu kojih se različitim vrstama, u zavisnosti od stepena i karaktera ugroženosti dodeljuje odgovarajuć i nivo pravne zaštite. Među značajnim međunarodnim dokumentima mogu se izdvojiti:

- Deklaracija Ujedinjenih nacija o životnoj sredini (Declaration of the United Nations Conference on the Human Environment) koja je doneta na prvoj Konferenciji Ujedinjenih Nacija o životnoj sredini u Stokholmu, 1972. godine. U njoj je istaknuta neophodnost očuvanja vode, vazduha, zemljišta, flore, faune i reprezentativnih ekosistema za dobrobit sadašnjih i budućih generacija. (United Nations Environment Programme, <http://www.unep.org>, 2012);
- Deklaracija o očuvanju flore, faune i njihovih staništa (Declaration on Conservation of Flora, Fauna, and Their Habitats) usvojene od strane ekonomske komisije za Evropu UN. Ova deklaracija reguliše pravila ponašanja prema ugroženim vrstama flore i faune od međunarodnog značaja u cilju njihovog očuvanja. Pri tome pod vrstama od međunarodnog značaja se podrazumevaju vrste uključene u "Evropsku crvenu listu" globalno ugroženih vrsta. (ECE - United Nations Economic Commission for Europe, 1988).
- Konvencija o međunarodnoj trgovini ugroženim vrstama samonikle flore i faune (The Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora) koja predstavlja sporazum potpisan još daleke 1973. u Vašingtonu kojim se obezbeđuje međunarodna saradnja u zaštiti određenih vrsta

divlje faune i flore od prekomerne eksploatacije putem međunarodnog prometa. (<http://www.cites.org/>).

- Konvencija o svetskoj baštini (The World Heritage Convention) koja je stupila na snagu 1975. godine (<http://whc.unesco.org/en/conventiontext>). Ovom konvencijom se štiti kulturno i prirodno nasleđe od izuzetne svetske vrednosti.

- Konvencija o zaštiti "divljih vrsta" i prirodnih staništa Evrope (Convention on the conservation of European wildlife and natural habitats), tzv. Bernska konvencija iz 1979. godine i njeni sporazum o očuvanju vrsta flore i faune u prirodi i njihovih prirodnih staništa, naročito onih kojima zaštita zahteva međunarodnu saradnju (Council of Europe, <http://www.coe.int>, 2012).

Postojanje navedenih dokumenata i činjenica da uprkos tome što su davno potpisani nisu izgubili na aktuelnosti ukazuju na ogroman i globalan značaj očuvanja biodiverziteta. U skladu sa tim, zaštita prirode odnosno očuvanje biodiverziteta u Srbiji je regulisano odgovarajućim zakonima. Donet je Zakon o zaštiti prirode (Službeni glasnik RS 36/09) kao i Pravilnik o proglašenju i zaštiti strogo zaštićenih i zaštićenih divljih vrsta biljaka, životinja i gljiva (Službeni glasnik RS 05/10).

Poslednjih godina kod nas se sve intenzivnije radi na zaštiti i unapređenju životne sredine i usmeravanju pažnje na postojeće probleme i njihovo rešavanje (Tomčević et al., 2010a, 2010b, 2011). Bogata i raznovrsna flora Balkanskog poluostrva izuzetno je osetljiva i ranjiva u odnosu na različite negativne antropogene uticaje. U flori Srbije je 171 vrsta uključena u kategoriju izuzetno ili krajnje ugroženih biljaka, što čini oko 5 % ukupne flore Srbije. Od toga, pet vrsta je nepovratno izgubljeno, s obzirom na to da su pre izumiranja bile nastanjene samo na teritoriji Srbije. Takođe, 121 vrsta u Srbiji pripada grupi krajnje ugroženih taksona i sa velikom verovatnošću može očekivati da u bliskoj budućnosti one nestanu sa naših prostora, ukoliko im se ne posveti posebna pažnja. Kao posledica vekovnih antropogenih dejstava na velikom području Srbije pogodnom za poljoprivredu, najviše su stradala močvarna staništa, slatine, stepski, šumostepski i pešački ekosistemi, kao i biljke koje su živjele na njima (Lakušić, 1999).

Jedan od prvih koraka ka zaštiti ugroženih vrsta kod nas bilo je formiranje crvene liste vrsta različitih stepena ugroženosti na Katedri za ekologiju biljaka

Biološkog fakulteta u Beogradu u saradnji sa drugim institucijama (Prirodna ki muzej). Rezultat ovog rada je ve objavljn kao prvi deo specijalizovane publikacije – Crvena knjiga flore Srbije, koja sadži procenu stanja ugroženosti biljnih vrsta i predstavlja osnovu za sprovo enje mera njihove zaštite. Do danas su publikovana brojna istraživanja koja se bave razmnožavanjem ugroženih taksona, naj eš e metodom mikropropagacije koji se pokazao kao vrlo efikasan za brzo umnožavanje odabranog taksona, bez pritiska na prirodnu populaciju prilikom uzimanja polaznog materijala (Fay, 1992, 1994, Pence, 1999, Guerrant et al., 2004). Zbog toga u mnogim botani kim baštama i me unarodnim organizacijama, kao što su The European Botanic Gardens Consortium, koji obuhvata oko 800 botani kih bašti Evrope (<http://www.botanicgardens.eu>), Botanic Gardens Conservation International, iji lanovi su oko 700 botani kih bašti iz 118 zemalja sveta (<http://www.bgci.org>) ili Plant Conservation Alliance (<http://www.nps.gov/plants/index.htm>), postoje programi za *ex situ* konzervaciju ugroženih taksona koji obuhvataju i njihovo razmnožavanje mikropropagacijom. Samo u Kraljevskoj botani koj bašti Kju u Velikoj Britaniji (The Royal Botanic Gardens, Kew) do 1998. godine bilo je preko 500 ugroženih vrsta koje su razmnožene kulturom tkiva u cilju njihove *ex situ* zaštite (Fay i Chase, 1998).

U Srbiji su do danas sprovedena istraživanja koja se bave mikropropagacijom ugroženih biljnih vrsta, me u kojima su i balkanski endemit i terciarni relikv *Ramonda serbica* Pan i (Sabovljevi et al., 2008), *Nepeta rtanjensis* Dikli et Milojevi (Miši et al., 2005a, 2005b), *Rindera umbellata* (Waldst. et Kit.) Bunge (Peri et al., 2012), balkanski endemit *Salvia brachyodon* Vandas (Miši et al., 2006), kao i mnoge druge uklju uju i i neke retke i ugrožene vrste mahovina (Vuji i et al., 2012, Sabovljevi et al., 2012).

Posmatraja i ugrožene vrste koje su svrstane u Crvenu knjigu flore Srbije i vode i se potrebom da se one razmnože, a imaju i u vidu zna aj autohtonih vrsta prilikom formiranja zelenih prostora specijalne namene kao što su zašti ena prirodna dobra, nacionalni parkovi, rezervati prirode, spomenici prirode i dr. (Buslaff, Johnson, 2004, Mariner et al., 2004, Hitchmough, 2008, US Forest Service - Native gardening, 2012, Naturescape British Wild Flowers, 2012; United States Environmental Protection Agency - Greenscapes, 2012) rešeno je da se prilikom odabira ugroženih vrsta koje e se razmnožiti mikropropagacijom da prednost onima koje se

odlikuju dekorativnoš u što ih kvalifikuje za koriš enje u pejzažnoj arhitekturi i hortikulturi. Time se postiže puno prednosti: biljke se sade u uslovima na koje su se prirodno ve adaptirale, zbog ega zahtevaju manje nege u odnosu na selekcionisane kultivare, a otpornije su od kultivara na nepovoljne uslove (neredovno zalivanje, siromašan supstrat), kao i na bolesti i šteto ine. Pored toga, one su zna ajne za sopstveni i okolne ekosisteme jer prirodno u estvuju u njihovom funkcionisanju (na primer seme ili plodovi mogu biti hrana autohtonim insektima ili pticama). Ukoliko se ovim vrstama daje prednost, smanjuje se šansa za naturalizaciju neofita, ime se spre ava širenje potencijalno invazivnih biljaka, što danas predstavlja veliki problem (McNeely et al., 2001, Kew, Global Strategy for Plant Conservation, 2010, Tomi evi , et al., 2012). Tako e, "prirodni" vrtovi omogu avaju uvanje genofonda samoniklih vrsta koje postepeno iš ezavaju usled brojnih neminovnih okolnosti (širenje naselja, obradivih površina, intenzivna ispaša, urbanizacija, klimatske promene). (Buslaff i Johnson, 2004; US Forest Service - Native gardening, <http://www.fs.fed.us/wildflowers/nativegardening/>, 2012; Naturescape British Wild Flowers, <http://www.naturescape.co.uk/gardening.htm>, 2012; California Native Plants Society, <http://www.cnps.org>, 2012; United States Environmental Protection Agency - Greenscapes, <http://www.epa.gov/osw/consERVE/rrr/greenscapes/index.htm>, 2012).

Sadnja autohtonih biljaka u "prirodnim vrtovima", pored o uvanja njihovog genofonda, zna ajna je i u procesu aktivne restauracije prirodnih predela, što podrazumeva unošenje i širenje biljnih vrsta koje pripadaju klimatogenim ili klimazonalnim zajednicama tog podru ja (Grbi , 1996). Štaviše, Grbi (1996) isti e da je pri ovakvim poduhvatima neophodno dati prednost lokalnim genotipovima koji su fenološki potpuno prilago eni uslovima staništa.

Vrste koje spadaju u ovu kategoriju su i autohtoni karanfili: *Dianthus serotinus* Waldst. et Kit., *D. pinifolius* Sibth. et Sm. i podvrsta *D. giganteiformis* Borbás subsp. *kladovanus* (Degen) Soo. Zbog svojih karakteristika, dekorativnosti i malih zahteva za negom, navedeni taksoni su pogodni za sadnju u zelenim prostorima pejzažnog stila. S obzirom da su u pitanju ugrožene vrste, razmnožavanje biljaka poreklom sa prirodnih staništa bi pomoglo njihovoj *ex-situ* zaštiti, omogu ila bi se sadnja na prirodno stanište u cilju pove anja brojnosti populacije koja ima tendenciju opadanja, a dobijene biljke bi mogle da se iskoriste i za oboga ivanje fonda botani kih bašti kao jednog od na ina *ex*

situ konzervacije. Pored toga, dobijen biljni materijal bi se upotrebio i za ispitivanje mogu nosti njihove primene u pejzažnoj arhitekturi i hortikulturi bilo direktno ili kao polazni materijal u hibridizaciji i sintezi novih ukrasnih taksona u okviru roda *Dianthus* o emu postoje publikovani radovi (Nakano i Mii, 1993a, 1993b, 1993c) i ve komercijalizovane hibridne sorte drugih vrsta karanfila (*Dianthus* 'Telstar', 'Floral Lace', 'Melody Pink', 'Ideal Violet'... (*Dianthus barbatus* x *Dianthus chinensis*). Istraživane vrste mogle tako e bi da budu i predmet me urodovskih ukrštanja u okviru familije Caryophyllaceae o emu postoje radovi (Nakano et al., 1996, Nakano i Mii, 1993d). Zbog toga je razmnožavanje navedenih vrsta neophodno da bi se omogu ilo dobijanje velikog broja biljaka koje bi potom mogle da se upotrebe za reintrodukciju na prirodna staništa, kao i da se iskoriste za kasniju masovnu proizvodnju klasi nim metodama vegetativnog i generativnog razmnožavanja u komercijalne svrhe. Na taj na in bi se obogatio asortiman autohtonih perena koje se kod nas gaji. Pored toga, stvorila bi se dovoljna koli ina biljnog materijala koji bi mogao da se iskoristi za sintezu novih sorti stvaranjem hibrida izme u ovih i drugih vrsta karanfila.

Kako su na svojim staništima ove vrste prisutne u malom broju, one e biti razmnožene metodom mikropropagacije. Ova metoda ima izuzetan zna aj u razmnožavanju ugroženih vrsta jer omogu ava dobijanje velikog broja biljaka, za kratko vreme, od male koli ine polaznog materijala, naj eš e semena. Setva u uslovima *in vitro* omogu ava o uvanje genetskog diverziteta što je vrlo važno da bi se obezbedilo kvalitetno spontano potomstvo biljaka vra enih na prirodna staništa (Pence, 1999).

Sam postupak razmnožavanja biljaka ovom metodom je složen i odvija se u strogo kontrolisanim laboratorijskim uslovima koji se razlikuju, zavisno od vrste koja se gaji. Zbog toga, razmnožiti neku vrstu metodom mikropropagacije ujedno podrazumeva i sprovo enje detaljnih istraživanja radi utvr ivanja optimalnih uslova pod kojima e produkcija kvalitetnog sadnog materijala biti najefikasnija.

1.1. TAKSONOMSKE, BIOLOŠKE I EKOLOŠKE KARAKTERISTIKE ISTRAŽIVANIH TAKSONA

1.1.1. Rod *Dianthus* L.

Rod *Dianthus* (familia Caryophyllaceae) obuhvata oko 400 vrsta koje su poreklom iz Evrope, Azije, Severne Amerike i nekoliko iz Južne Amerike. Najčešće rastu kao višegodišnje poluzbunaste, a ređe kao jednogodišnje ili dvogodišnje biljke. Imaju lankovito, glatko, uglavnom svetlozeleno stablo. Cvetovi su na vrhu izdanaka, pojedinačni ili u cvastima, raznobojni, prijatnog mirisa. Listovi su naspramno raspoređeni, uski, svetlo zeleni ili pepeljasto-plavkastozelene boje. Prašnika ima 10, a tučak je sastavljen iz 2 oplodna lista i ima 2 stubića. Plod je jednooka čaura. Seme je okruglasto, pljosnato, štitasto ili duguljasto. Veliki broj vrsta se gaji kao kućne biljke (Josifović, 1970, Mijanović, 1976, Cullen et al., 1989).

Mnoge vrste koje pripadaju rodu *Dianthus* danas imaju značajnu primenu u hortikulturi (Ball, 1992, Nau, 1996, Dole i Wilkins, 2004). Među njima najviše je poznata *D. caryophyllus* L., pre svega kao rezani cvet. Prema navodima ISAAA (International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications, 2012) u 2004. godini nalazio se na 13. poziciji na listi najvažnijih vrsta rezanog cveća na svetskom tržištu, dok u SAD čini 9.4% ukupnog prometa rezanog cveća. Takođe, prema izveštaju (The cut flowers and foliage market in the EU, 2007) agencije holandskog ministarstva spoljnih poslova - CBI (Centre for the Promotion of Imports from developing countries) koji daje podatke o prometu rezanog cveća u Evropskoj uniji *D. caryophyllus* je uvršten među 16 najznačajnijih vrsta koje su prodavane na aukcijama rezanog cveća u Holandiji, u periodu 2002 - 2006. godine. Pored toga, u pitanju je i jedna od najznačajnijih vrsta rezanog cveća koja se proizvodi u evropskim zemljama: Mađarskoj, Španiji, Francuskoj, Italiji, Velikoj Britaniji i Poljskoj. Međutim, zemlje Evropske unije i uvoze značajne količine rezanog cveta karanfila, gde su najveći uvoznici Velika Britanija, a zatim Holandija, Nemačka, Španija i Francuska, posmatrano za period 2002 - 2006. god. (The cut flowers and foliage market in the EU, 2007).

Tako e, veliki komercijalni zna aj ima turski karanfil, *D. barbatus* L. koji se kod nas primenjuje kao sezonsko cve e na cvetnjacima (dvogodišnji rasad), a ima zna aja i kao rezani cvet. Ukoliko se gaji kao rezani cvet, bere se kada je 10% cvetova otvoreno i ima boju karakteristi nu za sortu. Trajnost cveta je do 10 dana (Mijanovi , 1976, Nau, 1996, Dole i Wilkins, 2004). Danas se na tržištu mogu na i brojni kultivari ove vrste, sa cvetovima razli itih boja, a u skorije vreme sintetisani su hibridi koji za cvetanje ne zahtevaju hladan period (vernalizacija) ve cvetaju iste godine kada su i posejani (Dole i Wilkins, 2004).

Zna ajnu primenu ima i *D. chinensis* L. koji se koristi na cvetnjacima ili kao saksijaska kultura (Dole i Wilkins, 2004). Do danas su izdvojeni brojni kultivari koji se me usobno razlikuju po boji cvetova, visini biljaka, toleranciji prema temperaturnim ekstremima razgranatosti bokora. To je dvogodišnja vrsta (re e kratkove na perena) koja na podru ju Srbije može da se primenjuje kao jednogodišnja jer nije otporna na mraz, pripada klimatskoj zoni 7-10 (prema podeli koju daje USDA - US Department of Agriculture), dok Srbija pripada zoni 6.

Kao saksijaska kultura esto se koristi *D. carthusianorum* L. (Dole i Wilkins, 2004). Pored navedenih vrsta, kao perene se esto gaje i druge vrste karanfila me u kojima su *D. plumarius* L., *D. × allwoodii* hort. (*D. plumarius* x *D. caryophyllus*), *D. deltoides* L., *D. gratianopolitanus* Vill., *D. arenarius* L. i *D. knappii* (Pant.) Asch. et Kanitz ex Borbás (Nau, 1996). Ovi karanfili esto nalaze primenu u vrtovima pejzažnog stila, uglavnom su skromnih zahteva u odnosu na uslove sredine, pa se mogu koristiti i na siromašnom zemljištu, za alpinetume i suhozide (Nau, 1996).

D. × allwoodii je perena sivozelenih listova i veliki broj kultivara je sa punim cvetovima razli itih boja. *D. plumarius* je niska perena, jastu astog habitusa, koja odli no podnosi sušu. Cvetovi su beli, ruži asti ili ljubi asti, jednobojni ili višebojni i mirišljavi. Cveta tokom maja i juna. Perena koja formira gust bokor je *D. gratianopolitanus*, sa cvetovima koji su prosti ili puni, obi no razli itih nijansi ruži aste boje, cveta u maju i junu. *D. deltoides* je razre eno busenasta biljka, sa zelenim ili sivkasto zelenim listovima, 15 - 50 cm visoka koja cveta od juna do septembra, a cvetovi su mirisni i brojni, naj eš e ruži aste boje. *D. arenarius* je perena sivozelenih listova, niska, sterilni izdanci su visine 5 - 7 cm, dok u vreme cvetanja dostiže visinu

20-25 cm. Cveta u maju. Jedini karanfil iji su cvetovi žute boje je *D. knappi* koji je visine 40- 50 cm (Nau, 1996, Dole i Wilkins, 2004).

1.1.1.1. *Dianthus serotinus* Waldst. et Kit.

Vrsta *D. serotinus* (peš arski karanfil) je uvrš ena na listu Crvene knjige flore Srbije i to kao krajnje ugrožen takson, što ukazuje na tendenciju iš ezavanja ove vrste iz prirode. Kao prirodna retkost u Srbiji je zašti ena zakonom ("Zakon o zaštiti životne sredine", SG RS br. 66/91, 83/92 i 50/93; "Pravilnik o proglašenju i zaštiti strogo zašti enih i zašti enih divljih vrsta biljaka, životinja i gljiva", SG RS, br. 5/2010 i 47/2011). U Rumuniji se smatra retkim (R) ili iš ezlim (EX) taksonom. U Slova koj je procenjena kao ranjiva (V) (Boža, 1999). Tako e, *D. serotinus* je jedan od osam vrsta karanfila koji su svrstani u IUCN (The International Union for Conservation of Nature) crvenu listu flore pored *D. diutinus* Kit. ex Schult., *D. hypanicus* Andr., *D. lumnitzeri* Wiesb., *D. marizii* Samp., *D. moravicus* Kovanda, *D. morisianus* Wals., *D. nitidus* Waldst. et Kit., gde se nalazi u kategoriji ranjivog (V) taksona (Boža, 1999, Bilz, 2011).

Opis taksona

To je višegodišnja, zeljasta, busenasta biljka, visine 30 – 40 cm. Stabljika je u donjem delu polegla, u gornjem uspravna, obla, snažna, na nodusima zadebljala, razgranata od sredine ili gornje tre ine. Sterilni izdanci su dugi, formiraju rozetu. Listovi su plavi asto zelene boje, na vrhu su oštro zašiljeni, po obodu hrapavi. Ima ih 6 – 10 pari, odstoje i su od stabljike pretežno pod uglom od 90°.

Cvetovi su grupisani u cvasti po 5 – 15, blagog su mirisa. ašica je uzdužno izbrazdana, prema gore se sužava. Zupci ašice su lancetasti i zašiljeni na vrhu. Kruni ni listi i su po obodu kon asti, krem boje (slika 1). Plod je aura malo duža od ašice. Cveta od jula do septembra. Oprašivanje je entomofilno, a rasejavanje anemohorno i endozooorno (Gaji , 1986, Boža, 1999).



Slika 1 Cvet *D. serotinus*

Stanište i rasprostranjenje

D. serotinus raste u okviru sveza *Festucion vaginatae* Soo 1929, *Festucion rupicolae* Soó 1939 i *Aceri tatarici-Quercion* Zólyomi et Jakucs 1957. U svezi *Festucion vaginatae* se javlja na zaravnjenim terenima, padinama dina, kao i po udolinama između dina, gde raste na pesku koji ima neutralnu do baznu reakciju, pH = 7,00 – 8,10 i koji je veoma siromašan humusom (procenat humusa 0,21 – 2,49%). U okviru sveze *Festucion rupicolae* raste na pesku bazne reakcije (pH = 8.00 – 8.10, a količina humusa je 3.51 – 4.56 %), dok se u svezi *Aceri tatarici-Quercion* javlja samo na obodima šuma. Generalno, odgovaraju mu suva, topla, osunčana, peskovita staništa i pešane pustare (Gajić, 1986, Božić, 1999).

Vrsta je rasprostranjena u Panonskoj niziji (Srbija, Mađarska, Slovačka, Rumunija) i panonski je endemit. U Srbiji je još 1896. godine zabeleženo prisustvo ove vrste na području Srema, ali je prvobitno bila determinisana pod imenom *Dianthus plumarius* L. Danas je prisutna na lokalitetima: Subotičko – horgoška pešara, Subotica,

pustara ikerija, šuma Hrastova a, Kelebijska šuma, šuma Daš an, avolj, Hajdukova šuma, Ludoška pustara i Pali (Boža, 1999) (slika 2).



Slika 2 Rasprostranjenje *D. serotinus* u Srbiji (Boža, 1999)

Stanje populacije je na prirodnom staništu je kritično. Broj jedinki ima tendenciju opadanja usled niza negativnih faktora (subpopulacija u Subotici – horgoškoj pešari je procenjena na manje od 150 primeraka). Pošumljavanje otvorenih peskova, pretvaranje površina pod pešarskom vegetacijom u polja pod

poljoprivrednom kulturama, izgradnja vikendica, branje i kidanje cvetova od strane izletnika su samo neki od negativnih faktora (Boža, 1999). Tako e širenje populacija invazivne vrste *Asclepias syriaca* L. dodatno ugrožava *D. serotinus* na prirodnom staništu (Bilz, 2011).

Zbog izuzetnih dekorativnih osobina, dugog perioda cvetanja, cvetova blagog i prijatnog mirisa, osobine da dobro uspeva na siromašnim zemljištima, kao i zbog otpornosti na sušu, peš arski karanfil se može primenjivati u hortikulturi, posebno na peskovitim zemljištima. Pogodan je za alpinetume, suhozide, cvetne bordure, ivice, a koristi se i kao pokriva tla. Kultivisane forme ove vrste mogu se na i u katalozima proizvo a a kako u Evropi (npr. Cotswold Garden Flowers, Velika Britanija, 2012), tako i u SAD-u (npr. The Flower Factory, Wisconsin, 2012).

1.1.1.2. *Dianthus pinifolius* Sibth. et Sm.

Vrsta *D. pinifolius* je endemit jugoisto nog dela Balkanskog poluostrva i kod nas ima status ranjivog (V) taksona. Zbog listova plavi asto zelene boje dekorativan je tokom itavog vegetacionog perioda (Tomovi et al., 2003).

Opis taksona

D. pinifolius je višegodišnja, gusto busenasta biljka, visine do 40 cm. Listovi su linearni, uski, širine do 1 mm, zašiljeni, pomalo hrapavi i po obodu zadebljali. Rukavac je 3 - 8 puta duži od širine stabljike (slika 3). Cvetovi su u gustim glavicama. Brakteje su kožaste, duguljasto jajaste ili duguljasto objajaste, sa osjem na vrhu. Ljuspe dvojne ašice su jajaste ili skoro obsrcaste, kožaste, ima ih 6. ašica je dužine 8 - 20 mm, širine 2 - 4 mm, zelenkasta, u gornjem delu ruži asta. Kruni ni listi je dužine 5 - 7 mm, re e do 10 mm, nazubljen, purpurne ili ljubi aste boje (slika 4). Cveta od juna do avgusta (Gaji , 1970).



Slika 3 *D. pinifolius* - izdanci



Slika 4 *D. pinifolius* - cvast

Stanište i rasprostranjenje

Vrsta je endemit Balkanskog poluostrva i rasprostranjena je u Albaniji, Srbiji, Makedoniji, Bugarskoj, jugozapadnoj Rumuniji i Grkoj (Tomović et al., 2003). U Srbiji je prisutna na malom broju lokaliteta (Kopaonik, Maljen, okolina Niša i okolina Vranja) (slika 5), gde raste na suvim, strmim i kamenitim terenima (Gajić, 1970, Ranđelović et al., 2008), na zemljištima koja su se razvila na silikatnoj geološkoj podlozi (andeziti, rečne graniti) koja imaju neutralnu do blago kiselu reakciju (Tomović et al., 2003, Blaženović et al., 2005, Milosavljević et al., 2005).



Slika 5 Rasprostranjenje *D. pinifolius* u Srbiji (Gajić, 1970, Ranđelović et al., 2008)

Iako se ova vrsta javlja u Srbiji na ve em broju lokaliteta u odnosu na druga dva karanfila koji su predmet ovog rada, treba imati u vidu da u svom radu Tomovi i saradnici (2003) isti u da se *D. pinifolius* na svom prirodnom staništu javlja u veoma malom broju.

1.1.1.3. *Dianthus giganteiformis* Borbas subsp. *kladovanus* (Degen) Soo

D. giganteiformis subsp. *kladovanus* (kladovski karanfil) je takson koji je prepoznat kao ugrožen i upravo zbog toga je našao svoje mesto u "Crvenoj knjizi flore Srbije". Ovaj takson je endemit Balkanskog poluostrva i svrstan je u grupu krajnje ugroženih taksona u Srbiji sa populacijom od oko 250 zrelih jedinki. U Bugarskoj i Rumuniji ima status retkog taksona. U me unarodnoj zaštiti takson nije uvršten u evropsku i svetsku crvenu listu flore (Jalas i Suominen 1988, Dikli et al., 1999).

Opis taksona

Višegodišnja zeljasta biljka. Fertilni i sterilni izdanci su mnogobrojni. Stabljike su uspravne, visoke 25-45 cm, na preseku manje-više etvorouglaste, hrapave, obino sa 5 - 6 pari listova. Listovi kra i od internodija, donji široki 1 - 2 (re e 3) mm, sa 3 nerva; lisna sara duga ka do 7 mm. Cvasti sa 3 - 10 cvetova. Ovojni listovi cvasti kožasti, duž oboda kožasto opnasti, na vrhu sa osjem. Ljuspe dvojne ašice sa širokim prozirnim opnastim obodom, koji je esto talasasto naboran; spoljne mrke, dopiru do polovine ašice, široko objajaste, na vrhu urezane; unutrašnje široko obrnuto srcaste i sa kratkim osjem. ašica duga ka 8 - 10 mm, široka do 2 mm, bledozelena, plavi asto-zelena ili zelenkasto-ružista. ašini zupci lancetasti ili jajastolancetasti, po obodu dlakavi, na vrhu više-manje zašiljeni, sa i bez oske. Kruni na liska ružista, retko bela, dužine 3 - 5 mm, pretežno gola, po obodu slabo nazubljena (Dikli et al., 1999).

Cveta tokom juna i jula, a plodonosi u julu i avgustu. Oprašivanje se vrši putem insekata (entomofilija). Razmnožava se semenom i bo nim izdancima iz rizoma. Obrazuje pojedina ne bokore i manje skupine.



Slika 6 Stanište *D. giganteiformis* subsp. *kladovanus*

Stanište i rasprostranjenje

U pitanju je klasi na psamofita. Raste u peš arskim zajednicama stepskog karaktera iz klase *Festucetea vaginatae* Soó ex Vicherek 1972. U Kladovskoj peš ari ulazi u sastav zajednice *Alyso-Festucetum vaginatae* L. Stjepanovi -Veseli i 1953, a najve u brojnost postiže na nešto vezanijim peskovima u subasocijacijama *stipetosum joannis* i *typicum*.

Rasprostranjena je u Vlaškoj niziji i Dobrudži (severoisto na Srbija i jugoisto na Rumunija, severna i severoisto na Bugarska). Jedino stanište ovog taksona u Srbiji je na podru ju Kladovske peš are (selo Davidovac) i zauzima površinu od svega nekoliko hektara sa tendencijom daljeg smanjivanja (slike 6 i 7) (Jalas i Suominen 1988, Dikli et al., 1999, European Environment Agency, 2013).

Stanište se nalazi pod jakim antropogenim uticajem. Velike površine na staništu ove biljke pretvaraju se melioracijom i drugim agrotehničkim merama u kulturne površine, pre svega u plantažne vinograde. Tako e, pošumljavanje peš are bagremom dovodi do nestanka pogodnog staništa za ovu podvrstu. Dodatni ugrožavaju i faktor je ekstenzivna ispaša. Broj individua ove vrste na staništu se za sada smatra zadovoljavaju im ali treba ista i da ima tendenciju stalnog opadanja (Dikli et al.,

1999). Prema Pravilniku o proglašenju i zaštiti strogo zaštićenih i zaštićenih divljih vrsta biljaka, životinja i gljiva ("Službeni glasnik RS", br. 5/2010 od 5. 2. 2010. godine) ovaj takson je uvršten na listu retkih, ranjivih i ugroženih vrsta, sa statusom strogo zaštićene vrste. Ove činjenice govore u prilog tome da je neophodno preduzeti sve mere u cilju zaštite kladovskog karanfila od potpunog istrebljenja sa ovog lokaliteta i povećanja brojnosti ove podvrste.



Slika 7 Rasprostranjenje *D. giganteiformis* subsp. *kladovanus* u Srbiji (Diklić et al., 1999)

1.2. RAZMNOŽAVANJE KARANFILA KONVENCIONALNIM METODAMA

1.2.1. Generativno razmnožavanje

Pri generativnom razmnožavanju biljke se reprodukuju iz semena. Sama suština generativnog razmnožavanja se ogleda u mejozi, koja obezbe uje visok stepen varijabilnosti potomstva, za razliku od vegetativne reprodukcije gde je potomstvo verna kopija materinske biljke, odnosno genotipski je uniformno (osnova reprodukcije je mitoz) (Grbi , 1996). Me utim, primena generativne reprodukcije u biljnoj proizvodnji povla i i niz problema koji se moraju rešavati, me u kojima su pojava dormantnosti semena kod pojedinih vrsta ili ra anje semena niske klijavosti (Grbi , 2004). Osim toga, Hasan (2008) isti e da je u biljnoj proizvodnji neophodno da seme klija uniformno i u visokom procentu daju i vitalne klijavce.

Sa aspekta o uvanja geneti ke raznovrsnosti generativno razmnožavanje ima veliki zna aj, pogotovo za razmnožavanje ugroženih vrsta, ali treba imati u vidu da ukoliko je potrebna velika koli ina repromaterijala postoji mogu nost da prirodno stanište sakupljanjem semena sa lokaliteta bude ugroženo. Tako e, zna aj generativnog razmnožavanja se ogleda i u slu aju kada se obezbe uje sadni materijal ija sadnja treba da omogu i aktivnu restauraciju prirodnih predela, odnosno unošenje i širenje vrsta koje pripadaju potencijalnoj vegetaciji odre enog podru ja. Razlog za to nalazimo u potrebi da se obezbedi dovoljna genotipska i fenotipska varijabilnost koja garantuje ve i adaptivni potencijal (Grbi , 1996).

Danas se ve ina kultivara sezonskog cve a i perena, uklju uju i i *Dianthus* spp. u komercijalnoj proizvodnji razmnožava generativno, setvom F1 hibrida (Anderson, 2005). Me utim, stvaranju odre enog F1 hibrida prethode godine istraživanja tokom kojih se vrši formiranje istih linija koje adekvatnim ukrštanjem daju sortu željenih osobina, esto superiorniju od oba roditelja (heterozis). Pored toga, kod mnogih taksona postoji reproduktivna barijera kojom se spre ava samooprašivanje i time formiranje homozigotnih linija, zbog ega je jedna od alternativa vegetativno razmnožavanje željenih heterozigotnih genotipova (Anderson, 2005). Pored F1 hibrida, u prodaji se može na i seme F2 hibrida, kao i seme koje je nastalo slobodnim oprašivanjem, tzv.

"open-pollinated cultivars", koje uglavnom ne daje uniformno potomstvo, ali je znatno jeftinije (Anderson, 2005).

Me u vrstama karanfila koje se prvenstveno razmnožavaju semenom su: *D. barbatus*, *D. chinensis*, *D. carthusianorum*, *D. arenarius*, *D. deltoides* i *D. knappi*.

Za proizvodnju dvogodišnjeg rasada *D. barbatus* setva semena se vrši u julu, u stakleniku, hladnim lejama ili na otvorenom. Za uspešno klijanje semena nisu potrebni predsetveni tretmani, a klijavost obi no prelazi 70%. Fotoperiod nema uticaja na cvetanje (Mijanovi , 1976, Dole i Wilkins, 2004).

D. chinensis se razmnožava semenom, od setve do cvetanja obi no je potrebno da pro e 15 - 16 nedelja, a ukoliko se precvetale stabljike odrežu biljka cveta ponovo u toku vegetacije (Dole i Wilkins, 2004).

Kod vrste *D. carthusianorum* postoje brojni kutivari koji mogu da se razmnožavaju setvom hibridnog F1 semena, me utim, iako su dobijene biljke uniformne u pogledu boje cvetova, dešava se da se razlikuju po visini ili vremenu cvetanja, zbog ega se kultivari kod kojih se javlja takav problem eš e razmnožavaju reznicama ili kulturom *in vitro* (Dole i Wilkins, 2004).

Za razliku od *D. carthusianorum*, pri generativnom razmnožavanju *D. deltoides* potomstvo je obi no ujedna enih osobina. Može se razmnožavati i reznicama koje se uzimaju sa sterilnih izdanaka tokom prole a i leta. Trajanje proizvodnje zavisi od kultivara. Na primer Nau (1996) navodi da ukoliko se kultivar *D. deltoides* 'Zing Rose' poseje sredinom februara, dobijene biljke e cvetati ve krajem maja. Me utim, to nije slu aj sa kultivarom *D. deltoides* 'Brilliant' koji sporije raste, potrebno mu je više vremena da postigne odre ene dimenzije i ne e cvetati iste godine kada je posejan, ve mu je potreban i period vernalizacije.

Prilikom razmnožavanja vrsta *D. arenarius* i *D. knappi*, ukoliko se setva vrši tokom zime ili u rano prole e (januar-mart), dobijene biljke iste godine sporadi no cvetaju, kod *D. knappi* do 50% biljaka, 16 - 19 nedelja nakon setve, a kod *D. arenarius* svega 10 - 15% biljaka. Me utim, ako se setva semena *D. knappi* izvrši kasnije, krajem leta ili u jesen, biljke e cvetati tek naredne godine na stalnom mestu. Potomstvo iz semena je uglavnom uniformno (Nau, 1996).

Semenom mogu da se razmnožavaju i vrste *D. gratianopolitanus* i *D. plumarius*, ali se kod njih generativno razmnožavanje retko koristi jer se dobija neujednaeno potomstvo, biljke variraju u visini i habitusu i dešava se da kod iste sorte se formiraju i prosti i puni cvetovi. Nau (1996) navodi da ukoliko se seme *D. plumarius* poseje u rano proleće, otprilike 50% dobijenih biljaka će cvetati iste godine. Ukoliko se setva semena izvrši u januaru, a biljke posade na stalno mesto tokom maja ili početkom juna, cvetaće u avgustu iste godine, ali tako će sporadično.

Prema pravilima međunarodnog udruženja ISTA (International Seed Testing Association) za utvrđivanje klijavosti semena vrsta *D. barbatus*, *D. caryophyllus*, *D. chinensis*, *D. plumarius* i *D. deltoides*, pre testiranja klijavosti neophodno je izlaganje semena niskim temperaturama, do 7 dana na temperaturi 5 - 10 °C pre ispitivanja klijavosti (ISTA, 2010). Međutim, u relevantnoj literaturi (Draper, 1985, Ball, 1991, Nau, 1996, Dole i Wilkins, 2004) ne postoje podaci o pojavi dormantnosti kod semena komercijalno značajnih vrsta karanfila. Štaviše, kao što je već navedeno kod vrsta za vrste *D. caryophyllus*, *D. deltoides* i *D. barbatus* - seme nije dormantno, nisu potrebni predsetveni tretmani i klijavost je relativno visoka (preko 70% kod *D. barbatus* i 70 - 96% kod kultivara *D. caryophyllus* koji se gaje za primenu u posudama) (Nau, 1996). Proizvođači semena "Goldsmith seeds and Syngenta flowers" (2012) daju kompletnu i detaljnu tehnologiju proizvodnje i specifikaciju proizvoda za kultivare karanfila koje seme imaju u ponudi, i prema tim podacima i klijavost semena *D. carthusianorum* je visoka (85 - 90%, zavisno od kultivara).

Kod nekih vrsta roda *Dianthus* može da se javi dormantnost semena. Baskin i Baskin (2005) izdvajaju tip fiziološke dormantnosti semena kod koga je potrebno seme izlagati određeno vreme višim temperaturama (na primer 30 - 35 °C) koje se potom smanjuju (na 15 - 20 °C) nakon čega seme klija. Oni navode da je taj tip dormantnosti zastupljen kod vrste *D. armeria* L. koje seme je dormantno tokom leta i počinje da klija u jesen. Međutim, *D. armeria* je vrsta koja nema već i komercijalni značaj, mada može da se koristi kao dekorativna. Pojedini proizvođači semena "samoniklih" vrsta, među kojima je i Everwilde farms Inc. iz Sjedinjenih Američkih Država (Wisconsin) (Everwilde farms Inc., 2012), u svojoj ponudi imaju seme *D. armeria*.

1.2.2. Vegetativno razmnožavanje

Vegetativnim (aseksualnim) razmnožavanjem biljke se reprodukuju iz vegetativnih delova koji mogu biti specijalizovani (krtole, lukovice, hibernakule, rasplodni pupoljci, bulbili) ili ne (koren, stablo, list). Reprodukciju biljke iz vegetativnih delova omoguava sposobnost biljaka da obrazuju nedostajuće delove (restitucija) najčešće putem njihove regeneracije iz dormantnih primordija ili iz neizdiferenciranih tkiva, kao i mogućnost srastanja tkiva (spajanje neizdiferenciranog traumatskog tkiva jednog ili dva različita organizma). Biljke su sposobne da regenerišu kompletnu individuu iz samo jedne ćelije (svojstvo totipotentnosti) što pored ostalog predstavlja osnovu ideje o gajenju biljnih ćelija i tkiva u kulturi *in vitro* (Grbić, 2004).

Ukoliko se razmnožavanje zasniva na sposobnosti regeneracije nedostajućih biljnih delova, tada govorimo o autovegetativnom razmnožavanju, za razliku od heterovegetativnog razmnožavanja koje obuhvata metode u kojima osnovi je sposobnost same usobnog srastanja tkiva različitih individua. U okviru metoda autovegetativnog razmnožavanja postoji grupa postrizogenih metoda (deljenje, zagrtanje i poleganje) gde se nova individua odvaja od materinske nakon formiranja sopstvenog korena, i postoji grupa prerizogenih metoda (reznice i kultura tkiva) gde propagula u trenutku odvajanja od matične biljke nema koren (Grbić, 2004). Međutim, zbog svoje specifičnosti i primene kod zeljastih biljaka, treba posebno istaći i vegetativno razmnožavanje biljaka specijalizovanim vegetativnim strukturama (lukovice, rizomi, stoloni, krtole, rasplodni pupoljci i dr.) koji kod nekih rodova ili vrsta cvetnih kultura, predstavljaju osnovni način razmnožavanja u praksi. Tako se na primer, lile, narcisi i zumbuli razmnožavaju lukovicama, gladiola i frezija se razmnožavaju krtolastim lukovicama, a perunike deljenjem rizoma. Kod cikasa se rasplodni pupoljci formiraju duž stabla, dok se oni kod paprati *Cystopteris bulbifera* (L.) Bernh. i *Asplenium bulbiferum* G. Forst. obrazuju na listovima (Grbić, 2004, Olsen, 2007). Kod vrsta *Lilium bulbiferum* L. i *Cardamine bulbifera* (L.) Crantz. formiraju se bulbile u pazuhu listova (metamorfoza aksilarnog pupoljka). Hibernakule (tzv. pupoljci za prezimljavanje) se formiraju kod nekih vodenih biljaka (*Aldrovanda vesiculosa* L., *Utricularia* L.) (Kew, 2012), a prisutne su i kod nekih vrsta roda *Drosera* L. (Cullen et al., 2011).

Pri vegetativnom razmnožavanju kod novodobijenih biljaka nema promena u genetskoj osnovi u odnosu na matičnu biljku osim ukoliko ne dođe do mutacija tokom

elijske deobe (Grbi , 2004). Dakle, ovaj na in razmnožavanja je pogodan za fiksiranje povoljnih osobina mati ne biljke u daljem potomstvu.

Kod karanfila, koji nemaju specijalizovane rasplodne organe, vegetativno razmnožavanje se vrši deobom bokora, reznicama i kulturom tkiva. Razmnožavanje deobom bokora se smatra najjednostavnijim na inom vegetativnog razmnožavanja. Mati na biljka se u prole e ili jesen izvadi iz zemlje i oštrim nožem podeli na nekoliko delova tako da svaki nadzemni deo bude sa dovoljno korenova kako bi se obezbedio razvoj nove individue. Tako dobijeni delovi se mogu koristiti kao gotov sadni materijal ili mogu biti posa eni i gajeni do željene veli ine (Mijanovi , 1976, Nau, 1996). Me utim, zbog malog faktora multiplikacije, deoba bokora se koristi kod manjih obima proizvodnje.

Me u karanfilima koji se prvenstveno razmnožavaju vegetativnim putem su *D. caryophyllus*, *D. × allwoodii*, *D. gratianopolitanus* i *D. plumarius*. Vrsta *D. caryophyllus* se razmnožava kulturom tkiva i reznicama. Danas postoje mnoge kompanije koje se bave proizvodnjom reznica *D. caryophyllus*, kao što je "Ringel nursery" iz Poljske (Ringel nursery, 2012) koji prodaju ožiljene ili neožiljene reznice. Reznice se po pravilu uzimaju sa bezvirusnih ("virus free") mati nih biljaka dobijenih kulturom tkiva (Ball, 1991, Dole i Wilkins, 2004). Neožiljene reznice se pre prodaje esto skladište na nižim temperaturama tokom odre enog perioda. Zna aju uspešnog skladištenja reznica *D. caryophyllus* kako bi se u pravom trenutku odgovorilo zahtevima tržišta ide u prilog injenica da iako su prva istraživanja ove problematike sprovedena još pedestih godina prošlog veka (Holey i Farmer, 1951, Langhans, 1954) ni danas nisu izgubila na aktuelnosti (Zencirkiran, 2010).

Skladištenje reznica se odvija na niskim temperaturama, ali tako da ne opadne njihova sposobnost ožiljavanja što esto zahteva dodatna detaljna istraživanja vezana za optimizaciju parametara skladištenja (Acosta et al., 2009, Zencirkiran, 2010). Faktori koji dovode do propadanja reznica tokom dužeg skladištenja su nedostatak svetlosti, variranje temperature, gubitak vlage (isušivanje), infekcija patogenima i akumulacija etilena (Zencirkiran, 2010). Tako e, reznice mogu izgubiti i na kvalitetu (npr. pojave nekrotiranog tkiva) što kasnije može da prouzrokuje smanjenu sposobnost ožiljavanja i slabiji razvoj dobijenih biljaka. Naravno, na ožiljavanje uti u i uslovi transporta reznica nakon skladištenja.

Efekat skladištenja zavisi i od genotipa posmatranih biljaka, odnosno od toga koji je kultivar u pitanju. Tako su Garrido et al. (1996) ispitali uticaj dužine skladištenja u uslovima niske temperature i uticaj tretiranja reznica auksinima na ožiljavanje reznica različitih kultivara *D. caryophyllus*. Reznice su skladištene u plastičnim vrećicama na temperaturi 4 ± 2 °C i pri relativnoj vlažnosti od 75%, sa fotoperiodom od 12h. Nakon 2 nedelje skladištenja tretman auksinima (NAA i IBA) je pozitivno delovao na ožiljavanje kod nekih kultivara (npr. 'Oriana'), kod nekih ('Virginie') nije imao uticaja na reznice skladištene duže od 12 nedelja tretman auksinima uopšte nije imao uticaja na ožiljavanje niti na kvalitet ožiljenih biljaka. Tako e, Zencirkiran (2010) navodi da se ožiljene reznice mogu skladištiti duže vremena u odnosu na neožiljene.

Među ostalim karanfilima, *D. × allwoodii* se razmnožava reznicama, dok podela bokora ima manji značaj u komercijalnoj proizvodnji zbog malog faktora multiplikacije. Slično i vrste *D. gratianopolitanus* i *D. plumarius* uglavnom se razmnožavaju terminalnim reznicama koje se uzimaju nakon precvetavanja (Ball, 1991, Nau, 1996).

Turski karanfil (*D. barbatus*) i *D. carthusianorum* se mogu razmnožavati i terminalnim pupoljcima ali se ovaj metod ređe koristi (Nau, 1996).

1.3. RAZMNOŽAVANJE KARANFILA KULTUROM *IN VITRO*

1.3.1. Istorijat, klasifikacija i metode biljne kulture *in vitro*

Kultura biljnih elija, tkiva i organa *in vitro*, ili kulture - kultura biljaka *in vitro*, predstavlja gajenje različitih biljnih segmenata (eksplanata) odvojenih od matične biljke, na veštačkoj hranljivoj podlozi (medijumu), u sterilnim, kontrolisanim laboratorijskim uslovima (Pierik, 1987, Hartmann et al., 1990, Nešković et al., 2003, Grbić, 2004).

Prvi pokušaji gajenja biljnog tkiva na hranljivim podlogama rađeni su početkom prošlog veka. Istraživači su pošli od pretpostavke da je svaka biljna elija, uključujući i somatske, autonomna i genetski sposobna da regeneriše celu biljku (princip totipotencije). Prvi uspešan eksperiment izvršio je Hannig 1904. godine, gajeći nezrele embrione nekoliko vrsta koje su pripadaju familiji Cruciferae (Brassicaceae). Sve do otkrića auksina (1934. god.), a potom i ostalih biljnih hormona (citokinina, giberelina i dr.) uspešnih pokušaja gajenja biljnih fragmenata bilo je malo.

Nakon otkrića auksina, tokom 1939. godine, Gautheret, Nobécourt i White, nezavisno jedan od drugog, postigli su uspeh sa gajenjem biljnog tkiva u kulturi. Njihovi radovi smatraju se prvom pravom kulturom tkiva. Kao eksplante, Gautheret i Nobécourt koristili su delove stabla sa elijama kambijuma šargarepe (*Daucus carota* L.). U medijum za gajenje dodavali su indolacetični kiselinu, jedini tada poznati biljni hormon. White je gajio tkivo duvana na medijumu bez hormona, ali se kasnije pokazalo da su endogeni citokinini (hormoni koji utiču na deobu elija) u kambijalnim elijama duvana omogućili ili rast kalusa (Pierik, 1987, Grbić, 2004).

U daljem periodu istraživanja su bila usmerena na indukovanje elijskih deoba, kojima se najčešće dobijalo neizdiferencirano tkivo - kalus, kao i na održavanje dobijenog kalusa neograničeno dugo u kulturi. Prve kulture tkiva najčešće su dobijane od eksplanata poreklom od mladih, meristemskih tkiva, gajeći rastenje još nije bilo završeno. Hranljive podloge na kojima su eksplanti gajeni, sadržale su i auksin. Deobom elija, od eksplanata se formirao kalus. Fragmenti kalusa su nakon 3 - 4 nedelje prenošeni na svežu podlogu na kojoj su nastavljali da rastu.

Me utim, dodavanje samo auksina nije bilo uvek dovoljno da izazove elijsku deobu. Tek je otkri em citokinina omogu eno dobijanje kalusa i od diferenciranih elija (delovi lista, korena, cveta), koje su se dediferencirale i nanovo dobijale sposobnost deobe. Naj eš e, za uspešno gajenje kulture kalusa, neophodno je dodati oba hormona (auksine i citokinine) u odgovaraju im koncentracijama u medijum. Ispostavilo se da auksini i citokinini imaju sinergi ko dejstvo, tj. da je njihov zajedni ki efekat daleko ja i od zbira pojedina nih efekata ovih hormona.

Daljim istraživanjima utvr eno je da se, u odgovaraju im uslovima, zavisno od vrste, kalus diferencira i nanovo regeneriše biljne organe (organogeneza). Otkri e interaktivnog dejstva auksina i citokinina na organogenezu kalusa predstavlja prekretnicu u razvoju biljne kulture *in vitro*. U zavisnosti od koncentracije, ali i me usobnog odnosa ovih hormona, indukovani su razli iti biljni organi. Tako je stvorena mogu nost kontrole rasta kalusa, koji može da se usmeri u pravcu stvaranja izdanaka ili korenova, a time i nove biljke. Tako e, zavisno od tipa eksplanata i uslova gajenja (koncentracije i vrste hormona, sastava podloge - koncentracije mikro i makroelemenata, vitamina i dr.) novi biljni organi obrazuju se i direktno iz eksplanata (pupoljaka, vrhova izdanaka, meristema, listova i dr.), bez formiranja kalusa.

Izdanci dobijeni *in vitro*, se nanovo podele kada dostignu odgovaraju u dužinu, a dobijeni eksplanti se prenose na svež medijum na kom nastavljaju da rastu i razvijaju se. Tada se kao eksplanti naj eš e uzimaju nodusne reznice, ali i delovi stabljika ili listova. Deljenje kalusa ili izdanaka i prenošenje na novu podlogu vrši se 3 - 6 nedelja nakon postavljanja primarnih eksplanata, a naziva se subkultura ili pasaž. Na ovaj na in se za kratko vreme od samo jednog po etnog eksplanta dobije veliki broj novih, a od njih, organogenezom kalusa ili ožiljavanjem izdanaka - kompletne bilj ice.

Ve polovinom dvadesetog veka, istraživanja se usmeravaju na mogu nosti primene kulture *in vitro* u masovnom razmnožavanju biljaka. Rezultati dobijeni za pojedine kulture su prili no dobri i ubrzo se otvaraju prve komercijalne laboratorije u kojima se biljni materijal proizvodi koriš enjem odgovaraju ih tehnika kulture *in vitro* (Pierik, 1987).

Kako su eksplanti izuzetno malih dimenzija, razmnožavanje biljaka kulturom *in vitro* naziva se još i mikropropagacija (Hartmann et al., 1990, Neškovi et al., 2003, Grbi , 2004). Me utim, u praksi, termin mikropropagacija naj eš e

podrazumeva samo razmnožavanje biljka kulturom vršnih i pazušnih pupoljaka (Hartmann et al., 1990, Neškovi et al., 2003).

Razmnožavanje biljaka u uslovima *in vitro* esto se naziva i razmnožavanje kulturom tkiva, što i nije u potpunosti adekvatno. Naime, kultura tkiva prvobitno je podrazumevala dobijanje neizdiferenciranog tkiva (kalusa), njegovo dalje gajenje u kulturi i dobijanje mladih biljaka nakon organogeneze ili embriogeneze. Me utim, u uslovima *in vitro* biljke se razmnožavaju i kulturom razli itih biljnih organa (pupoljci, listovi, ovarijumi, antere), kulturom embriona, setvom semena i dr., pri emu se kalus naj eš e uopšte i ne formira, ili i ako se formira nema zna aja za dalje faze razmnožavanja.

Pored metoda koje se prvenstveno koriste u razmnožavanju biljka, do danas su razvijene i druge metode kulture *in vitro* (kultura elije, protoplasta) koje zna ajniju primenu imaju u drugim nau nim disciplinama (genetika, fitopatologija, farmacija i dr.). One se koriste za razli ita istraživanja, kao što su mogu nosti dobijanja sekundarnih metabolita, fiziološko dejstvo patogena, indukcija mutacija, kao i za mnoga druga istraživanja koja su sva obuhva ena terminom biotehnologija.

Najpoznatija klasifikacija biljne kulture *in vitro* izvršena je prema tipu eksplanata. Pierik (1987) izdvaja šest osnovnih grupa. To su:

- kultura intaktne biljke (setva semena *in vitro*)
- kultura embriona (izolovanih iz semena)
- kultura organa (pupoljci, koren, izdanci, antere itd.)
- kultura kalusa (naj eš e nastaje dediferenciranjem razli itog tkiva)
- kultura elija (gajenje pojedina nih elija dobijenih iz kalusa ili iz diferenciranog tkiva)
- kultura protoplasta (dobijenih digestijom elijskog zida).

Me utim, navedene metode razmnožavanja se esto me usobno kombinuju, odnosno kulture zasnovane jednom metodom kasnije se umnožavaju primenom neke druge. Tako se, na primer, kulturom embriona dobijaju nekontaminirani klijavci koji se potom razmnožavaju odgovaraju om metodom kulture organa (kotiledoni, apikalni meristem, itd.). Tako e, diferenciranjem elija kalusa mogu se dobiti embrioni (somatska embriogeneza) ili razli iti organi (izdanci, korenovi), koji se dalje gaje primenom nekog drugog metoda kulture *in vitro*.

Pored navedene klasifikacije, esto se spominju i druge, napravljene prema na inu regeneracije novih biljaka. Ove klasifikacije se delimi no razlikuju, prema razli itim autorima, ali svaka od njih obuhvata iste metode koje su razli ito grupisane (Pierik, 1987, Hartmann et al., 1990, Neškovi , 1986, Neškovi et al., 2003). Zavisno od vrste eksplanta i uslova njegovog gajenja, nove biljke se mogu regenerisati na više na ina. Pri tom, sama regeneracija može biti direktna, bez formiranja kalusa, i indirektna, kada se najpre formira kalus koji se potom nanovo diferencira.

Tako Hartmann et al. (1990) pominje pet osnovnih tipova regeneracije vegetativnih organa:

- kultura vrhova meristema,
- proliferacija bo nih izdanaka,
- indukovanje adventivnih izdanaka,
- organogeneza,
- somatska embriogeneza.

U kulturi vrhova meristema naj eš e se kao eksplanti koriste samo vegetacione kupe sa 2 - 3 lisne primordije. Njihovim rastom i izduživanjem trebalo bi da se dobiju izdanci koji su oslobo eni virusa, ijim e se daljim umnožavanjem nekim drugim metodama kulture *in vitro* i ožiljavanjem dobiti zdrave, bezvirusne biljke.

Proliferacija bo nih izdanaka nastaje spre avanjem dominacije apikalnog meristema i razvojem bo nih (pazušnih, aksilarnih) pupoljaka. Obi no se kao eksplanti koriste izdanci ili nodusne reznice.

Indukcija adventivnih izdanaka može se izvršiti direktno na površini postavljenog eksplanta (delova stabljika ili listova, npr.) ili na kalusnom tkivu koje se javlja na postavljenom eksplantu na mestu ozlede ili kao posledica dodavanja hormona u medijum. U oba slu aja izdanci se formiraju *de novo*.

Termin organogeneza Hartmann et al. (1990) koriste za proces nastajanja adventivnih izdanaka ili korenova iz mase kalusnog tkiva koje je prethodno duže vreme gajeno u kulturi. Neškovi et al. (2003), me utim, pod pojam organogeneze svrstavaju i formiranje adventivnih izdanaka, jer se u oba slu aja vegetativni organi

formiraju *de novo*, dok kulturu vrhova meristema i proliferaciju bo nih izdanaka izdvajaju kao grupu metoda kojima se podstie razvoj ve formiranih za etaka organa.

Pod somatskom embriogenezom podrazumeva se razvoj kompletnog embriona iz elija vegetativnog tkiva koje se mogu dobiti koriš enjem razli itih tipova eksplanata, direktno ili nakon formiranja embriogenog kalusa.

Sli nu klasifikaciju na ina regenerisanja vegetativnih organa dao je i Pierik (1987). On, pored kulture meristema, proliferacije bo nih izdanaka (aksilarnih pupoljaka) i formiranja adventivnih izdanaka, posebno izdvaja gajenje jednonodusnih reznica. Tako e, u posebnu grupu svrstava indukciju kalusa, njegovo gajenje i regeneraciju organa ili embriona iz elija kalusnog tkiva, a na kraju izdvaja i regeneraciju biljaka iz pojedina nih elija.

1.3.1.1. Kultura intaktne biljke

Kultura intaktne biljke odnosi se isklju ivo na setvu semena u uslovima *in vitro*. Me utim, u literaturi nema podataka o primeni setve semena *in vitro* u komercijalnom razmnožavanju biljaka, ali se ova metoda može koristiti za dobijanje nekontaminiranih bilj ica sa kojih se uzimaju eksplanti za dalja istraživanja (pupoljci, listovi, segmenti stabljika) ili se koriste kao podloge prilikom mikrokalemljenja. Jedini izuzetak predstavljaju orhideje. Danas se njihovo generativno razmnožavanje odvija isklju ivo u uslovima *in vitro* jer je klijanje semena specifi no i u uslovima *in vivo* teško ih je uspešno razmnožavati. Naime, njihovo seme sadrži malo hranljivih materija ili ih uopšte nema. Njihov nedostatak one nadokna uju simbiozom sa gljivama (mikoriza), koje naj eš e pripadaju rodu *Rhizoctonia* sp. U simbiozu orhideje stupaju neposredno nakon germinacije. Tada hife gljiva prodiru u subepidermalni sloj u kome se nesmetano razvijaju. Me utim, ukoliko dopru u dublje elijske slojeve, gljive bivaju "svarene", tj razložene i orhideje se tako snabdevaju organskim, hranljivim materijama. Kada zapo nu sa autotrofnom ishranom, za njihov dalji razvoj mikoriza postaje manje zna ajna (Pierik, 1987). Prva istraživanja klijanja semena orhideja u uslovima *in vitro* ra ena su uz prisustvo mikoriznih gljiva. Ovaj vid klijanja nazvan je simbiotska germinacija. Kasnija istraživanja su pokazala da se dejstvo gljiva može zameniti

odgovaraju om hranljivom podlogom. Me utim, uslovi klijanja *in vitro* veoma su se razlikovali zavisno od vrste orhideja. Pri tom, potrebno je bilo utvrditi ne samo sastav medijuma (mineralni elementi, pH vrednost, koncentracija saharoze, vitamina, hormona), ve i optimalnu temperaturu klijanja i fotoperiod za svaku vrstu posebno. Ipak, masovna proizvodnja me usobno identi nih biljaka mogu a je isklju ivo vegetativnim putem. Tradicionalnim metodama vegetativnog razmnožavanja orhideje se razmnožavaju veoma teško i sporo. Pierik (1987) navodi da je ponekad ak potrebno i do deset godina da bi se dobila razvijena biljka. Stoga se danas orhideje masovno proizvode primenom vegetativnih metoda razmnožavanja *in vitro* koje su daleko uspešnije, i danas postoje specijalizovani proizvo a i (Alba laboratories, AnTec Laboratory & Ladyslipper Farm i dr.) koji se time bave. Štaviše, kod nekih orhideja (*Phalaenopsis* 'Pink Butterfly') je ustanovljen jednostavan i jeftin protokol mikropropagacije (Markovi et al., 2012) ime njihovo razmnožavanje postaje izvodljivo ne samo u usko specijalizovanim i skupim laboratorijama, ve i onim slabije opremljenim.

Druga zna ajna primena setve semena u uslovima *in vitro* omogu ava njegovo brže i pouzdanije klijanje, što ima zna aja prilikom dobijanja novih sorti hibridizacijom. Ukrštanjem roditeljskih biljaka obi no se dobijala relativno mala koli ina semena i važno je da što više semena isklija.

1.3.1.2. Kultura embriona

Kultura embriona predstavlja gajenje embriona, izdvojenih iz semena, u uslovima *in vitro*, u cilju dobijanja komplementne biljke. Prvi radovi vezani za kulturu embriona objavljeni su još po etkom prošlog veka. Ve ina tih istraživanja sprovedena je u cilju prevazilaženja problema vezanih za klijanje semena. Dobijeni rezultati su naj eš e bili veoma pozitivni (Bonga, 1985, Pierik, 1987).

Prakti na primena kulture embriona je višestruka. Proizvodni ciklus vrsta sa dormantnim semenom je kra i, ukoliko su se uzroci dormantnosti nalazili u semenja i ili endospermu. Tako e, kulturom embriona mogu se dobijati klijavci koji se koriste kao

bezvirusne podloge za kalemljenje u uslovima *in vitro* (mikrokalemljenje) (Pierik, 1987, Hartmann et al., 1990).

Pierik (1987) navodi istraživanja u kojima su obrazovani haploidni embrioni. Oni su jedino mogli da prežive u uslovima *in vitro*, razvijaju i se u haploidne ili nakon udvajanja hromozoma, u homozigotne biljke što ima značaj prilikom dobijanja istih linija u proizvodnji hibridnog semena.

Veliki značaj kulture embriona bio je i u sprečavanju propadanja (abortiranja) embriona tokom embriogeneze. Ova pojava je prisutna kod koštunice avokada gdje plodovi prerano sazrevaju, zbog čega se prekida transport hranljivih materija do još uvek nezrelog embriona i on propada. Njihovim eksplantiranjem u ranim fazama razvoja, pre sazrevanja plodova, i gajenjem *in vitro*, nezreli embrioni se mogu razviti u zdrave biljke. Propadanje embriona se javlja i kao posledica ukrštanja nekompatibilnih roditeljskih biljaka (ukrštanje različitih vrsta, rodova, diploida i tetraploida, i sl.). U tom slučaju, željeno hibridno potomstvo se jedino može dobiti kulturom embriona (Pierik, 1987).

Kultura embriona nalazi primenu i prilikom razmnožavanja palme u kojima je i *Cocos nucifera* 'Makapuno' (Bonga, 1985, Pierik, 1987, Grbić, 2003). Kod palme *Cocos nucifera* prisutna je dormantnost embriona prouzrokovana inhibitornim materijama koje se nalaze u endospermu. Eksplantirani embrioni u uslovima *in vitro* razvijaju se u nove biljke direktno ili nakon kalusiranja, putem somatske embriogeneze (Bonga, 1985). Kod vrste *Pinus peuce* Griseb. seme je dormantno i za uspešno klijanje pri razmnožavanju klasičnim metodama neophodna je šestomesečna stratifikacija, bez koje bi klijavost bila niža od 1% (Nikolić et al., 2005), međutim, kulturom zigotskih embriona u optimalnim *in vitro* uslovima može se postići maksimalna klijavost (100%) pri čemu su se iz isključivih embriona obrazovale pravilno razvijene biljke (Stojić et al., 2008).

Međutim, iako Pierik (1987) i Hartmann et al. (1990) ističu značaj primene kulture embriona za razmnožavanje vrsta kod kojih se javlja dormantnost prouzrokovana inhibitorima u endospermu, u literaturi ne postoje podaci o široj praktičnoj primeni ove tehnike u generativnoj masovnoj proizvodnji biljaka, izuzev kod orhideja i palmi (Bonga, 1985, Pierik, 1987, Stilinović, 1987, Bewley i Black, 1994, Grbić, 2003, 2004).

1.3.1.3. Kultura organa

Kultura organa ima najveće primenu u odnosu na ostale tipove biljne kulture *in vitro* u razmnožavanju biljaka. Eksplanti su različiti biljni organi, vegetativni ili reproduktivni, ili njihovi delovi.

Pri vegetativnom, masovnom razmnožavanju biljaka najčešće se koriste pupoljci (meristemi). Pored pupoljaka, zavisno od vrste biljke, kao eksplanti mogu se koristiti i delovi stabljika, listova, vrhovi izdanaka i dr. Gajenje eksplanata poreklom od reproduktivnih organa (antere, polen, ovarijumi) koristi se za različita istraživanja, dobijanje haploida i sl. (Pierik, 1987, Hartmann et al., 1990, Grbić, 2004).

Dosadašnje iskustvo je pokazalo da se u meristemskim elijama ne nalaze virusi. Iako ako je mati na biljka zaražena, moguće je kulturom vrhova meristema dobiti potomstvo koje nije zaraženo virusima ("virus-free"), kao ni drugim patogenima (gljive, bakterije). Stoga je kultura meristema našla značajnu primenu u komercijalnoj proizvodnji zdravog sadnog materijala, naročito kod onih vrsta koje su podložne virusnim i gljivim oboljenjima (karanfil, gerber, malina, krompir i mnoge druge) (Vinterhalter i Vinterhalter, 1996, Pierik, 1987, Hartmann et al., 1990).

Međutim, verovatno da dobijanja zdravog potomstva u velikoj meri zavisi od veličine eksplanta. Što je on manji, mogućnost eliminacije virusa je veća. Hartmann et al. (1990) navode da je gajenjem vrhova meristema veličine 0,10 - 0,15 mm, eliminacija virusa potpuna, ali ipak zasnivanje kulture sa tako malim eksplantima je teže, broj eksplanata koji propadnu je veći, a i gajenje duže traje. Pored toga, Nešković et al. (2003) navode i da se gajenjem vegetacione kupe bez lisnih primordija dobija samo kalus. Zbog toga, u praksi se najčešće koriste eksplanti veličine 0,25 - 1 mm, na kojima se, pored vegetacione kupe, nalaze i dve najmlađe lisne primordije. Međutim, u tom slučaju, mogućnost da su eksplanti zaraženi nije u potpunosti isključena, što se proverava odgovarajućim testovima (Vinterhalter i Vinterhalter, 1996, Hartmann et al., 1990, Nešković et al., 2003). Ponekad se kontaminacije, ukoliko postoje, mogu uočiti već nekoliko dana nakon zasnivanja kulture. Tada se obično na podlozi javlja micelija gljive. Međutim, pojedini patogeni

organizmi, kao što su bakterije iz rodova *Erwinia* Winslow et al. i *Pseudomonas* Migula ili *Bacillus subtilis* Cohn mogu ostati unutar biljnog materijala i po nekoliko meseci, a da njihovo prisustvo ne bude detektovano. Zbog toga se povremeno vrši indeksacija, tj. uzimaju se uzorci - delovi eksplanata i gaje na specifičnim podlogama za detekciju odgovarajućih patogena, gljiva ili bakterija, vrši se kalemljenje kao metoda indeksacije, dok su za utvrđivanje prisustva virusa razvijeni posebni testovi (ELISA test, npr.). (Pierik, 1987, Hartmann et al., 1990, Vasil i Thorpe, 1994, Leifert i Cassells, 2001, Nešković et al., 2003)

Pored kulture meristema, za dobijanje bezvirusnih biljaka koristi se i izlaganje polaznog materijala povišenim temperaturama ("heat-treatment") određeno vreme, od 20 - 40 dana pa i do nekoliko meseci. Temperature se kreću oko 35 – 38 °C i najčešće se toploti ne izlažu cele biljke, već samo njihovi izdanci. Ovaj metod se može primenjivati samostalno ili u kombinaciji sa kulturom vrhova meristema, ali je efikasan samo protiv ograničenog broja virusa i nekih patogena, jer je i biljni materijal osetljiv na povišene temperature (Pierik, 1987, Hartmann et al., 1990).

Treba napomenuti da kultura meristema često nije na in razmnožavanje biljaka u uslovima *in vitro*, već se koristi samo u inicijalnoj fazi razmnožavanja, kako bi se dobile zdrave, bezvirusne biljke, koje će se potom razmnožavati primenom nekog drugog metoda kulture *in vitro*. Jedan od najvažnijih i najčešće korišćenih metoda mikropropagacije, naročito u komercijalnoj biljnoj proizvodnji, je metod proliferacije bočnih izdanaka ili pupoljaka. Kao eksplanti se uglavnom koriste vrhovi izdanaka (nekad samo 2 mm dužine) ili nodusne reznice uzete sa izdanaka koji su najčešće prethodno dobijeni kulturom meristema i tako oslobođeni od patogena. Ovi eksplanti se gaje na medijumu odgovarajućeg sastava u cilju sprečavanja apikalne dominacije i stimulisanja razvoja bočnih pupoljaka. Sastav medijuma zavisi od vrste biljke, ali se najčešće dodaju citokinini i u nižoj koncentraciji auksini.

Kako se ovom metodom u pazuhu listova početnog eksplanta razvijaju pupoljci i izdužuju u nove izdanke, a zatim se razvijaju i bočni pupoljci tih novodobijenih izdanaka, kao rezultat se dobija jako razgranat busen, sa velikim brojem bočnih izdanaka. Svaki dobijeni izdanak se može iskoristiti za narednu subkulturu, čime se broj novih izdanaka eksponencijalno povećava. Oni se potom mogu iskoristiti za sledeće subkulture ili prebaciti na nov medijum na kom će se ožiliti.

Primenom metode proliferacije bo nih izdanaka esto se korenov sistem uopšte ne formira, obi no kao posledica visokih koncentracija citokinina koji inhibitorno uti u na formiranje korenovog sistema. Tako e, prisustvo citokinina može prouzrokovati i skra ivanje internodija formiranih izdanaka, tako da je ponekad potrebno busenove prebaciti na medijum na kom e se internodije izdužiti, naj eš e medijum bez hormona ili sa giberelinima, pa se tek tada isecaju izdanci koji e se ožiljavati.

Pored pupoljaka, kao eksplanti se mogu koristiti i drugi biljni organi ili njihovi delovi. Mogu se koristiti segmenti kotiledona, hipokotila, stabla, listova, etina, korena (po pravilu samo u subkulturi, jer je koren mati nih biljaka gajenih *ex vitro* visoko kontaminiran zbog kontakta sa zemljom), delovi juvenilnih (nezrelih) cvasti i cvetova - petale, ovarijumi i antere, segmenti so nih listova lukovica, i sl. Oni su izgra eni iz ve diferenciranih elija (trajnog tkiva), a na odgovaraju oj hranljivoj podlozi se dediferenciraju i neposredno organizuju kao apikalni meristem (direktna organogeneza) ili obrazuju kalus iz koga se diferencira meristem (indirektna organogeneza).

Apikalni meristemi - pupoljci su na ovaj na in formirani *de novo*, zbog ega sam postupak njihovog dobijanja Hartmann et al. (1990) nazivaju kulturom adventivnih izdanaka. Ovako dobijeni pupoljci ili izdanci se dalje u kulturi *in vitro* mogu gajiti odgovaraju im metodama kulture pupoljaka. Tako e, na ovaj na in se adventivnim putem, direktno ili uz prethodno formiranje kalusa, mogu formirati i korenovi.

Da li e se na postavljenim eksplantima obrazovati korenovi, izdanci, izdanci uz prethodno kalusiranje ili samo neorganizovano kalusno tkivo, zavisi, pre svega od vrste biljke, pa ak i kultivara (genetski faktor), a potom i od sastava medijuma. Endogeni hormoni iji nam je sastav nepoznat mogu da deluju kao sinergisti ili antagonisti auksinima i citokininima koji se dodaju u hranljivu podlogu. To je jedan od razloga zbog kojih razli ite vrste biljaka razli ito reaguju na isti medijum. Pored auksina i citokinina u medijum se mogu dodavati i drugi hormoni, ali njihov uticaj na regeneraciju postavljenih eksplanata zavisi od vrste biljke, njenog fiziološkog stanja, tipa eksplanta i nemogu e je izvu i opšti zaklju ak (Stoji i et al., 1999, 2012, Collett et al., 2000, Fu i Harberd, 2003, Stoji i i Budimir, 2004, Nemhauser et al., 2006, Ruzicka et al., 2007, Stepanova et al., 2007, Ruzicka et al., 2009).

Indukovanjem adventivnih izdanaka može se dobiti visok stepen multiplikacije, ali je veća mogućnost pojave aberantnih biljaka - odnosno biljaka koje nisu identične polaznom klonu, što ograničava širu upotrebu ove metode u komercijalnoj biljnoj proizvodnji.

Kultura reproduktivnih organa biljaka (antere, ovarijumi, mikrospore) i njihovih delova najčešće se koristi za dobijanje haploida i dihaploida i uglavnom ima primenu u oplemenjivanju biljaka i selekciji novih sorti. Korišćenjem ovih metoda mogu se za kratko vreme dobiti iste, homozigotne linije, što je od velikog značaja za dalja ukrštanja i izdvajanje poželjnih osobina. Razvoj haploidnih biljaka iz muškog gametofita naziva se androgeneza, a iz ženskog - ginogeneza.

Kulturom antera ili mikrospora (nezrelih polenovih zrna) indukuju se elijske deobe kojima se formira embrion veoma sličan zigotskom embrionu. Razviće embriona iz mikrospora može biti direktno ili indirektno. U prvom slučaju svaka mikrospora u anteri se deli i razvija u embrion, nakon čega antera prsne i iz nje se oslobađaju veće formirani embrioni. Kod indirektnog androgeneze, iz mikrospora se najpre razvija kalus, a zatim se iz njega mogu indukovati pupoljci, korenovi ili embrioni, slično somatskoj embriogenezi. Međutim, pored toga što imaju redukovani (haploidni) broj hromozoma, dobijene biljke su obično manjih dimenzija i smanjene vitalnosti u odnosu na diploidne, materinske biljke. Takve biljke se ne mogu razmnožavati semenom zbog nemogućnosti da njihovi hromozomi prođu kroz mejozu, pa se stoga razmnožavaju vegetativno ili se u kulturi *in vitro* indukuje udvajanje njihovih hromozoma, stvaraju i pri tom tzv. dihaploidne biljke (Murovec i Bohanec, 2012).

Pored dobijanja haploidnih embriona, ženski gametofit u uslovima *in vitro* može se gajiti i radi oprašivanja (fertilizacije) u uslovima *in vitro*, zatim radi sprečavanja abortiranja embriona u ranom stadijumu, kada je kultura toliko malih embriona teško izvodljiva, kao i za različita istraživanja razvoja ploda i semena (Sita i Ravindran, 1991, Razdan, 2003, Diao et al., 2009).

1.3.1.4. Kultura kalusa

Kalusno tkivo, koje se formira na površini eksplanta (tzv. primarni kalus) kao posledica ozle ivanja ili dodavanja fitohormona, mogu e je izdvojiti i gajiti posebno na podlogama za gajenje kalusnih kultura. Obi no se dodaju samo auksini: 2,4,5-trihlorofenoksi sir etna kiselina (2,4,5-T), 2,4-D (2,4-dihlorofenoksi sir etna kiselina), IAA (indol-3-sir etna kiselina), NAA (- naftil-sir etna kiselina), IBA (indol-3-buterna kiselina) ili auksini u kombinaciji sa niskim dozama citokinina (naj eš e BAP, 6-benzilaminopurin). Pored navedenih, pojedini hormoni (giberelini, etilen) u kombinaciji sa auksinima mogu pozitivno da uti u na rast kalusa, ali je njihovo dejstvo prili no kompleksno i zavisi od koncentracije i fiziološkog stanja biljke (Gaspar et al., 1996, Razdan, 2003, Machakova et al., 2008). Kalusna tkiva mogu se dobiti iz eksplanata korena, stabla, lista, lisnih drški, cveta, ploda, uklju uju i i zrele i nezrele embrione. Nastaju dediferenciranjem elija eksplanata koje ponovo sti u sposobnost deobe i obrazuju tzv. nediferencirano biljno tkivo ili kalus.

Kada je primarni kalus obrazovan, obi no nakon 3 - 6 nedelja prenosi se na svežu podlogu tako što se deo tkiva koji aktivno raste o isti od sasušenih i nekrotiranih delova i prebaci na svež medijum. Obi no su sastav novog medijuma i uslovi gajenja sli ni onima u periodu indukcije, jedino se smanjuju koncentracije hormona (Neškovi et al., 2003). Na taj na in, deljenjem i prebacivanjem na svež medijum (subkulture), kalusno tkivo se može održavati jako dugo u kulturi. Na ovako gajenom kalusu mogu e je organogenezom indukovati pupoljke i korenove ili somatskom embriogenezom - nove biljke. Tako e, od kalusa se mogu dobiti elijske suspenzije koje e se posle posebno gajiti u kulturi *in vitro* (Hvoslef-Eide i Preil, 2005).

Kultura kalusa ima zna ajnu primenu u razli itim istraživanjima. Koristi se za odre ivanje preliminarne kompatibilnosti kod kalemljenja, pri emu se kalusi poreklom od biljaka ija se kompatibilnost ispituje fizi ki spoje u kulturi i zatim se prati njihov dalji razvoj i eventualano srastanje (Jonard et al., 1990, Errea et al., 2001, Moore, 1991, Pina i Errea, 2005). Tako e, kultura kalusa se koristi i u farmaceutskoj industriji, gde se gaje tkiva sposobna da sintetišu razli ite sekundarne metabolite (Baumert 1992, Vanisree 2004, Hvoslef-Eide i Preil, 2005, Hussain et al., 2012). Me utim, kultura kalusa se ne koristi u masovnom razmnožavanju biljaka zbog mogu nosti pojave geneti kih promena usled relativno visoke doze hormona koje se

koriste za indukciju i održavanje kalusa. Tako, sintetički auksin 2,4-D (2,4-dihlorofenoksi sirćetna kiselina) posle duže primene izaziva poliploidiju, aneuploidiju i druge hromozomske aberacije, a one su i promene manjeg obima koje pogađaju samo pojedine gene (genske mutacije) i ne mogu se videti na preparatu hromozoma. Ove promene se nazivaju somaklonalne varijacije jer se manifestuju u somatskim ćelijama.

1.3.1.5. Kultura ćelija i protoplasta

Ćelijska suspenzija se najčešće dobija iz kalusa (Razdan, 2003). Obično, nakon više uzastopnih subkultura kalusno tkivo postaje "rastresitije" nakon čega se vrši transfer na neki medijum koji se stavlja na rotirajuću platformu, tzv. rotirajuću ili recipročno šejkeri na kom se ćelije kalusa razdvajaju na sitnije agregate sastavljene iz nekoliko ćelija i na pojedina ćelije. Ove ćelije mogu da se dalje gaje u kulturi, ali se vremenom ponovo spajaju, obrazuju i krupnije agregate - nove kaluse, zbog čega je kulturu potrebno povremeno filtrirati (Razdan, 2003, George, 2008).

Kako je sintetička sposobnost izolovanih, pojedina ćelija ograničena, medijum - rastvor u kom se gaje ćelije, sadrži više organskih sastojaka od uobičajenih medijuma za kulturu tkiva, a filtrirana suspenzija se prenosi na svež medijum jednom nedeljno. Posude u kojima se gaji suspenzija ćelija obično je potrebno neprekidno mućkati kako bi se sprečila anoksija (nedostatak kiseonika) pa se postavljaju u odgovarajuće uređaje, najčešće rotacione, mada postoje i bioreaktori kod kojih se u kulturu ubacuje sterilan vazduh. Na ovaj način, ćelijske suspenzije se mogu neograničeno dugo održavati u kulturi (Pierik, 1987, Razdan, 2003, Hvoslef-Eide i Preil, 2005, George, 2008).

Klonovi poreklom od jedne ćelije se mogu dobiti razlivanjem suspenzije na površinu agar, kada se pojedina ćelije razvijaju u kaluse ili embriogeneze u somatske embrione. U okviru klona, ćelije su genetski homogene i ove klonirane ćelijske linije imaju značaj za mnoga fiziološka istraživanja, a pomažu u njima se lakše otkriju i somaklonalno variranje između u polaznih ćelija gajenih u suspenziji (Nešković et al., 2003, George, 2008).

Digestijom elijskog zida, u suspenziji ostaju samo protoplasti koji zadobijaju pravilan loptast oblik, bez obzira na oblik elije od koje poti u. Potom dolazi do ponovne regeneracije elijskog zida i deobe tih elija. Na taj na in, kultura protoplasta prelazi u kulturu elija. Period u kom je elija bila bez elijskog zida koristi se za razli ita biohemijska i citološka istraživanja, pri emu se elijske organele mogu neošte ene osloboditi iz protoplasta. Tako e, tada je mogu e u eliju unositi krupne molekule, kao što su nukleinske kiseline, primenom razli itih metoda me u kojima je najpoznatija somatska hibridizacija i na taj na in genetski menjati protoplaste (Neškovi et al., 2003).

Somatska hibridizacija nastaje spajanjem protoplasta u suspenziji, a tada dolazi i do fuzije jedara i nastaje nova, "hibridna" elija koja se, nakon obrazovanja elijskog zida, dalje deli i formira kalus ili regeneriše celu biljku. Ove hibridne elije potrebno je prepoznati i odvojiti od ostatka suspenzije. Ukoliko je hibridizacija uspešno izvršena, dobijene biljke ispoljavaju osobine koje su nasledile od oba "roditelja" (Pierik, 1987, Neškovi et al., George, 2008)

Primenom somatske hibridizacije do sada su uspešno dobijeni unutarvrnsni hibridi, kao i hibridi izme u razli itih biljnih vrsta ili rodova. Na ovaj na in se mogu dobiti i tetraploidi ili poliploidi, a spajanjem haploidnih elija dihaploidi (Nagata i Bajaj, 2001). Me utim, zbog razlika u morfologiji hromozoma, me uvrnsni hibridi mogu biti sterilni ili mogu da daju deformisano potomstvo, što donekle sužava primenu somatske hibridizacije u praksi (Hamill et al., 1985).

Do danas su publikovana brojna istraživanja koja se bave somatskom hibridizacijom ukrasnih biljaka, uklju uju i i hibridizaciju fuzijom protoplasta kod vrsta roda *Dianthus* (Nakano i Mii, 1993a, 1993b, 1993c, Nakano et al., 2001, Mii, 2009), ali i hibridizaciju izme u *D. barbatus* i *Gypsophila paniculata* L., pri emu su dobijeni hibridi formirali cvetove u uslovima *in vitro* bez obrazovanja listova, ali nije bilo mogu e dobiti pravilno razvijene biljke koje se mogu aklimatizovati (Nakano et al., 1996).

1.3.2. Sinteti ko seme

Sinteti ko (vešta ko) seme se formira oblaganjem (enkapsulacijom) somatskih embriona, ili re e pupoljaka, vešta kim endospermom koji je želatinozne strukture i obi no sadrži odgovaraju e koli ine mineralne soli, fitohormona i pesticida. Vešta ki endosperm se esto oblaže zaštitnim omota em koji odgovara semenja i (Bhojwani, Razdan, 1996, Grbi , 2004). Uprkos o iglednim prednostima koriš enja sinteti kog semena u klonskom razmnožavanju biljaka, kao što su jednostavnost primene i brza masovna reprodukcija željenih taksona, sinteti ko seme još uvek nema zna ajnu primenu u komercijalnom razmnožavanju biljaka. To je nova metoda koja je još uvek u po etnim fazama istraživanja, ispitana je kod malog broja taksona, a postoje i prakti ni problemi koji još uvek nisu rešeni, kao što je mala trajnost enkapsulisanog semena sa hidratisanim embrionima, odnosno enkapsulacija isušenih embriona (Bhojwani, Razdan, 1996, Grbi , 2004).

1.3.3. Banke gena

Kolekcije gena i semena, odnosno banke gena, predstavljaju posebno organizovane i visoko specijalizovane kolekcije živog materijala koji se sakuplja, skladišti, održava i razmnožava pod strogo kontrolisanim i specifi nim uslovima. Kolekcije gena imaju zna aja u o uvanju genotipova ugroženih vrsta, ali i specifi nih genotipova (homozigotne linije, genetski modifikovane elije, itd.) (Dodds, 1991, FAO, 2014). Primena kulture *in vitro* u formiranju banki gena omogu ava prevazilaženje problema koji se javljaju kod nekih vrsta, onemogu uju i dugoro no skladištenje njihovog semena. To su pre svega vrste sa rekalcitrantnim semenom, ili vrste koje slabo plodonose ili ije seme je sterilno ili male klijavosti (FAO, 2014, Johnson, 2002, Sarasan et al., 2006). Kultura *in vitro* se koristi kod kratkotrajnog skladištenja biljnih delova (naj eš e meristema ili embriona) pri kom se podešavanjem odgovaraju ih faktora (medijum, temperatura, i dr.) rast kultura samo usporava; a koristi se i u pripremi biljnog materijala za krioprezervaciju, kao i za dobijanje vitalnih biljaka nakon krioprezervacije. Zbog toga je osnovni korak, pre formiranja banke gena, iznalaženje optimalnog protokola za kulturu *in vitro* odabranog taksona, tj. genotipa (Dodds, 1991, FAO, 2014, Johnson, 2002).

1.3.4. Faze razmnožavanja u kulturi *in vitro*

Na in razmnožavanja *in vitro* razlikuje se zavisno od vrste, pa čak i sorte. Međutim, sve vrste tokom razmnožavanja prolaze kroz manje ili više iste faze.

U početnoj (inicijalnoj) fazi uzimaju se eksplanti sa biljaka koje su rasle u prirodnim uslovima ili u stakleniku i zasniva se kultura. Tom prilikom, eksplanti se obrađuju tako da se oslobode od patogena (sterilizacija), kako bi se u sledeću fazu razmnožavanja - fazu multiplikacije, obezbedio sterilni polazni materijal.

U fazi multiplikacije primenjuju se različite metode, a sve one imaju za cilj dobijanje što većeg broja izdanaka iz jednog početnog eksplanta, pri tom izdanci mogu da se formiraju direktno iz eksplanta ili indirektno, nakon obrazovanja kalusa. Ova faza može obuhvatati veliki broj subkultura.

Treću fazu čini ožiljavanje izdanaka koji se kada dostignu dovoljnu dužinu (obično ne manje od 10 mm), prenose na odgovarajući medijum, na kom se formira korenov sistem. Nakon toga sledi završna faza (aklimatizacija), u kojoj se dobijene biljke postepeno adaptiraju na uslove koji vladaju u prirodnoj sredini.

Kod mnogih vrsta, korenov sistem se ne obrazuje *in vitro*, već se dobijeni izdanci ožiljavaju kao zelene reznice u klasičnim supstratima za ožiljavanje (pesak, perlit). Na taj način se skraćuje i proizvodni proces, jer se formiranje korenovog sistema odvija istovremeno sa adaptacijom biljaka na uslove spoljašnje sredine. (Pierik, 1987, Vinterhalter i Vinterhalter, 1996, Grbić, 2004)

1.3.2.1. Inicijalna faza

Prilikom zasnivanja kultura, najvažnije je obezbediti zdrav, nekontaminiran polazni materijal za dalje faze razmnožavanja. Ukoliko dođe do kontaminacije, one se brzo šire, jer su uslovi u laboratoriji pogodni za razvoj patogena i za kratko vreme mogu nastati veliki gubici. Zbog toga se, pre postavljanja eksplanata na medijum za gajenje, obavezno vrši površinska sterilizacija uzetog biljnog materijala (Pierik, 1987, Vinterhalter i Vinterhalter, 1996).

Sterilizacija biljnog materijala se najčešće vrši korišćenjem rastvora natrijum hipohlorita (NaOCl) (0,5 - 4%), a nešto ređe u primenu imaju kalcijum hipohlorit Ca(OCl)_2 i živa (II) hlorid (HgCl_2). Kako bi se mogućnost pojave kontaminacija svela na minimum, eksplante je najbolje uzimati sa biljaka koje su rasle u stakleniku, gde su preduzimane intenzivne mere zaštite od pojave bolesti i štetočina. Međutim, kako to nije uvek izvodljivo, eksplanti se uzimaju i sa biljaka koje su rasle na otvorenom. To je posebno slučaj prilikom razmnožavanja drvenastih vrsta, jer se mnoge njihove karakteristike ispoljavaju tek u adultnom stadijumu, pa se i eksplanti uzimaju sa odraslih stabala. Zavisno od vrste, mogu se koristiti različiti tipovi eksplanata. Uzimaju se vrhovi izdanaka, delovi listova, lukovica, nodusi sa ili bez pupoljkom, i dr. Ipak, u inicijalnoj fazi obično se koriste vršni i pazušni pupoljci, a najčešće se sa pupoljaka iseca samo vršni meristem, veličine oko 1 mm, pa i manje, sa 2 - 3 lisne primordije (kultura vrhova meristema) (Vinterhalter i Vinterhalter, 1996, Nešković et al., 2003, Grbić, 2004).

Inicijalna faza se završava kada se obrazuju izdanci. Oni se razvijaju direktno, podsticanjem na rast već formiranih začetaka meristema, ili se formiraju adventivnim putem na delovima stabljika, listova, kotiledona, i dr. Dobijeni izdanci, koji su zdravi i pravilno formirani, koriste se potom u sledećoj fazi (faza multiplikacije). U inicijalnoj fazi, pored dobijanja izdanaka, u nekim slučajevima se indukuje kalus, iz koga će se kasnije somatskom embriogeneza ili organogeneza formirati novi izdanci. Međutim, regeneracija novih biljaka iz kalusa koristi se uglavnom prilikom različitih istraživanja, dok u komercijalnoj proizvodnji još uvek nema značajnu primenu. (Hartmann et al., 1990)

1.3.2.2. Multiplikacija izdanaka

Multiplikacija izdanaka može se obavljati na više načina. Najjednostavnije je sa dobijenih izdanaka odsecati jednodusne reznice, obično sa delom lisne drške i odgovarajućim pazušnim pupoljkom. Iz ovog pupoljka razvija se novi izdanak koji se potom, na isti način deli. Grbić (1992) ovaj metod koristi za umnožavanje izdanaka brestova, a Pierik (1987) navodi da se ovaj metod uspešno primenjuje i prilikom razmnožavanja krompira, kruške, ruža, bršljana, nekih vrba, paradajza i dr. Međutim,

ovaj metod se ne može primeniti prilikom razmnožavanja biljaka koje formiraju rozetu (vrste iz fam. Bromeliaceae, *Gerbera* L.). Tako e, faktor multiplikacije zavisi od broja pupoljaka na izdanku koji se deli. Ukoliko se formira mali broj pupoljaka, razmnožavanje se odvija relativno sporo, pa je bolje primeniti neki drugi metod razmnožavanja.

U komercijalnoj proizvodnji multiplikacija izdanaka se znatno eš e vrši proliferacijom bo nih izdanaka. Tada se izdanci dobijeni u inicijalnoj fazi prenose na medijum sa relativno visokim koncentracijama citokinina, koji spre avaju apikalnu dominaciju, ime se podsti e razvoj bo nih pupoljaka. Koncentracija i vrsta citokinina zavisi u velikoj meri od vrste koja se razmnožava. Za eksplante poreklom sa juvenilnih biljaka obi no su potrebne nešto niže koncentracije citokinina nego za one poreklom sa adultnih biljaka. Tako e, kod nekih vrsta bo ni izdanci se razvijaju i bez dodavanja citokinina (vrste iz fam. Bromeliaceae), dok je kod nekih potrebno, pored dodavanja citokinina, ukloniti i apikalni meristem da bi se razvili bo ni izdanci (*Yucca* L.). Naj eš e se koristi kombinovanje citokinina sa niskim koncentracijama auksina koje pomažu izduživanje bo nih izdanaka, a nisu suviše visoke da izazovu kalusiranje eksplanata (Pierik, 1987, Vinterhalter i Vinterhalter, 1996). Ovaj metod se esto u praksi kombinuje sa odsecanjem nodusnih reznica. Najpre se iz nodusnih reznica razvijaju izdanci koji se potom premeste na medijum sa citokininima (i nižom koncentracijom auksina) radi podsticanja razvoja bo nih izdanaka. (Pierik, 1987, Hartmann et al., 1990, Vinterhalter i Vinterhalter, 1996, Neškovi et al., 2003). Kada se razvijaju bo ni izdanci, iz pupoljaka na njima se ponovo razvijaju novi izdanci, tako da kultura ima izgled "busena". Izdanci se, kada dostignu odgovaraju u dužinu (oko 10 mm), isecaju i prenose na svež medijum radi formiranja novih bo nih izdanaka ili se prenose na medijum za ožiljavanje. Prenošenje dobijenih izdanaka na svež medijum (subkultura) vrši se, zavisno od vrste, svakih 2 - 4 nedelje (Vinterhalter i Vinterhalter, 1996, Grbi , 2004).

Proliferacijom bo nih izdanaka razmnožavanje se odvija relativno brzo, genotip biljaka ostaje o uvan (mutacije su retke), a dobijene biljke su zdrave, dobrog porasta (Pierik, 1987). Me utim, dešava se da biljke, ak i nakon ožiljavanja na medijumu bez citokinina, nastavljaju da formiraju bo ne izdanke. Ove biljke imaju žbunast habitus, a cvetovi, odnosno plodovi su im sitni. U tom slu aju, balans hormona i drugi parametri

(svetlosni režim) podešavaju se za svaki kultivar posebno, kako bi se navedene neželjene pojave spreje (Pierik, 1987).

Pored razmnožavanja jednonodusnim reznicama i proliferacijom bojih izdanaka, novi izdanci se mogu formirati i adventivnim putem, na različitim biljnim organima. Međutim, u odnosu na razmnožavanje razvojem bojih izdanaka, uspješno formiranje adventivnih izdanaka postignuto je kod manjeg broja vrsta, a mogućnost pojave mutacija bila je veća (Pierik, 1987, Hartmann et al., 1990).

Uloga hormona u formiranju adventivnih izdanaka se veoma razlikuje zavisno od vrste biljke. Kod nekih vrsta izdanci se formiraju čak i bez prisustva hormona (*Cardamine pratensis* L., *Streptocarpus* spp.). Različiti citokinini i auksini imaju i različiti uticaj na regeneraciju izdanaka. Pored njih, i drugi faktori utiču inhibitory ili stimulatory na formiranje izdanaka. Među njima su adenin, različiti vitamini, hormoni (giberelini, etilen, abscisinska kiselina), temperaturni i svetlosni režim. Tako, povećane koncentracije giberelina sprejavaju formiranje adventivnih izdanaka zumbula, cikorijske, duvana, vrsta *Begonia rex* Putz., *Plumbago indica* L. Abscisinska kiselina uglavnom deluje inhibitory na formiranje adventivnih izdanaka, ali kod *Ipomoea batatas* (L.) Lam. ona stimuliše njihovo stvaranje. Kod nekih vrsta je neophodno eksplante držati u mraku (*Freesia* spp., *Nerine* Herb., *Eucharis grandiflora* Planch. et Linden), dok kod drugih izlaganje svetlosti određene talasne dužine može biti stimulatory (*Petunia* Juss.). Takođe, uspeh regeneracije adventivnih izdanaka zavisi i od tipa eksplanta, pa se kod različitih vrsta kao eksplanti koriste i delovi različitih biljnih organa (Pierik, 1987, Hartmann et al., 1990).

1.3.2.3. Formiranje korenova i aklimatizacija biljaka

Izdanci dobijeni u fazi multiplikacije mogu se ožiljavati u uslovima *in vitro* na medijumu odgovarajućeg sastava ili u klasičnim supstratima u uslovima *ex vitro* istovremeno sa aklimatizacijom ožiljenica.

Ožiljavanjem se *in vitro* biljke pripremaju za prenos iz veštački kontrolisanih uslova u kojima su one heterotrofne ili miksotrofne, na autotrofnu ishranu u uslovima staklenika. Ova priprema biljaka uključuje i formiranje korenovog sistema, ali i

stvaranje takvih uslova u kojima bi se biljke pripremile za aklimatizaciju i preživele je u što ve em broju. Za *in vitro* ožiljavanje, pojedina ni izdanci se prebacuju u nove posude, na medijum bez citokinina, sa pove anom koncentracijom auksina, a esto se redukuje i koncentracija neorganskih soli.

Kod nekih biljaka uspešno ožiljavanje se postiže gajenjem *in vitro* izdanaka na medijumu sa auksinima 1 - 2 dana a potom se prebace na medijum bez auksina. Tako e, izdanci se mogu uroniti u rastvor auksina i neposredno zatim postaviti na medijum bez hormona. Neke biljke se najbolje ožile ako se tokom tretiranja auksinima drže u mraku.

Pre faze ožiljavanja odbacuju se svi abnormalni, aberantni ili ošte eni izdanci a postavljaju uniformni i kvalitetni. Izdanci vrsta koje imaju period mirovanja moraju da se hlade kako bi se stimulisao nov rast i izduživanje. *Ex vitro* aspekti mikropropagacije uklju uju ožiljavanje *in vivo* i aklimatizaciju biljaka a dalji rast dobijenih ožiljenica kasnije se prati u poljskim uslovima. Direktno (*ex vitro*) ožiljavanje izdanaka uz koriš enje mista ili u uslovima visoke vlažnosti je esto ekonomi nije nego njihovo ožiljavanje *in vitro*. Ožiljavanje *ex vitro* može biti dvoetapna procedura u kojoj se najpre inicira razvoj korenova u uslovima *in vitro* (tretiranjem auksinima, npr.), pa se izdanci postavljaju u supstrat za ožiljavanje i rast, ili se sve odvija u jednoj etapi, u kojoj se izdanci postavljaju direktno u supstrat za ožiljavanje. Obi no se koriste supstrati koji imaju primenu i prilikom ožiljavanja reznica konvencionalnim metodama (treset, perlit, vermikulit, itd.) (Pierik, 1987, Hartmann et al., 1990, Grbi , 2004).

Specifi ni uslovi u kulturi *in vitro* (heterotrofna ishrana u prisustvu relativno visoke koncentracije še era, visoka relativna vlažnost vazduha i manja koli ina svetlosti i priliv CO₂ nego kod kultura gajenih konvencionalnim metodama) dovode do formiranja biljaka koje imaju abnormalna morfološka svojstva, anatomsku gra u i fiziološke funkcije (Pospisilova et al., 1999). Nakon prenošenja u uslove *ex vitro* bilj ice lako mogu biti ošte ene zbog naglih promena uslova sredine, i zbog toga je potreban period aklimatizacije da bi se te abnormalnosti korigovale. Biljke koje su rasle u uslovima *in vitro* naj eš e imaju slabo razvijenu kutikulu zbog visoke relativne vlažnosti vazduha koja se u posudama kre e 90 - 100%. Zbog toga može do i do prekomerne transpiracije preko kutikule kada se biljke prebace u uslove *ex vitro*. Listovi *in vitro* biljaka su esto tanki, meki i fotosinteti ki slabo aktivni. Tokom aklimatizacije odvijaju se zna ajne promene u morfološkim i anatomskim osobinama listova, pre

svoga, u karakteristikama epiderma, debljini listova, diferencijaciji mezofila, broju i strukturi hloroplasta, zbog čega se aklimatizovane biljke razlikuju od biljaka pre aklimatizacije. Debljina listova se obično povećava, a mezofil se više diferencira u palisadni sloj i sunčerasti parenhim, gustina stomatopada, a njihov oblik se menja od kružnog kakav je bio kod *in vitro* biljaka, u eliptični (Pospisilova et al., 1999). Najvažnija promena uključuje razvoj kutikule, epikutikularnog voska i pojavu efektivnog regulisanja transpiracije preko stomata što vodi ka stabilnom vodnom režimu. Takođe, Pospisilova et al. (1999) navode da je kod aklimatizovanih biljaka povećan i sadržaj hlorofila. Korenovi koji su se razvili *in vitro* su osetljivi i ne funkcionišu dobro *in vivo*. Imaju malo ili nimalo korenskih dlakica, brzo propadaju i moraju biti zamenjeni novoformiranim korenovima tokom procesa aklimatizacije. Problem može da se javi i usled slabe razvijenosti korenovog sistema, slabe vaskularne povezanosti sa izdanom zbog čega je smanjen transfer vode iz korenova do izdanaka (McClelland, 1990, Diaz-Perez et al., 1995, Carvalho et al., 2002).

Jedan od načina za prevazilaženje problema sa aklimatizacijom *in vitro* biljaka (nefunkcionalnost u korenova i listova) je korišćenje autotrofnog sistema mikropropagacije (photoautotrophic micropropagation system - PMS). Takav sistem podrazumeva da se biljke gaje u odgovarajućim uslovima koji podstiču fotosintezu, a sami uslovi obuhvataju celokupan prostor u posudama, uključujući i koncentraciju CO₂, fotosintetički fotonski fluks, kao i podlogu u kojoj se razvija korenov sistem (Kozai i Kubota, 2005, Sarasan, 2010). Za razvoj korena potrebno je odabrati odgovarajući materijal (supstrat) koji daje potporu biljkama (agar se menja poroznim materijalima), tako da se stvore bolji uslovi za razvoj korenovog sistema (dostupnost kiseonika i hranljivih materija). Bez šerera u medijumu, sa poroznim materijalima koji obezbeđuju potporu i te medijumom, ovaj sistem podseća na hidroponski sistem gajenja, pa se naziva i "mikroponika" ("microponic") (Kozai i Kubota, 2005, Thorpe et al., 2008). Tokom poslednjih 20 godina istraživanja ovaj sistem se uspešno primenjuje kod mnogih biljnih vrsta među kojima su *Acacia mangium* Willd., *Brassica oleracea* L., *Chrysanthemum morifolium* Ramat., *Citrus macrophylla* L., *Coffea robusta* Pierre ex A.Froehner, *Solanum tuberosum* L., *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh., *Nicotiana tabacum* L., *Ipomoea batatas* (L.) Lam., *Rubus idaeus* L., *Saccharum* spp., *Lycopersicon esculentum* L. i mnoge druge (Kubota, 2002).

1.3.5. Komponente medijuma

U osnovi komponente hranljive podloge (medijuma) se mogu podeliti u dve grupe - neorganske i organske komponente. Neorganske komponente obuhvataju soli makroelemenata (azot, kalijum, kalcijum, fosfor, magnezijum i sumpor) i mikroelemenata (gvožđe, nikl, hlor, mangan, cink, bor, bakar i molibden). Navedeni elementi i ugljenik, kiseonik i vodonik čine 17 esencijalnih elemenata, koji se karakterišu specifičnom ulogom u metabolizmu biljaka i ne mogu se zameniti drugim elementom. Pored navedenih elemenata, kobalt, aluminijum, natrijum, silicijum i jod kod nekih biljaka takođe imaju ulogu esencijalnih elemenata (Grbić, 2004, George i de Klerk, 2008). Navedeni elementi se dodaju u obliku jedinjenja u određenoj koncentraciji u medijum. Oblik (jon) u kom se dodaju elementi kao i njegova koncentracija značajno utiču na razvoj kultura (George i de Klerk, 2008). Na primer, azot se dodaje u vidu nitratnog (NO_3^-) ili amonijum jona (NH_4^+). Većina biljaka usvaja azot u obliku nitrata koji se potom redukuje do amonijum jona, pre nego što se ugradi u organski molekul. U većini slučajeva, u kulturi tkiva, potrebno je biljkama obezbediti azot u oba oblika i važno je podesiti balans koncentracija oba jona u podlozi. Ukoliko je previše visoka koncentracija NH_4^+ u odnosu na NO_3^- dolazi do inhibicije razvoja korenova zbog toga podloge za kulturu korenova često ne sadrže NH_4^+ , međutim, intenzivnim usvajanjem NO_3^- dolazi do povećanja pH vrednosti medijuma za gajenje, što može da smanji usvajanje drugih esencijalnih elemenata kao što su Fe, Zn i Cu. Sastav medijuma (vrste i koncentracije neorganskih soli) koji ima najširu primenu dali su Murashige i Skoog (1962), prvobitno kao optimizaciju podloge za razvoj kalusa duvana.

Organske komponente se dodaju obično u malim količinama, to su pretežno vitamini i aminokiseline (Grbić, 2004, Thorpe et al., 2008). U ranijim istraživanjima, u sastav medijuma su često ulazile i hemijski "nedefinisane" komponente, kao što su voćni sokovi ili ekstrakt kvasca koji su često korišćeni kao organske komponente (umesto vitamina i aminokiselina). Problem je bio u činjenici da su ovakve komponente imale varijabilan hemijski sastav i nisu se mogli garantovati uvek isti rezultati. Ipak, danas se, na primer, još uvek u neke podloge dodaje kokosovo mleko zbog velike količine citokinina i drugih regulatora rasta, kao i homogenat banane (podloge za razmnožavanje orhideja) (Thorpe et al., 2008).

Poseban značaj ima dodavanje šećera u podlogu, pre svega kao izvor energije i ugljenika, ali i kao osmotikum. Najznačajniji, najčešće korišćen i ujedno najjeftiniji šećer je saharoza. Saharozom je disaharid koji se katabolitičkim procesima u biljnom organizmu razlaže na monosaharide - glukozu i fruktozu, hidrolitički (pomoću enzima invertaza) ili nehidrolitički (pomoću enzima sintaza), pri čemu se najpre formira fruktoza i uridindifosfat (UDP) glukozom (Sindelarova et al., 1999). Pored saharoze u medijum se mogu dodavati i drugi šećeri, glukozom, maltozom, laktozom ili fruktozom. U nekim slučajevima su povoljniji efekti dobijeni sa glukozom koja je bolje uticala na razvoj kultura ili je uticala na pojavu organogeneze u slučajevima kada se to nije moglo postići sa saharozom (Nowak et al., 2004, Todorović et al., 2006, Thorpe et al., 2008, Mohamed i Alsadon, 2010). Na primer, povoljniji rezultati sa glukozom ili fruktozom su dobijeni kod 7 vrsta iz roda *Alnus* (Tremblay i Lalonde, 1984, Barghchi, 1988), zatim kod *Bougainvillea* 'San Diego Red' (Steffen et al., 1988), *Castanea sativa* L., *C. crenata* Siebold et Zucc. (Chauvin i Salesses, 1988), *Nepeta rtanjensis* Diklić et Milojević (Misić et al., 2005), *Corylus avellana* L. (Yu i Reed, 1993), *Fagus* spp. (Cuenca i Vieitez, 2000) i dr.

Šećerni alkoholi (polioli, polihidroksilni alkoholi) obično ne mogu da budu metabolisani i zbog toga se ne mogu koristiti kao izvor ugljenika, ali imaju osmotsku funkciju modifikujući vodni potencijal medijuma. Zbog toga, ukoliko se koriste šećerni alkoholi u podlogu se mora dodati i šećer (saharozom) kako bi se obezbedila energija za razvoj kulture. Međutim, alkohol sorbitol pojedine vrste uspešno usvajaju i metabolišu. Thorpe et al. (2008) navode da dodavanje sorbitola u podlogu pozitivno utiče na rast kalusa jabuke, a kod nekih vrsta iz familije Rosaceae povoljno utiče na njihov rast u kulturi *in vitro*. Takođe, kod pojedinih kultivara jabuka kulture nisu rasle na medijumu sa saharozom bez sorbitola, a kod nekih drugih kultivara ('Ottawa 3') su se razvijali abnormalni izdanci dodavanjem čak niske koncentracije sorbitola. Kod duvana, kukuruza, citrusa i cikoriје, pokazano je da dodavanje šećernih alkohola stimuliše različite fiziološke procese (Thorpe et al., 2008). Pored toga, kokosovo mleko koje povoljno utiče na kulturu *in vitro* mnogih vrsta medija u kojima su *Actinidia deliciosa* C.F.Liang et A.R.Ferguson. (Nasib et al., 2008), *Ficus benghalensis* L. (Munshi et al., 2004), *Chrysanthemum morifolium* Ramat., (Laslo i Zepân, 2011), *Santalum album* L. (Janarthanam i Sumathi, 2011), *Justicia gendarussa* Burm.

(Janarthanam i Sumathi, 2010), *Carica papaya* L. (Saha et al., 2003) i velikog broja orhideja (Arditti i Krikorian, 1996, Selvakumar et al., 2001, Lee-Espinoza, 2008, Giridhar i Ravishankar, 2004, Baque et al., 2011, Nambiar et al., 2012), pored mnogih drugih jedinjenja sadrži i oko 15 gL^{-1} sorbitola (Thorpe et al.).

Zna ajnu grupu komponenti medijuma ine regulatori rasta (biljni hormoni). Me u njima u kulturi *in vitro* najve i zna aj imaju auksini, citokinini i giberelini. Auksini podsti u formiranje kalusa, deobu elija, formiranje adventivnih korenova, a inhibiraju rast i razvi e bo nih i adventivnih izdanaka, tj. omogu uju apikalnu dominaciju (Grbi , 2004, Machakova et al., 2008). Citokinini uti u na deobu elija, indukuju formiranje adventivnih i bo nih izdanaka, inhibiraju razvoj korenova. Dodavanje drugih hormona može delovati sinergisti ki ili antagonisti ki (Grbi , 2004, van Staden et al., 2008). Na primer, sa auksinima, citokinini ispoljavaju sinergisti ko dejstvo. Me utim, dodavanje giberelinske kiseline (GA_3) sa citokininima može u nekim slu ajevima imati sinergisti ki efekat (npr. multiplikacija izdanaka *Morus cathayana* Hemsl., kultura *in vitro* *Ocimum basilicum* L.) a u nekim drugim antagonisti ki efekat (proliferacija bo nih izdanaka jabuke 'McIntosh') (Machakova et al., 2008). Giberelini, u odnosu na citokinine i auksine, imaju manji zna aj u kulturi *in vitro*. Naj eš e se koristi GA_3 koja je veoma termolabilna, pa se u podlogu dodaje nakon autoklaviranja, sterilnom filtracijom. Giberelini uti u na izduživanje elija, rast meristema i pupoljaka (uki , 1985). Mogu da se koriste za prekidanje dormantnosti semena ili embriona (Grbi , 2004, Moshkov et al., 2008).

U ve ini slu ajeva, u medijum se dodaje i inertna potporna komponenta, naj eš e agar koji mu daje vrstinu i omogu ava da eksplanti budu na površini medijuma. Medijum može da bude i te an, kada se eksplanti postavljaju na specijalne drža e (Grbi , 2004).

Zna ajan faktor prilikom pripreme medijuma predstavlja pH vrednost. Od nje zavisi koje soli e biti u rastvorene u podlozi, uti e na usvajanje komponenti medijuma, odnosno dostupnost pojedinih jona, kao i na vrsto u podloge sa agarom. Inicijalna pH vrednost se obi no podešava u rasponu od 5,5 do 6,0, ali se ove vrednosti modifikuju zavisno od vrste koja se gaji (George i de Klerk, 2008, Machakova et al., 2008, Thorpe et al., 2008).

1.4. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

1.4.1. Primena kulture *in vitro* u razmnožavanju *Dianthus* spp.

Posmatraju i istraživanja vezana za kulturu *in vitro* vrsta roda *Dianthus*, prvi publikovani radovi pojavili su se relativno rano, 1963. godine (Stone, 1963) ubrzo posle otkrića kinetina - citokinina (Miller et al., 1955), i otkrića sinergističkog dejstva citokinina i auksina na formiranje i rast vegetativnih organa (Skog i Miller, 1957). Stone (1963) je uspostavio kulturu vrhova meristema *D. caryophyllus* (veličine od 0,2 mm do 1 mm) istražujući i ujedno i faktore koji utiču na njihov rast. Meristemi su uzimani sa matičnih biljaka različite starosti, tokom istave godine i gajeni u epruvetama na tečnom medijumu sa "držačem" napravljenim od filter papira. Tom prilikom došlo je i do rizogeneze čija uspešnost je zavisila od veličine eksplanta i vremena kada su oni uzeti sa matičnih biljaka. Tokom sedamdesetih godina publikovana su i druga istraživanja vezana za razvoj *D. caryophyllus* u kulturi *in vitro*. Među njima treba pomenuti istraživanja Petru i Landa (1974) koji su najpre setvom semena *in vitro* uspostavili sterilnu kulturu, a zatim su sa dobijenih klijavaca isecali hipokotil i apikalni meristem iz koga se razvio kalus. Organogenezom kalusa formirali su se izdanci koji su kasnije ožiljeni, a potom je izvršena aklimatizacija dobijenih biljaka na prirodne supstrate. Interesantno je pomenuti i istraživanja koja su sproveli Roest i Bokelmann (1981) gde su ispitivali efekat X-zraka, genotipa i pozicije eksplanta na reznici (u odnosu na terminalni pupoljak) na multiplikaciju izdanaka vegetativnih reznica odabranih 6 kultivara *D. caryophyllus* i na rizogenezu u kulturi *in vitro*.

Marković (2008) daje pregled značajnijih istraživanja vezanih za *in vitro* kulturu *D. caryophyllus* navodeći korišćenje različitih tipova eksplanata (segmenti stabla, listovi, ovarijumi, petale i sl.) i metoda (kultura suspenzije ćelija, somatska embriogeneza, organogeneza kalusa, proliferacija bočnih izdanaka) istih u pri tom značaj same vrste koja se danas komercijalno razmnožava kulturom *in vitro*, pre svega u cilju obezbeđivanja zdravih, bezvirusnih biljaka, koje se koriste kao polazni materijal za razmnožavanje klasičnim metodama - reznicama (Lubomski i Jerzy, 1989, Hartmann et al., 1990, Nugent et al., 1991, Nakano i Mii, 1992, van Altvorst et al., 1992, Messeguer et al., 1993, Nakano et al., 1994, van Altvorst et al.,

1994, 1995, Brar et al., 1995, Watad et al., 1996, Fal et al., 1999, Sato et al., 2000, Correll i Weathers, 2001, Jain et al., 2001, Valassi et al., 2003, Dole i Wilkins, 2004).

Pored navedenih, do danas je *D. caryophyllus* korišćen i za druga istraživanja u kulturi *in vitro* (Marković, 2008). Tako, na primer, Dantas et al. (2001) su ispitali dejstvo različitih uslova provetravanja kultura *D. caryophyllus* 'Nelken', prateći rast kultura, stepen multiplikacije, pojavu hiperhidričnosti, apsorpciju makroelemenata i promenu pH vrednosti. Cook i van Staden (1988) su istraživali uticaj hormona na formiranje i precvetavanje cvetova na primeru *D. caryophyllus*, a Halmagyi i Lambardi (2007) su se bavili mogućnošću krioprezervacije ove vrste. Takođe, Yadav et al. (2003) su redukovali pojavu hiperhidričnosti izdanaka *D. caryophyllus* smanjenjem koncentracija jona magnezijuma i gvožđa u podlozi, s tim da su optimalne koncentracije morale da se podešavaju posebno za svaki ispitivani kultivar, dok su Kevers et al. (2004) i Saher et al. (2004) razmatrali uzroke hiperhidričnosti, pre svega kao posledicu fiziološkog stresa biljke. Pored toga, Majada et al. (1998, 2000) su vršili različita anatomsko i morfološka istraživanja tkiva *D. caryophyllus* u kulturi *in vitro*.

Istraživanja vezanih za kulturu *in vitro* drugih vrsta komercijalno značajnih karanfila, u odnosu na *D. caryophyllus*, ima mnogo manje. Pri tome najveći broj dostupnih istraživanja u kulturi *in vitro* vezan je za vrste *D. barbatus* i *D. chinensis*. Tako su Jethwani i Kothari (1993) gajili kotiledone obe vrste (*D. barbatus* i *D. chinensis*) indukujući adventivne izdanke na podlogama sa BAP i NAA koje su potom ožiljavali na podlogama bez hormona. Takođe, Jethwani et al. (1994) su izvršili mikropropagaciju navedene dve vrste karanfila, kulturom vrhova izdanaka, a Khawar et al. (2007) su razmnožavali *D. barbatus* kulturom meristema i nodusnim reznicama (samo prvi nodus ispod apikalnog pupoljka). Kod vrste *D. chinensis* je postignuta i regeneracija izdanaka iz kalusa. Kalus je dobijen gajenjem bazalnih segmenata listova na MS medijumu uz dodatak 2,4-D (2,4 - dihlorfenoksi sirćetna kiselina). Dobijeni kalus je prenošen na sveže podloge različitog sastava, a izdanci su indukovani samo iz kalusa koji je tokom subkultura gajen na medijumu sa BAP u kombinaciji sa fenil sirćetnom kiselinom (Jethwani i Kothari, 1996). Indukciju adventivnih pupoljaka *D. chinensis* na površini lisnih segmenata, bez formiranja kalusa, izvršili su Kantia i

Kothari (2002). Tako e, i kod *D. barbatus* adventivni izdanci su se formirali organogenezom kalusa koji je indukovao iz lisnih eksplanata. Formirani izdanci su gajeni na medijumu sa GA₃ radi izduživanja, potom su ožiljavani na MS podlozi sa 2 mgL⁻¹ IBA, a dobijene biljke su uspešno aklimatizovane (Pareek i Pareek, 2005). Pored toga, Pareek i Kothari (2003) su dali uspešan postupak direktne somatske embriogeneze (bez formiranja kalusa) za *D. barbatus* i *D. chinensis* gajenjem segmenata listova u kulturi *in vitro*, a Pareek et al. (2004) su razmnožili navedene dve vrste koriste i vršne i nodusne reznice kao eksplante.

Nakano i Mii (1993a) su izvršili somatsku hibridizaciju vrsta *D. barbatus* i *D. chinensis* primenivši fuziju protoplasta, a potom su iz tako dobijenih hibridnih elija regenerisali kalus i nakon 5 meseci organogenezom kalusa - izdanke. Izdanci su ožiljeni, a dobijene biljke su cvetale u uslovima *in vitro*. Na osnovu boje cvetova, broja hromozoma i rDNA analize utvrđeno je da su dobijene biljke hibridi. Tako e, primenom iste metode izvršena je i somatska hibridizacija vrsta *D. chinensis* i *D. caryophyllus* (Nakano i Mii, 1993b). Nontaswatsri et al. (2008) su gaje i antere (sa mikrosporama u stadijumu tetrađa, jednojedarnom ili dvojedarnom stadijumu) indukovali kalus *D. chinensis* i *D. barbatus* iz kog su se potom regenerisali izdanci. Odgovarajućim testovima se pokazalo da je većina formiranih izdanaka bila diploidna.

Do sada su publikovana i druga istraživanja vezana za optimizaciju protokola mikropropagacije *D. barbatus* uz ispitivanje dejstva različitih regulatora rasta, gajenjem više tipova eksplanata (vršnih i nodusnih reznica, segmenata stabljika, listova) (Xin et al., 2009, Lapadatescu et al., 2012).

Pored vrsta *D. barbatus* i *D. chinensis*, publikovana su istraživanja vezana za kulturu tkiva drugih karanfila. Tako su Montes et al. (1997) gajili meristeme veličine 0,2 - 0,5 mm, sa apikalnih i aksilarnih pupoljaka *in vitro* biljaka *D. plumarius* koje su dobijene iz semena. Fraga et al. (2004) su izvršili eliminaciju virusa, koji predstavljaju veliki problem u proizvodnji vrste *D. gratianopolitanus*, kombinacijom kulture meristema i tretmana povišenim temperaturama. Najpre su sa materijalnih biljaka koje su rasle u stakleniku izolovali meristeme (veličine 0,3 mm) koji su se razvili u izdanke i gajili ih 3 meseca na 24 °C, a zatim narednih 6 nedelja na 37 °C. Nakon toga su sa preživelih izdanaka ponovo izolovali meristeme i ceo postupak su ponovili dok testovi nisu pokazali da su biljke oslobođene virusa. Dobijene bezvirusne biljke oni su potom

razmnožavali prate i uticaj hormona na razvoj izdanaka i korenova, pri tom koriste i kao eksplante vrhove izdanaka (3 mm dužine), jednonodusne reznice, listove i ovarijume.

1.4.1.1. Razmnožavanje ugroženih vrsta karanfila

Do sada je ve i broj ugroženih taksona karanfila razmnožavan primenom razli itih metoda kulture *in vitro*. Me u njima je *D. arenarius* L. ssp. *bohemicus* (Novák) O. Schwarz kod koga je kultura *in vitro* uspostavljena koriš enjem jednonodusnih reznica (Kovac, 1995). *Dianthus petraeus* Waldst. et Kit. ssp. *noeanus* (Boiss.) Tutin je razmožen kulturom meristema i gajenjem segmenata stabljika na kojima se obrazovao organogeni kalus iz kog su se razvili adventivni pupoljci (Radojevi et al., 1997). Sli no i taksoni *D. giganteus* d'Urv. ssp. *croaticus* (Borbás) Tutin i *D. ciliatus* Guss. ssp. *dalmaticus* (elak.) Hayek su razmnoženi gajenjem segmenata stabljika i formiranjem adventivnih pupoljaka, ali se pokazalo da se na pojedinim podlogama formirao i embriogeni kalus (Radojevi et al., 2006, 2010).

Kod ve ine taksona inicijalna kultura je uspostavljena setvom semena *in vitro* ime se postiže o uvanje genetske varijabilnosti (Pence, 1999). Me u njima je *D. superbus* L. ssp. *superbus* Domin (Mikulik, 1999), *D. spiculifolius* Schur (Butiuc-Keul et al., 2001), *D. henteri* Heuff. ex Griseb. et Schenk (Cristea et al., 2010), *D. nardiformis* Janka (Holobiuc et al., 2009), *D. giganteus* d'Urv. subsp. *banaticus* (Heuff. ex Griseb. et Schenk) Tutin. (Pop i Pamfil, 2011), *D. glacialis* Haenke ssp. *gelidus* (Schott, Nym. et Kotschy) Tutin. (Holobiuc et al., 2010a), *D. nardiformis* (Holobiuc et al., 2009, Holobiuc et al., 2010b), *D. fruticosus* L. (Papafotiou i Stragas, 2009), *D. petraeus* Waldst. et Kit. ssp. *simonkaianus* (Péterfi) Tutin (Miclaus et al., 2003), *D. pyrenaicus* Pourr. (Marcu et al., 2006) i druge.

U fazi multiplikacije kod više taksona eksplanti su bili nodusne reznice i terminalni pupoljci, me u njima su *D. spiculifolius*, *D. henteri* i *D. nardiformis*, a kod *D. superbus* ssp. *superbus* samo nodusne reznice (Mikulik, 1999, Butiuc-Keul et al., 2001, Cristea et al., 2002, Holobiuc et al., 2009, Holobiuc et al., 2010b, Cristea et al., 2010).

Detaljno istraživano i razmnožavanje *D. spiculifolius* Schur. Pored ispitivanja uticaja balansa citokinina i auksina na multiplikaciju izdanaka, ustanovljen je i protokol

za pravljenje banke gena *in vitro*, pri čemu je pozitivan efekat imalo dodavanje manitola kao osmotskog faktora u medijum (Butiuc-Keul et al., 2001, Cristea et al., 2002, Holobiuc et al., 2010, Pop i Pamfil, 2011). Tako je sprovedena su i istraživanja unapređenja protokola mikropropagacije *D. tenuifolius* Schur., *D. callizonus* Schott et Kotschy, *D. spiculifolius*, *D. superbus* L. ssp. *speciosus* (Reinchenb) Pawl. (Cristea et al., 2004, Holobiuc i Blindu, 2006).

Pored navedenih, rađena su i istraživanja kojima je bio cilj da se indukuje somatska embriogeneza kod ugroženih karanfila radi proizvodnje sintetičkog semena (Holobiuc et al., 2009). Istraživanja su obuhvatila taksone *D. tenuifolius*, *D. callizonus*, *D. spiculifolius* i *D. glacialis* subsp. *gelidus*, a u medijum je dodavan manitol kako bi se indukovao umereni osmotski stres koji prouzrokuje smanjen rast kulture, ali podstiče somatsku embriogenezu. Dobijeni somatski embrioni su uspešno klijali.

Međutim, za karanfile *D. serotinus*, *D. pinifolius* i *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* ne postoje publikovani podaci o mogućnostima njihovog razmnožavanja mikropropagacijom. Do danas, u periodu 2006 - 2007. godine su sprovedena jedino preliminarna istraživanja mogućnosti mikropropagacije *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* i *D. serotinus* (Marković et al., 2006, 2007). Tokom navedenih istraživanja, u fazi multiplikacije *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* ispitano je dejstvo samo jedne koncentracije dodatog citokinina (1 mgL^{-1} ($4,44 \text{ }\mu\text{M}$) BAP) na podlozi koja je sadržala isključivo 1/2 MS mineralne soli (Murashige i Skoog, 1962), pri čemu je indeks multiplikacije bio nizak. U fazi ožiljavanja vrste *D. serotinus* dobijen je mali procenat ožiljenih biljaka, korenov sistem je bio slabo razvijen, a faza aklimatizacije nije sprovedena. Stoga je bilo neophodno da se sprovedu detaljna istraživanja radi optimizacije protokola mikropropagacije navedena dva karanfila, kao i kompletna istraživanja mikropropagacije vrste *D. pinifolius*, kako bi se dobio jednostavan i kompletan protokol njihovog razmnožavanja.

Da bi praktična primena mikropropagacije u razmnožavanju navedenih vrsta karanfila bila moguća i ekonomski opravdana, neophodno je utvrditi tačan sastav sterilnih hranljivih podloga za umnožavanje i ožiljavanje izdanaka (ispitati dejstvo fitohormona, utvrditi tačnu koncentraciju tih hormona, odrediti sadržaj organskih i neorganskih komponenti, pH vrednost podloge), i što je od izuzetne važnosti - treba utvrditi uslove uspešne aklimatizacije dobijenih biljaka na nesterilne uslove spoljašnje sredine.

1.5. STRATEGIJA REINTRODUKCIJE DOBIJENIH BILJAKA NA PRIRODNA STANIŠTA

Kada se govori o praktičnoj zaštiti ugroženih biljnih vrsta, mogu se izdvojiti tri osnovna načina zaštite: „*in situ*” zaštita, „*ex situ*” zaštita, reintrodukcija, introdukcija, a veliki značaj ima i edukacija stručne i šire javnosti (Stevanović, 1999). Definicija ovih pojmova se može naći i u Zakonu o zaštiti prirode (SG RS, br. 36/2009 i 88/2010), pa tako „*in situ*” zaštita obuhvata zaštitu populacija vrste na prirodnom staništu, očuvanje prirodnih ekosistema, kao i očuvanje i oporavak populacija na njihovim prirodnim staništima; „*ex situ*” zaštita podrazumeva „aktivnosti na očuvanju, gajenju i razmnožavanju vrsta na mestima van njihovih prirodnih staništa, kao što su botaničke bašte, bašte, vrtovi, arboretumi, alpinetumi, banke gena, semena, plodova i vegetativnih delova, kao i specijalizovane laboratorije”; reintrodukcija se navodi kao metod zaštite i očuvanja biološke raznovrsnosti veštačkim anjem vrste na nekadašnja staništa sa kojih je išezla ili na staništa na kojima je brojnost njene populacije drastično smanjena; dok introdukcija u smislu zaštite ugroženih vrsta predstavlja njihovo unošenje na teritoriju i u ekosisteme u kojima dotada nije postojala.

Treba reći da jedinstvena terminologija u ovoj oblasti još uvek nije usvojena. Armstrong i Seddon (2008) oslanjaju se na definicije koje propisuje IUCN (1987) daju objašnjenje još nekih pojmova vezanih za reintrodukciju. Među njima je translokacija koja označava presađivanje individua ili populacija sa jednog prirodnog staništa na drugo. Augmentacija ili povećanje je termin koji se koristi za dodavanje (sadnju) novih individua u postojeću populaciju kako bi se povećala brojnost jedinki na staništu, što svakako predstavlja jedan vid reintrodukcije. Introdukcija se ponekad koristi kao sinonim za reintrodukciju ili translokaciju, ali takođe može da označava proces alohtonih i invazivnih vrsta u nova područja.

1.5.1. REINTRODUKCIJA - OSNOVE I PRINCIPI

Kada su u pitanju ugrožene vrste, potreba za reintrodukcijom se javlja ve kada je populacija određene vrste redukovana do te mere da je otežano njeno obnavljanje u prirodi (Kaye, 2009). Me utim, proces reintrodukcije je zahtevan, kompleksan, potrebna su detaljna prethodna istraživanja, troškovi su visoki, a uspeh samog procesa je neizvestan jer se pra enje stanja na lokalitetima mora vršiti godinama, pa i decenijama (Pavlik, 1996, Kaye, 2009). Uspešnost do sada sprovedenih projekata reintrodukcije se razlikuje zavisno od konkretnog slu aja, a do danas je publikovan relativno mali broj istraživanja da bi bilo mogu e izvu i generalne zaklj uke (Kaye, 2009, Godefroid et al., 2011). Ipak, i pored toga, obim do sada sprovedenih istraživanja je dovoljan da bi se dale neke smernice koje su bitne u pravljenju budu ih projekata reintrodukcija.

1.5.1.1. Faktori koje treba razmotriti prilikom reintrodukcije

Armstrong i Seddon (2008) daju detaljan prikaz faktora koji uti u na reintrodukciju vrsta i u njihovom radu se mogu izdvojiti najzna ajniji inoci o kojima treba voditi ra una pre nego što se pristupi samoj reintrodukciji bez obzira da li je re o reintrodukciji vrste na podru je sa kog je potpuno iš ezla ili je postoje a populacija drasti no smanjena. Sli no, Godefroid et al. (2011) su napravili analizu dosadašnjih publikovanih istraživanja vezanih za reintrodukciju ukupno 249 biljnih vrsta. Cilj ove analize bio je da odredi uslove potrebne za uspešnu reintrodukciju, kao i da se ustanovi koliko su uspešne bile do sada sprovedene reintrodukcije (uspostavljena nova ili zna ajno uve ana redukovana populacija), u smislu da je mogu a samoodrživost tih populacija. Pored navedenih, analizom faktora koji uti u na uspešnost reintrodukcije bavili su se i drugi autori (Barrett i Cohn, 1991, Maunder, 1992, Allen, 1994, Falk et al., 1996, Pavlik, 1996, Clark et al., 2002, Hoekstra et al., 2002, Bell et al., 2003, Parkin, 2005, Guerrant i Kaye, 2007, Rossi i Bonomi, 2007). Rezultati pomenutih analiza se u osnovi poklapaju. Ono što implicira da je reintrodukcija složen i kompleksan postupak kom se ne može površno pristupiti je

injenica da, uopšteno posmatraju i, opstanak, cvetanje i plodonošenje do sada reintrokovanih biljaka su prili no slabi, u nekim slu ajevima ak sa tendencijom opadanja (Godefroid et al., 2011). Naravno, postoje izuzeci gde je cvetanje i plodonošenje bilo obilno, ali su posmatranja na terenu izvršena samo tokom 1 - 2 godine nakon sadnje biljaka (Cognoni et al., 2013). Zbog toga je bitno pre svega uo iti razliku izme u prostog zasnivanja populacije i održivosti te populacije kao dela odgovaraju eg ekosistema. U obzir se moraju uzeti karakteristike staništa, osobine vrste ija se reintrodukcija planira, kao i mnogi drugi iniooci.

Kada se govori o karakteristikama staništa, odnosno o evaluaciji lokaliteta na kojima e se vršiti reintrodukcija, potrebno je odrediti: nagib terena, karakteristike zemljišta, mikroklimatske uslove, tip biljne zajednice i stepen degradiranosti staništa (Pavlik i Heisler, 1988). Navedene parametre treba odrediti i na lokalitetu sa kog se uzima repromaterijal (seme) i poželjno je da se reintrodukcija vrši koriš enjem biljnog materijala poreklom iz sli nih uslova u odnosu na uslove lokaliteta na kojima e se vršiti sadnja. Tako e, treba prikupiti informacije o sadašnjem i prethodnom koriš enju zemljišta na kom se vrši reintrodukcija i ukoliko je zemljište u privatnom vlasništvu, koriš enje zemljišta i postupak reintrodukcije se moraju pravno regulisati u zakonskim okvirima.

Pre izrade plana reintrodukcije potrebno je da su ve ura ena detaljna istraživanja kojima su sakupljeni podaci o samoj vrsti. Na primer, u studiji reintrodukcije *Castilleja levisecta* Greenm. (Caplow, 2004) najpre su sumirani podaci vezani za morfologiju, biologiju i rasprostranjenje vrste. Dat je prikaz staništa na kojima se vrsta javlja, stepen ugroženosti na tim lokalitetima, kao i prikaz staništa na kojima je iš ezla i podaci o njenoj nekadašnjoj rasprostranjenosti. Zatim su analizirane karakteristike staništa, tj. mikroklimatski uslovi, kao i biljne zajednice u kojima se navedena vrsta javlja. Tako e, prikazana je ekologija vrste, koja je uklju ila na in reprodukcije, fenologiju, kao i utvr ivanje potencijalnih bolesti i šteto ina. Osim toga, analiziran je i genetski diverzitet razli itih populacija ove vrste, posmatrano u odnosu na veli inu i me usobnu udaljenost postoje ih populacija. Važnost analize genetske strukture postoje ih populacija vrste ija se reintrodukcija vrši isti u razli iti autori (Neel i Ellstrand, 2003, Caplow, 2004, Parkin, 2005, Godefroid et al, 2011, Jadwiszczak et al., 2012) smatraju i da genotipovi iz odre enih podru ja mogu biti

prilagođeni na specifične uslove lokalne sredine iz koje potiču i pitanje je koliko će se adaptirati na uslove novog staništa. Osim toga, potrebno je analizirati i koliko će unos novih jedinki uticati na čitav ekosistem, uključujući i druge organizme. Pre pravilnog plana reintrodukcije potrebno je sprovesti kompletna istraživanja koja će obuhvatiti sve postojeće populacije ugrožene vrste. Naravno, treba obratiti pažnju na postojanje tzv. inbriding depresija ("inbreeding depression") koje nastaju u malim populacijama pri čemu se dobijaju biljke smanjenog porasta i vitalnosti, kao posledica povećane homozigotnosti u populaciji (Barrett i Cohn, 1991, Caplow, 2004, Zaid et al., 2007). Tako su, na primer, Kaye i Lawrence (2003) sproveli istraživanja populacija ugrožene vrste *Castilleja levisecta*, pri čemu su utvrdili da najbujniji rast, najviše formiranih cvetova i najveća u produkciju semena imaju biljke dobijene iz velikih populacija ili ukrštanjem roditeljskih biljaka poreklom iz različitih populacija, dok su najslabiji razvoj, vitalnost i najmanju produkciju semena imale biljke poreklom iz malih populacija ili dobijene samooprašivanjem. Pored inbriding depresije koja se javlja prilikom sakupljanja semena u prirodnim uslovima, nastalog spontanom oprašivanjem, kada postoji opasnost od ukrštanja sličnih genotipova, postoji i suprotna pojava, tzv. "outbreeding" depresija koja nastaje ukrštanjem individua poreklom sa različitih staništa, iz genetski diferenciranih populacija, gde kao posledica takve hibridizacije nastaje potomstvo sa manjom sposobnošću u adaptivnosti u odnosu na roditeljske biljke (Parkin, 2005, Volis i Blecher, 2010). Ono što je važno kada je u pitanju reintrodukcija je da se formira populacija sa dovoljno genetskih resursa koji bi omogućili njenu samoodrživost u smislu adaptacije na promene uslova sredine (Barrett i Cohn, 1991). Zbog toga je neophodno da biljke koje se unose na novo stanište ili se sade u cilju povećanja brojnosti već postojeće populacije imaju visok nivo genetskog diverziteta i heterozigotnosti, ali i da budu iz populacija koje su formirane u sličnim uslovima sredine zbog kasnije dobre adaptiranosti na novo stanište. U slučajevima kada se reintrodukcija vrši radi povećanja brojnosti jedinki na nekom lokalitetu, poželjno je da se seme sakuplja iz postojeće populacije u kojoj će se sadnja vršiti, ali je to ponekad neizvodljivo ukoliko posmatrana populacija produkuje malu količinu semena ili je prisutna inbriding depresija (Caplow, 2004). Analizom velikog broja studija reintrodukcije, Godefroid et al. (2011) su utvrdili da u mnogim slučajevima jedinke u reintrokovanim populacijama potiču od malog broja

roditeljskih individua, a u 7% analiziranih slučajeva čak samo od jedne biljke, što može dovesti do drastičnog opadanja reproduktivne sposobnosti biljaka u narednim generacijama.

Imaju i u vidu da danas postoji veliki broj neofita koje su naturalizovane, ponekad i invazivne, njihovo prisustvo i brojnost moraju biti analizirani na lokalitetima koji su predviđeni za reintrodukciju. Ukoliko je veliki broj neofita prisutan, onda istovremeno sa reintrodukcijom mora da se izvrši restauracija ekosistema na odabranom lokalitetu (Hill et al., 2005, Kaye, 2008). Treba razmotriti i da li postoji kompeticija ugrožene vrste sa drugim vrstama na staništu, naročito ukoliko su prisutne invazivne vrste jer u nekim slučajevima sprovođenje određenih mera nege tokom reintrodukcije (prihranjivanje, npr.) može više da pogoduje invazivnim vrstama i uopšte neofitama nego vrsti koja se reintrodukcija sprovodi (Lake i Leishman, 2004, Parkin, 2005, Armstrong i Seddon, 2008, Kaye, 2009, Godefroid et al., 2011). Zbog toga se prethodno mora detaljno proučiti biologija i ekologija vrste koja se reintrodukcija vrši (Elzinga et al., 1998, Jadwiszczak et al., 2012), kako bi se na osnovu toga predvideo prijem i dalji razvoj posadenih biljaka na staništu. U obzir treba uzeti veličinu biljaka, rast, polinaciju, rasejavanje i klijanje semena, karakteristike staništa, istoriju vrste i karakteristike prirodnog areala (Falk et al., 1996, Pavlik, 1996, Hoekstra et al., 2002, Guerrant i Kaye, 2007, Kaye, 2008, 2009, Godefroid et al., 2011).

Pri izradi plana reintrodukcije, važno je razmotriti i obim sadnje jer suviše male grupe novoposadenih biljaka nisu trajne, a reprodukcija u okviru takve populacije je smanjena (Menges, 1991, Armstrong i Seddon, 2008). S druge strane, obim sadnje zavisi od količine dostupnog repromaterijala i planiranih troškova. Analizirajući dostupne podatke i do sada publikovane studije i istraživanja vezana za uspešnost reintrodukcije i stabilnost dobijenih populacija, Guerrant i Fiedler (2004) su prikazali neke generalne smernice za uspešnu reintrodukciju. Dostupni podaci su se razlikovali zavisno od vrste koja se reintrodukcija je planirana, ali se pokazalo da je u većini slučajeva za uspešnu reintrodukciju sa ciljem da se uspostavi populacija od oko 1000 jedinki na odabranom lokalitetu bilo potrebno 3-4 puta više juvenilnih sadnica koje su se pokazale u većini slučajeva kao najbolji izbor (najmanje propadanje i najbrži rast nakon prijema) u odnosu na ostale tipove propagula (seme, klijavci, starije sadnice u većini dimenzija). U pojedinim slučajevima prijem mlađih sadnica može biti i slabiji u

odnosu na prijem starijih biljaka, ali zavisi od konkretne vrste. Do sli njih zaklju aka došli su i Godefroid et al. (2011), tj. da vrsta i veli ina propagula uti e na prijem biljaka, i da se biljke dobijene direktnom setvom na lokalitetu slabije razvijaju, ali da je ipak direktna setva opravdana u slu aju kad je proizvodnja sadnica skupa.

U planu reintrodukcije treba predvideti i adekvatne mere nege u odre enom periodu i proceniti kako e uticati na njeno kasnije širenje i samostalni opstanak. Na primer, u po etku se može podsta i prijem biljaka tako što e se ograni iti pristup herbivorama (ispaša stoke, npr.), ali se postavlja pitanje u kom periodu tokom godine je takvo ograni avanje efikasno i koliko dugo treba sprovoditi takve mere dok se populacija ugrožene vrste ne pove a toliko da bude sposobna da opstane uprkos spoljašnjim faktorima koji su neminovni (ispaša, sušne godine, kompeticija). Obrada zemljišta i vreme sadnje imaju zna ajnog uticaja na prijem biljaka. Prihrana u nekim slu ajevima deluje povoljno na prijem posa enih biljaka, a u drugim deluje samo na pove anje dimnezija posa enih jedinki. Sprovo enje eksperimenta pre reintrodukcije za utvr ivanje takvih podataka je otežano kada su u pitanju ugrožene vrste (ograni ena koli ina biljnog materijala za eksperimente) i zato je potrebno izvršiti analizu i prognozu na osnovu podataka o samoj biologiji vrste, njenoj reprodukciji i na inu obnavljanja populacije u prirodi (Elzinga et al., 1998, Parkin, 2005, Kaye, 2008, 2009, Armstrong i Seddon, 2008, Godefroid et al., 2011). Me utim, i pored nemogu nosti sprovo enja detaljnih oglada pre reintrodukcije, važno je da pri samoj reintrodukciji postoji eksperimentalan pristup, uz testiranje postavljenih hipoteza i merenje i analizu dobijenih rezultata, kako bi se faktori koji pozitivno uti u na uspešnost procesa reintrodukcije lakše identifikovali, ali i uo ile greške koje bi trebalo izbe i u nekim narednim projektima reintrodukcije (Guerrant i Kaye, 2007, Kaye, 2008). Tako su, na primer, Reckinger et al. (2010) tokom sedmogodišnjih istraživanja pratili uticaj na ina sadnje, starosti sadnica i porekla sadnog materijala na reintrodukciju *Scorzonera humilis* L. (Asteraceae). Prilikom reintrodukcije vrste *Purshia subintegra* (Kearney) Henrickson su vršena detaljna istraživanja tokom 6 godina kako bi se utvrdilo da li je ta vrsta sposobna za širenje populacije spontanim rasejavanjem semena i na kakvim habitatima bi mogla da se subspontano širi nakon sadnje (Maschinski et al., 2004).

Nakon prikupljanja svih relevantnih podataka definišu se ciljevi reintrodukcije koji mogu da uklju e pove anje brojnosti na staništima sa kriti no smanjenom populacijom i reintrodukciju na staništa sa kojih je vrsta iš ezla. U okviru toga se definišu i lokaliteti na kojima e se vršiti reintrodukcija, kao i obim sadnje (ukoliko se ne vrši direktna setva semena na lokalitetu) - brojnost jedniki, površina na kojoj e se vršiti sadnja, raspored biljaka na odabranom lokalitetu kako bi se optimizovalo njihovo kasnije širenje na toj površini. Plan reintrodukcije tako e mora da sadrži informacije o planu i predvi anju razvoja okolnog podru ja, i mora se uraditi procena kako e dalji razvoj i koriš enje okolnih površina uticati na stabilnost i održivost habitata na kom se obavlja reintrodukcija.

Postavljaju i ciljeve reintrodukcije, neophodno je razmotriti i mogu e probleme kako bi se mogu nost njihove pojave svela na minimum. Pove anje brojnosti odre ene vrste ili njeno unošenje na odabrani lokalitet može uticati na populacije drugih vrsta posmatranog staništa (Gamon et al., 2000, Parkin, 2005). Prijem biljaka posa enih prilikom reintrodukcije može biti dobar, i biljke mogu uspešno opstajati 2, 3 ili 4 godine, a da pri tom sama populacija ne bude stabilna na duži vremenski period. To može dovesti do pogrešnih procena, eventualno promene kategorije ugroženosti posmatrane vrste, smanjenog obima pra enja i stepena zaštite, što može dovesti do gubitka i smanjenja populacije. Suviše naglo i "zbrzano" sprovedena reintrodukcija, bez detaljnih prethodnih istraživanja genetike populacije može rezultirati genetski siromašnom populacijom na obnovljenim staništima, ili ak genetski kontaminirati postoje u prirodnu populaciju (Gamon et al., 2000, Parkin, 2005). Zbog toga se reintrodukciji mora pristupiti tako da se mogu e negativne posledice izbegnu, uz definisanje pokazatelja uspešnosti reintrodukcije, posmatrane i kratkoro no i dugoro no. Ono što mnogi autori isti u (Pavlik, 1996, Menges, 2008, Albrecht et al., 2011, Godefroid et al., 2011) je da uspešno reintrodukovana populacija mora biti sposobna da se obnavlja i prilago ava promenama, da se druga i tre a generacija biljaka samostalno razvija i da postoje indikacije da populacija kao takva može postojati decenijama. Štaviše, jedan od pokazatelja uspeha može biti i pojava da novozasnovana populacija rasejava seme u okolno podru je, subspontano se šire i. Me utim, analizom do sada publikovanih istraživanja koju su sproveli Menges (2008) i Godefroid et al. (2011) utvr eno je da se u mnogim radovima kao pokazatelj uspešnosti koristi

procenat prijema biljaka na staništu, umesto intenzitet njihovog cvetanja, plodonošenja i uopšte reprodukcije. Me utim, ak ni visok procenat prijema biljaka na staništu ne zna i da e one opstati i zbog toga se preporu uje njihovo pra enje najmanje narednih 10 godina (M a u n d e r, 1992) dok pojedini autori preporu uju pra enje populacije do 25 godina (A l l e n, 1994), pa i duže, definišu i uspešnost reintrodukcije ukoliko verovatno a nestanka reintrodotkovane populacije u narednih 100 godina bude manja od 5% (B e l l e t a l., 2003). Prema P a v l i k u (1996) ako se posmatra kra i vremenski period (5-10 godina), reintrodukcija je uspešna ukoliko je formirana populacija sposobna da samostalno opstane u smislu reprodukcije i obnavljanja, što zna i da produkuje dovoljnu koli inu semena (odgovaraju e geneti ke varijabilnosti), razvijaju i se na razli itim mikrostaništima tog podru ja. Dugoro an uspeh se ogleda se u sposobnosti populacije da se potpuno integriše u ekosistem i prilagodi mogu im promenama okruženja evolucijom i migracijom.

Sumiraju i sve napred navedeno kao i na osnovu preporuka mnogih autora koji su se bavili strategijama reintrodukcije (M a u n d e r, 1992, A l l e n, 1994, F a l k e t a l., 1996, P a v l i k, 1996, H o e k s t r a e t a l., 2002, B e l l e t a l., 2003, R o s s i i B o n o m i, 2007, A r m s t r o n g i S e d d o n, 2008, K a y e, 2008, A l b r e c h t e t a l., 2011) možemo formirati korake koje je neophodno sprovesti prilikom pravljenja plana za reintrodukciju ispitivanih taksona *D. serotinus*, *D. pinifolius* i *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*, odnosno informacije koje bi plan reintrodukcije trebalo da sadrži.

1. Pre pristupanja reintrodukciji, potrebno je prikupiti detaljne informacije o karakteristikama svih lokaliteta na kojima se posmatrani takson javlja ili svih lokaliteta u odabranom regionu.

Konkretno, treba formirati bazu podataka koja sadrži spisak svih lokaliteta, zatim, neophodno je izvršiti kartiranje tih lokaliteta, zabeležiti njihove granice, površinu, biljne vrste i životinjske koje su zastupljene, kao i izvršiti analizu uticaja faktora okolne sredine na stanje na posmatranom lokalitetu (npr. pošumljavanje, ispaša, blizina naselja). Kako se *D. serotinus* i *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* javljaju u blizini državne granice Republike Srbije, a kako je *D. pinifolius* balkanski endemit, podatke o lokalitetima treba sakupiti i za susedne zemlje (M a r s k a - *D. serotinus*,

Rumunija - *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*, Bugarska - *D. pinifolius*), ukoliko je posmatrani takson tamo zabeležen.

2. Prikupiti detaljne podatke o samom taksonu.

Pre svega, važno je znati biologiju ispitanih taksona, na in reprodukcije i obavljanja njihove populacije u prirodi. Tako e, važno je da se uradi detaljna analiza genetske strukture populacija, kako bi se na osnovu toga mogao dalje praviti plan o sakupljanju polaznog materijala za reintrodukciju, kao i za augmentaciju postoje ih populacija. Ovaj korak je veoma važan u dugoro nom planiranju jer od njega zavisi samoodrživost populacije u smislu spre avanja inbriding depresija.

3. Na osnovu prikupljenih podataka, odabrati lokalitete na kojima e se vršiti reintrodukcija. Pri tom, za svaki lokalitet treba odrediti naziv i položaj, navesti razloge za njegov odabir i prioritet konkretnog lokaliteta u odnosu na ostale koji su odabrani.

4. Za svaki odabrani lokalitet treba raspolagati slede im informacijama:

- karakteristike staništa,
- da li su zabeleženi poreme aji ekosistema ili drugi problemi staništa,
- stepen aktivnosti herbivora,
- stepen zašt i enosti (kategorija zaštite),
- na in upravljanja,
- namena i na in koriš enja susednih površina,
- pristupa nost (blizina puteva),
- vlasništvo nad zemljištem,
- blizina drugih populacija posmatranog taksona
- karakteristike okolnih ekosistema
- planiranje razvoja i gazdovanja površina koje se nalaze u okruženju lokaliteta,
- zakonski okviri sprovo enja reintrodkcije na odabranom lokalitetu

5. Nakon obrade prikupljenih informacija, kao i nakon odabira izvora repromaterijala (semena) i utvr ivanja na ina i kompletnog protokola za proizvodnju sadnog materijala za reintrodukciju, treba napraviti plan konkretnih koraka tokom reintrodukcije:

- dizajn reintrodukcije (prostorni raspored, koli ina sadnica ili semena),

- priprema lokaliteta za sadnju
- plan za praćenje razvoja biljaka i dopunu (dodatna sadnja ili setva)
- plan praćenja prijema (način, uсталost, br. godina praćenja)
- plan nege (način, uсталost)
- plan načinu gazdovanja odabranim lokalitetom
- način evaluacije sprovedenih mera i dobijenih rezultata.

Ovaj plan je veoma važan, zahteva timski rad i multidisciplinarni pristup. Prostorni raspored sadnje se ne može proizvoljno određivati, moraju se uzeti u obzir i druge vrste koje su prisutne na staništu, pogotovo ako među njima ima i ugroženih taksona, u kom slučaju je poželjno da se reintrodukcija izvodi istovremeno za više ugroženih vrsta na istom staništu. Na primer, *D. serotinus* se u Subotičko - Horgoškoj pešarišti sreće na malim površinama koji se nalaze između njiva i pošumljenih parcela. Kartiranjem i analizom lokaliteta, potrebno je utvrditi minimalnu veličinu populacije koja može da opstane i u tom slučaju možda neće biti dovoljna, a ni poželjna, sadnja velikog broja individua na jednoj površini, koliko je možda važnija defragmentacija staništa i formiranje populacije na površini koja će joj obezbediti dugoročan opstanak.

6. Periodično (obično jednom godišnje) potrebno je izvršiti obradu prikupljenih informacija o stanju na lokalitetima, zatim na osnovu toga dati izveštaj o uspešnosti sprovedene reintrodukcije (odnosno faze reintrodukcije) i dati ukoliko je potrebno plan daljih mera i postupaka na odabranom lokalitetu.

Reintrodukcija vrsta na prirodna staništa veoma kompleksan proces, koji zahteva multidisciplinarni pristup, obimna prethodna istraživanja, i detaljna planiranja strategije. U svemu tome, važnu ulogu ima i *ex situ* konzervacija, ali se njen značaj ogleda pre svega u tome što ona predstavlja predstavlja način očuvanja genetskih resursa koji se koriste za *in situ* projekte (Havens et al., 2006, Guerrant i Raven, 2003, Hohn, 2008, Volis i Blecher, 2010). U tom smislu, rezultati dobijeni u ovom radu imaju značaj za efikasno obezbeđivanje velike i dovoljne količine materijala koji će biti upotrebljen u projektima i studijama reintrodukcije, uz očuvanje genetičke raznovrsnosti, a bez velikog pritiska načinu ugroženu prirodnu populaciju.

2. CILJ RADA

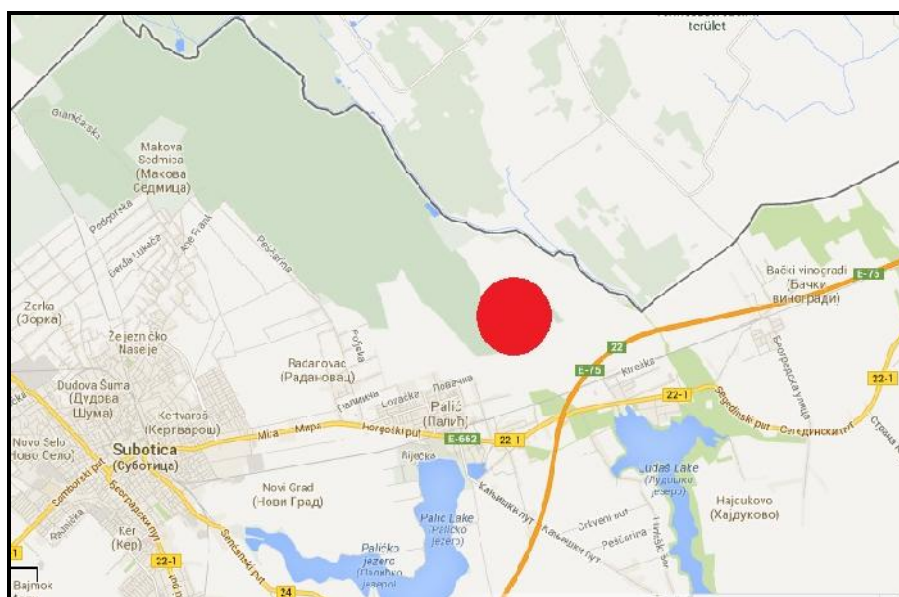
Osnovni cilj istraživanja sprovedenih u okviru ove disertacije je da se utvrde optimalni uslovi mikropropagacije ugoženih taksona *Dianthus. serotinus*, *D. pinifolius* i *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* i odredi kompletan i detaljan protokol za njihovo razmnožavanje u uslovima *in vitro*. Istraživanja obuhvataju:

- uspostavljanje sterilne *in vitro* kulture *D. serotinus*, *D. pinifolius* i *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*, korišćenjem semena kao polaznog materijala koji omogućavaju uočavanje genetske varijabilnosti populacije;
- ispitivanje efekta različitih koncentracija fitohormona BAP i NAA, tipa eksplanta, koncentracije MS soli i različite pH vrednosti hranljive podloge na razvoj kultura ispitivanih taksona u fazi multiplikacije;
- utvrđivanje mogućnosti korišćenja glukoze, fruktoze i sacharozе kao izvora ugljenika u mikropropagaciji istraživanih taksona, kao i efekat šećernog alkohola sorbitola na razvoj kultura *D. serotinus*;
- optimizacija uslova ožiljavanja *in vitro* sva tri ispitivana taksona - uticaj koncentracije NAA u podlozi i uticaj tipa eksplanta i koncentracije MS soli na rizogenezu;
- ispitivanje mogućnosti ožiljavanja ispitivanih taksona na podlogama bez agara, istovremeno sa aklimatizacijom;
- aklimatizacija ožiljenih *in vitro* biljaka istraživanih taksona na prirodne supstrate.

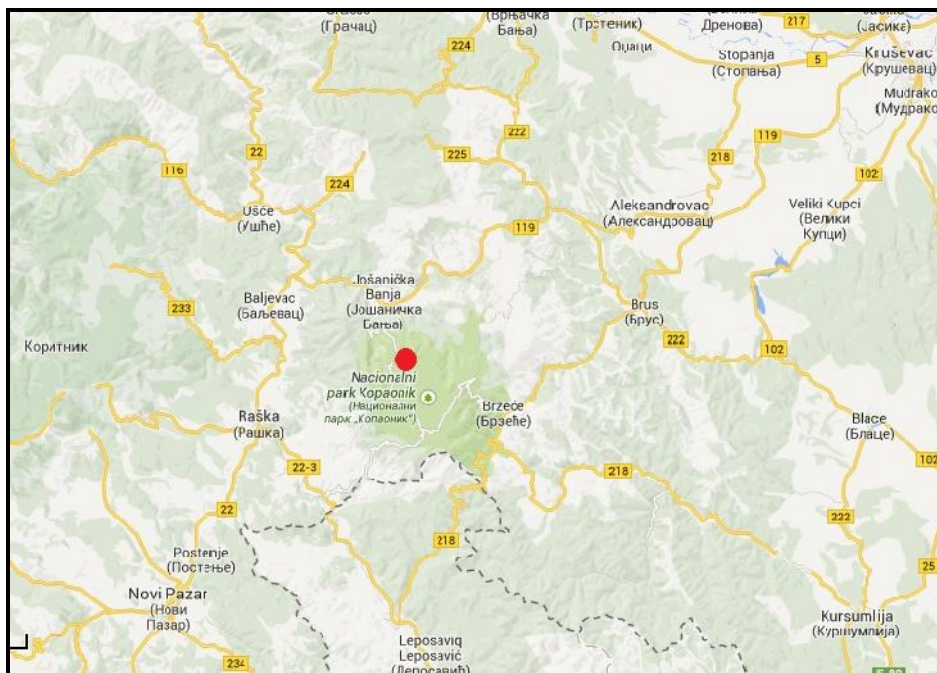
3. MATERIJAL I METOD RADA

3.1. INICIJALNI MATERIJAL ZA KULTURU *IN VITRO*

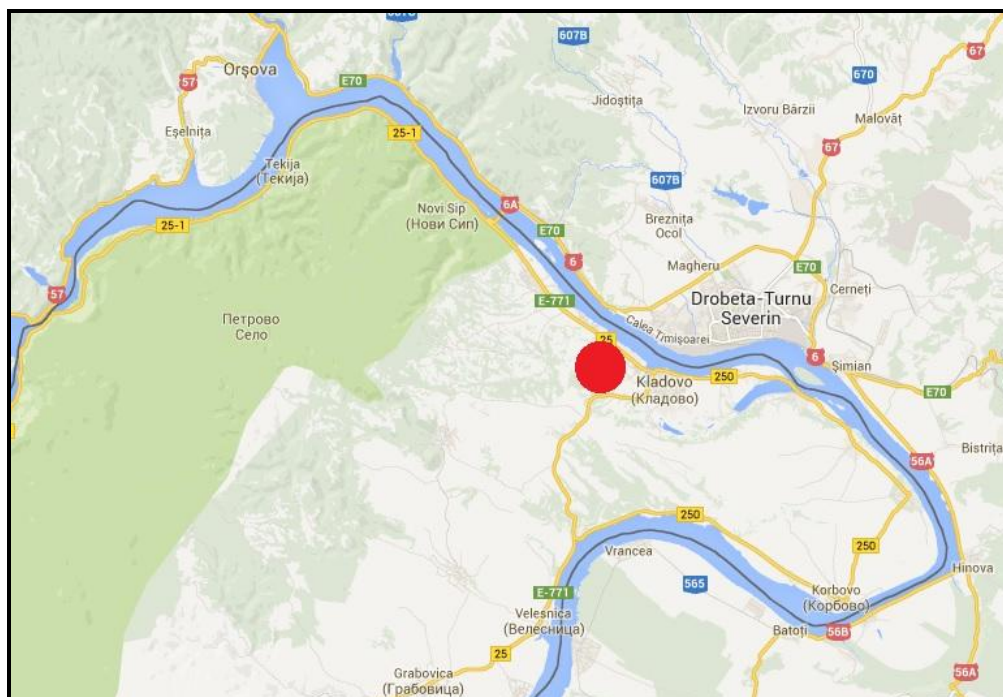
Seme koriš eno za zasnivanje kulture *in vitro* sakupljeno je u periodu jul - avgust na lokalitetima: Suboti ko – Horgoška peš ara (*D. serotinus*), (slika 8), Kopaonik (*D. pinifolius*), (slika 9) i Kladovska peš ara (*D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*), (slika 10). aure su ubrane sa 5 - 6 biljaka, sa svake biljke po 4 - 5 aura i stavljene u papirnu kesu u kojoj su donete u Laboratoriju za kulturu tkiva Šumarskog fakulteta. Po donošenju u laboratoriju, seme je istresano iz aura i uvano u papirnoj kesi na sobnoj temeperaturi do upotrebe.



Slika 8 Lokalitet na kom je sakupljeno seme *D. serotinus*



Slika 9 Lokalitet na kom je sakupljeno seme *D. pinifolius*



Slika 10 Lokalitet na kom je sakupljeno seme *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*

3.2. HRANLJIVE PODLOGE I USLOVI ZA RAZVOJ KULTURA

Hranljiva podloga MS bila je osnova za sve hranljive podloge za kulturu *in vitro* tokom postavljanja serije ogleda. Ona je sadržala MS neorganske soli (Murashige i Skoog, 1962) (tabela 1), organske supstance (tabela 2), saharozu (30 gL^{-1}), agar (8 gL^{-1}) i inozitol (100 mgL^{-1}). Za pojedine eksperimente korišćena je hranljiva podloga 1/2MS koja je imala iste komponente kao i MS, ali su MS neorganske soli i organske supstance dodane u upola manjoj koncentraciji. Jedino je sadržaj saharoze i agara ostao nepromenjen.

Sastav podloga MS i 1/2MS je modifikovan za potrebe daljih eksperimenata. Prilikom ispitivanja uticaja različitih koncentracija citokinina (BAP) i auksina (NAA) u osnovne podloge dodavani su navedeni hormoni u različitim koncentracijama. U eksperimentima u fazi ožiljavanja dodavani su samo auksini (NAA) u različitim koncentracijama. Za ispitivanje uticaja koncentracije i vrste šećera na razvoj kultura u fazi multiplikacije, osnovne podloge MS i 1/2MS su modifikovane tako što su umesto 30 gL^{-1} saharoze dodavani glukoza ili fruktoza ili kombinacija fruktoze i šećernog alkohola sorbitola.

Pre autoklaviranja pH vrednost podloge u većini eksperimenata podešavana na 5,8 dodavanjem 0,1 M HCl i 0,1 M NaOH, izuzev u eksperimentima u kojima je vršeno ispitivanje uticaja pH vrednosti na razvoj kultura u fazi multiplikacije i ogledima u kojima su dodavane različite koncentracije šećera. Podloga je razlivena u staklene posude koje su zatvorene jednoslojnom gazom, preko čega je stavljen sloj vate i zatim aluminijumska folija. Autoklaviranje je izvršeno na temperaturi od $121 \text{ }^\circ\text{C}$ u trajanju od 20 minuta.

Tokom svih eksperimenata u fazi multiplikacije i ožiljavanja, posude sa eksplantima su smeštene u klima komoru u kojoj je održavana temperatura $T = 25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Kulture su gajene u uslovima dugog dana (fotoperiod 16 h svetla i 8 h mraka). Korišćene su fluorescentne bele cevi „Tesla“ – Pan evo, sa gustinom fotonskog fluksa od $50 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Tabela 1 Sadržaj neorganskih soli u medijumu MS (Murashige i Skoog, 1962)

supstanca	koncentracija (mgL ⁻¹)
KNO ₃	1 900
NH ₄ NO ₃	1 650
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440
KH ₂ PO ₄	170
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8,6
H ₃ BO ₃	6,2
KI	0,83
NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,025
FeSO ₄ · 6H ₂ O	27,8
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	37,2

Tabela 2 Sadržaj organskih komponenti u medijumu MS

supstanca	koncentracija (mgL ⁻¹)
tiamin HCl	0,05
nikotinska kiselina	0,25
glicin	1,00

3.3. USPOSTAVLJANJE STERILNE KULTURE

Površinska sterilizacija semena je izvršena u 4% rastvoru natrijum hipohlorita (NaOCl), komercijalni preparat "Snežnik" (proizvođa Panonija, Pan evo) uz dodatak 2 - 3 kapi preparata Tween 20 (proizvođa Sigma), u trajanju od 20 minuta. Posle sterilizacije seme je u laminarnoj komori ispirano sterilnom destilovanom vodom tri puta po tri minuta. Nakog toga je postavljano na površinu medijuma kako bi se dobili nekontaminirani klijavci.

Klijanje je izvršeno na osnovnoj hranljivoj podlozi (MS), u staklenim posudama dimenzija 5 x 5 x 13 cm, sa po 25 mL⁻¹ medijuma. Postavljeno je po 100 semena *D. serotinus* i *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*, i 40 semena *D. pinifolius*, u svaku posudu po pet.

3.4. FAZA MULTIPLIKACIJE

Nakon tri nedelje po postavljanju, mlade biljke sva tri karanfila su bile visine 3 - 7 cm, sa po 2 do 5 nodusa. Sa njih su isecane jednonodusne i vršne reznice sa 1 - 2 nodusa i postavljene na podloge za umnožavanje izdanaka - osnovna hranljiva podloga (MS) u koju je dodavano 0,44 - 4,44 μM BAP i 0,54 - 2,68 μM NAA. U prvim fazama oglada nisu vršena merenja, već je cilj bio da se dobije što veća količina izdanaka koji će se koristiti za postavljanje serije oglada.

Deo izdanaka je pre postavljanja oglada gajen na osnovnoj hranljivoj podlozi (MS) bez hormona tokom 5 - 10 dana kako bi se eliminisao mogući uticaj podloge sa koje potiču izdanci na rezultat narednih oglada, a deo je i dalje gajen na podlogama za umnožavanje izdanaka kako bi se obezbedio materijal za naredne oglade. U svim

ogledima u fazi multiplikacije korišćeno je tri tipa eksplanata: nodusne reznice (sa jednim nodusom, dužine 5 - 8 mm), terminalni pupoljci (sa delom stabljike ispod pupoljka dužine 3 - 5 mm) i vršne reznice (sa 1 vršnim pupoljkom i 1 nodusom, dužine 10 - 15 mm).

Tipovi eksplanata su odabrani vode i se rezultatima koji su dobijeni prilikom mikropropagacije vrste *D. deltoides* (Marković, 2008, Popović et al., 2008) gde je pokazano da se eksplanti samo sa aksilarnim pupoljcima (jednonodusna reznica) ili samo sa apikalnim pupoljkom (terminalni pupoljak) različito razvijaju u kulturi *in vitro* u odnosu na eksplante koji sadrže oba tipa pupoljaka (vršne reznice sa nodusom), verovatno kao posledica balansa endogenih hormona. To je naročito bilo uočljivo u pojavi vitifikacije, koja je bila izuzetno visoka kod eksplanata samo sa apikalnim ili aksilarnim pupoljcima, dok kod izdanaka sa oba tipa pupoljaka gotovo da vitifikacije nije ni bilo.

3.4.1. Uticaj balansa hormona na razvoj izdanaka

Kako bi se odredile najpovoljnije koncentracije hormona u osnovnu hranjivu podlogu (MS) i u modifikovanu podlogu koja je sadržala upola manje koncentracije mineralnih i organskih komponenti (1/2MS) dodato je 0,44 - 8,88 μ M BAP i 0,54 - 5,37 μ M NAA (tabela 3).

Medijum je razliven u staklene posude dimenzija 5 x 5 x 13 cm, posude su sadržale po 25 mL medijuma i u svaku je bilo postavljeno po 5 eksplanata istog tipa. Ukupno je bilo 12 medijuma sa različitim koncentracijama BAP i NAA na koje je uneto ukupno po 720 nodusnih reznica, 720 terminalnih pupoljaka i 720 vršnih reznica za svaki od istraživanih taksona. Eksperimenti su ponovljeni 3 puta, sa po 20 eksplanata po tretmanu.

Tabela 3 Sastav podloga za ispitivanje uticaja balansa hormona na razvoj izdanaka

Hormoni		Osnovna podloga
BAP (μM)	NAA (μM)	
8,88	5,37	MS
8,88	2,68	MS
4,44	2,68	MS
4,44	0,54	MS
2,22	2,68	MS
2,22	0,54	MS
0,44	0,54	MS
4,44	2,68	1/2MS
4,44	0,54	1/2MS
2,22	2,68	1/2MS
2,22	0,54	1/2MS
0,44	0,54	1/2MS

3.4.2. Uticaj pH vrednosti hranljive podloge na razvoj izdanaka

Tokom eksperimenata koriš ena je osnovna hranljiva podloga MS ili 1/2MS, kod *D. serotinus* sa dodatkom 2,22 μM BAP i 2,68 NAA, u koncentraciji koja se prema preliminarnim istraživanjima Markovi et al. (2007) pokazala kao najpovoljnija, a kod ostala dva karanfila koncentracije citokinina su podešene na osnovu preliminarnih rezultata prve serije eksperimenata u okviru ovih ostraživanja i kod oba ispitivana taksona u podloge je dodato 0,44 μM BAP i 0,54 μM NAA. U ovim eksperimentima, pH vrednost podloge se kretala u opsegu od 5,8 do 8,8 (tabela 4).

Tabela 4 Podloge koriš ene prilikom ispitivanja uticaja pH vrednost na razvoj kultura

<i>D. serotinus</i>		<i>D. pinifolius</i>		<i>D. giganteiformis</i> ssp. <i>kladovanus</i>	
pH vrednost	osnovna podloga	pH vrednost	osnovna podloga	pH vrednost	osnovna podloga
5,8	MS	5,8	MS	5,8	MS
6,8	MS	6,8	MS	6,3	MS
7,8	MS	7,4	MS	6,8	MS
8,8	MS	-	-	7,8	MS
5,8	1/2MS	5,8	1/2MS	5,8	1/2MS
6,8	1/2MS	6,8	1/2MS	6,3	1/2MS
7,8	1/2MS	7,4	1/2MS	6,8	1/2MS
8,8	1/2MS	-	-	7,8	1/2MS

Ekperimenti nisu istovremeno sprovedeni sa sva tri ispitivana taksona, ve su istraživanja ra ena sukcesivno, zbog ograni enog kapaciteta laboratorije. Najpre su ekperimenti ra eni sa vrstom *D. serotinus*, zatim sa manjim ili ve im preklapanjima sa *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* i *D. pinifolius*. Zbog toga, kada su dobijeni preliminarni rezultati sa *D. serotinus*, na osnovu njih su napravljene neke modifikacije u tretmanima kod taksona koji su kasnije istraživani.

Tako su u ekperimentima sa *D. pinifolius* izostavljene visoko alkalne podloge sa pH 7,8 i 8,8 koje su bile nepovoljne i za vrstu *D. serotinus* koja pri tom u prirodi raste na alkalnom zemljištu (pesku). Maksimalna pH vrednost u ekperimentima sa ovom vrstom iznosila je 7,4 (tabela 4). Tako e, kod *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* je izostavljena podloga sa veoma visokom pH vrednoš u (8,8), a umesto nje, radi dobijanja preciznijih rezultata dodata je hranljiva podloga sa pH = 6,3 (tabela 4).

Kod vrste *D. serotinus* ogled je obuhvatio ukupno 7 tretmana, pri emu je postavljeno po 420 eksplanata svakog tipa (nodusne reznice, terminalni pupoljci, vršne reznice). Istraživanja vezana za vrstu *D. pinifolius* obuhvatila su 6 tretmana (postavljeno

po 360 eksplanata), a za *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* 8 tretmana (postavljeno po 480 eksplanata svakog tipa). Koriš ene su staklene posude istih dimenzija kao i u prethodnom eksperimentu (5 x 5 x 13 cm), sa po po 25 mL⁻¹ medijuma. U svaku posudu je bilo postavljeno po 5 eksplanata istog tipa, 20 eksplanata po tretmanu u tri ponavljanja.

3.4.3. Uticaj koncentracije i vrste še era na razvoj izdanaka

Tokom istraživanja osnovna MS i 1/2MS podloga je modifikovana dodavanjem razli itih izvora ugljenika - saharoze, fruktoze i glukoze u koncentracijama 10 - 70 gL⁻¹ (tabela 5), a koncentracija agara je ostala nepromenjena.

Kod *D. serotinus* sprovedena su detaljna istraživanja koja su uklju ila, pored dodavanja razli itih še era (saharoze, fruktoze, glukoze) u podlogu, i dodavanje še ernog alkohola sorbitola. Uticaj sorbitola ispitivan je preliminarno, jer se do sada nije koristio u kulturi *in vitro* drugih karanfila. Kao i u prethodnom ogledu, sve podloge na kojima je gajen *D. serotinus* sadržale su 2,22 μM BAP i 2,68 μM NAA.

Tabela 5 Sastav podloga za ispitivanje uticaja vrste i koncentracije še era na razvoj izdanaka

vrsta še era	koncentracija še era (gL ⁻¹) i MS soli		
	<i>D. serotinus</i>	<i>D. pinifolius</i>	<i>D. giganteiformis</i> ssp. <i>kladovanus</i>
saharoza	10, 30, 50, 70	10, 30, 50, 70	10, 30, 50, 70
glukoza	10, 30, 50, 70	10, 30, 50, 70	10, 30, 50, 70
fruktoza	10, 30, 50, 70	10, 30, 50, 70	10, 30, 50, 70
fruktoza- sorbitol	10, 30, 50, 70	-	-

Napomena: Kod *D. serotinus* i *D. pinifolius* koriš ene su obe podloge, MS i 1/2MS, a kod *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* samo 1/2MS

Eksplanti su postavljeni na MS i 1/2MS podloge ija je pH vrednost podešena na 6,3 pre autoklaviranja. Kod *D. serotinus* izvršena su i merenja pH vrednosti podloga nakon autoklaviranja, kao i nakon 25 dana gajenja eksplanata u kulturi *in vitro*, jer biljke selektivnim usvajanjem mineralnih soli iz podloge tako e mogu menjati pH vrednost. Podloga je izvva ena iz posuda, zagrejana i nakon toga je izvršeno merenje pH-metrom. Ispitivanje uticaja še era kod *D. serotinus* obavljeno je i na MS i na 1/2MS podlogama jer se tokom prethodnih eksperimenata pokazalo da je procenat regeneracije eksplanata ove vrste ve i na 1/2MS podlogama, dok je razvijenost izdanaka (broj izdanaka, dužina, broj nodusa) bolja na MS podlogama.

Sli no kao kod *D. serotinus* zbog opadanja pH vrednosti podloge nakon autoklaviranja, eksplanti vrste *D. pinifolius* su postavljeni na podloge ija je pH vrednost iznosila 6,3. Sve podloge su sadržale MS ili 1/2MS soli i 0,44 μM BAP i 0,54 μM NAA, kao i u oglecima vezanim za ispitivanje uticaja pH vrednosti na rast i razvoj izdanaka. Kod *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* uslovi za postavljanje ogleada bili su identitni kao kod *D. pinifolius*. Me utim, kako su za razliku od *D. serotinus* i *D. pinifolius* u prethodnim ekperimentima optimalni rezultati kod ovog taksona dobijeni isklju ivo na 1/2MS podlogama, u oglecima su izostavljene podloge sa MS koncentracijom soli.

Eksperimenti sa vrstom *D. serotinus* su obuhvatili 16 tretmana (postavljeno po 960 eksplanata svakog tipa) na podlogama sa MS koncentracijom soli i 12 na podlogama sa 1/2MS koncentracijom soli (postavljeno po 720 eksplanata svakog tipa), sa *D. pinifolius* po 12 tretmana na podlogama sa MS i 1/2MS koncentracijom soli, kod *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* 12 tretmana samo na podlogama sa 1/2MS koncentracijom soli. Kao i u prethodnim eksperimentima, medijum je razliven u staklene posude dimenzija 5 x 5 x 13 cm (po 25 mL⁻¹). Eksperimenti su ponovljeni 3 puta, sa po 20 eksplanata po tretmanu (4 posude sa po 5 eksplanata).

3.5. FAZA OŽILJAVANJA

U ovoj fazi ispitana je mogućnost ožiljavanja dobijenih izdanaka. Ožiljavanje je obavljeno u uslovima *in vitro*, na hranljivim podlogama 1/2MS i MS, sa i bez hormona (NAA u koncentracijama 0,27, 0,54 i 2,68 μM). Sa busenova koji su rasli na medijumu bez hormona, uzete su 4 grupe eksplanata: nodusne reznice, terminalni pupoljci, vršne reznice sa 1 - 3 nodusa (dužine 10 - 35 mm, zavisno od broja nodusa i od dužine internodija) i vršne reznice sa 4 - 6 nodusa (duže od 35 mm). Pri postavljanju nodusne reznice i terminalni pupoljci su uronjeni u medijum do osnove listova, a vršne reznice do osnove prethodnjeg para listova dok je poslednji par uklonjen.

Tokom ovog eksperimenta eksplanti su postavljeni u staklene posude pre nika 8 cm, visine 15 cm, sa po 100 mL hranjive podloge. U svakoj posudi je bilo po 15 eksplanata istog tipa. Na in zatvaranja tegli i postupak autoklaviranja isti su kao i u prethodnim eksperimentima.

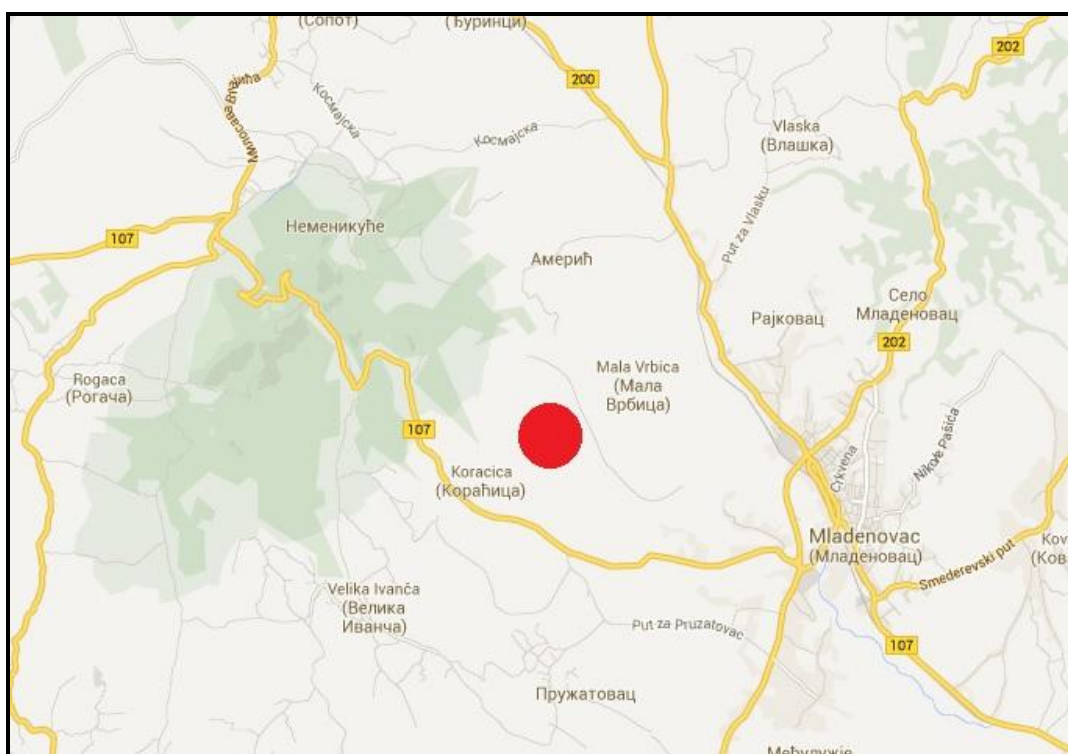
Na svakoj hranljivoj podlozi postavljeno je po 30 eksplanata istog tipa. Ogled je ponovljen tri puta. Merenja i prenos ožiljenih biljaka na prirodne supstrate izvršeni su 15 dana posle postavljanja eksplanata. Uslovi za rast kultura bili su isti kao i u fazi umnožavanja izdanaka.

Pored klasi nih podloga sa dodatkom agara, prema metodologiji koju su koristili Benson et al. (2000), sprovedni su eksperimenti ožiljavanja ispitivanih karanfila na podlogama bez agara. Ožiljavanje je vršeno u istim posudama kao i na podlogama sa agarom, s tim da je u posude stavljeno 0,1 dm³ peska ili perlita, a zatim je dodato 75 mL MS ili 1/2MS rastvora mineralnih soli sa dodatkom NAA (u koncentraciji 0,27, 0,54 ili 2,68 μM), a potom je izvršeno autoklaviranje na na in koji je koriš en i u prethodnim eksperimentima.

Za svaki tip podloge postavljeno je po 30 eksplanata u tri ponavljanja. Uslovi rasta su bili identni kao i prilikom ožiljavanja na podlogama sa agarom, s tim da je nakon deset dana gajenja kulture uklonjena aluminijumska folija, ostavljena samo pamu na gaza i narednih 5 dana jednom dnevno je po potrebi dodavano oko 5 - 10 mL destilovane vode, a nekrotirane bilj ice su uklanjane i evidentirane.

3.6. AKLIMATIZACIJA DOBIJENIH *IN VITRO* BILJAKA

Na aklimatizaciju su stavljene samo biljke ožiljene *in vitro*, na podlogama sa agarom. Biljke su izva ene iz posuda i sa njihovog korena pažljivo je ispirana podloga pod mlazom mlake vode. Potom su biljke posa ene u posude sa tri razli ite mešavine supstrata (zapreminski odnos komponenti): treset i pesak (1 : 1), (4 : 1) i treset, pesak, baštenska zemlja i pregoreli stajnjak (2 : 2 : 2 : 1). Pre upotrebe, supstrat je tretiran 1,5% rastvorom preparata Previcur-N.



Slika 11 Lokalitet na kom su posa ene aklimatizovane biljke *D. serotinus*, *D. pinifolius* i *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*

Prema tipu eksplanta iz kog su se razvile, ožiljene biljke su razvrstane u 4 grupe: poreklom od terminalnih pupoljaka, nodusnih reznica, vršnih reznica sa 1-3 nodusa i

vršnih reznica sa 4-6 nodusa. Na istoj mešavini supstrata je posađeno po 30 biljaka iz iste grupe, u 3 ponavljanja. Tokom aklimatizacije posude sa izdancima stajale su na zaštićenj terasi, severoistočne orijentacije, gde fotoperiod i temperatura nisu regulisani. Kulture su bile zaštićene od direktne sunčeve svetlosti i prekrivene perforiranim, prozirnom plastičnom folijom radi održavanja visoke relativne vlažnosti vazduha.

Temperature su se kretale u opsegu 10 - 30 °C, a aklimatizacija je vršena u periodu maj - jun 2009. godine, kada su vladali uslovi dugog dana. Svakodnevno je vršena kontrola vlažnosti supstrata, a nekrotirani izdanci su redovno uklanjani i evidentirani. Prvih 15 dana vršeno je i provetravanje jednom dnevno u trajanju 5 - 10 minuta, a potom su plastične folije uklonjene. Nastavljeno je sa negom izdanaka još 10 dana, nakon čega je utvrđen broj aklimatizovanih biljaka i izvršeno njihovo presađivanje u podnožju planine Kosmaj, u zemljište obrađeno do dubine od 20 cm i prihranjeno malom količinom pregorelog stajnjaka, radi daljeg praćenja razvoja i cvetanja aklimatizovanih biljaka (slika 11).

3.7. MERENI PARAMETRI I STATISTI KA OBRADA PODATAKA

U svim eksperimentima u fazi multiplikacije, nakon 25 dana gajenja u kulturi *in vitro* izvršena su merenja slede ih parametara: broj izdanaka po eksplantu, broj nodusa, dužina izdanaka, kao i uestalost pojave nekroza, vitrifikacija i drugih nepoželjnih promena ukoliko ih je bilo. Da bi se preciznije definisao uticaj različitih koncentracija fitohormona na razvoj izdanaka, pored dužine izdanaka, u prvom eksperimentu je merena i dužina internodija (sa preciznošću od 1 mm).

Kako dužina izdanaka može biti prilično varijabilna veličina, da bi se izbegla velika heterogenost uzorka, pa samim tim i mogućnost da se javi suviše veliko preklapanje između u homogenih grupa, izdanci su svrstani u tri dužinske kategorije (do 10 mm, od 10 do 20 mm i preko 20 mm), a dužina izdanaka je prikazana kao procentualno udelenje izdanaka u svakoj dužinskoj kategoriji, posebno za svaki tip eksplanata i za svaki tip hranljive podloge kod svih tri taksona.

U fazi ožiljavanja na podlogama sa agarom evidentiran je broj korenova, a merena je dužina najdužeg korena. Dosadašnja iskustva sa mikropropagacijom *D. deltoides* (Marković i Popović, 2012) i preliminarna istraživanja uslova mikropropagacije *D. serotinus* (Marković et al., 2007) i *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* (Marković et al., 2006) pokazala su da se kod karanfila često formira veoma razgranat korenov sistem, sa puno tankih korenova, što otežava merenje njihove dužine (zbog lakog kidanja) pa se time teže mogu razdvojiti primarni od sekundarnih korenova. Zbog toga je kod svake ožiljene *in vitro* biljice merena samo dužina najdužeg korena. U fazi ožiljavanja ispitanih taksona na podlogama bez agara određen je procenat ožiljenih biljaka, a u fazi aklimatizacije određen je procenat aklimatizovanih biljaka.

Dobijeni podaci su statistički obrađeni korišćenjem programa Statgraphics. Značajnost razlika između srednjih vrednosti utvrđena je analizom varijanse (ANOVA), pri čemu je nivo značajnosti $p < 0,05$, kao i metodom najmanje značajne razlike (LSD). Tokom statističke analize, za rezultate prikazane u procentima izvršena je arcsin transformacija podataka čime se povećava normalnost dobijene raspodele

(<http://udel.edu/~mcdonald/statlogistic.html>, 2013) a nakon statističke obrade, dobijene vrednosti su ponovo pretvorene u procenante kako bi se prikazali u tabelama.

Kako su eksperimenti uključivali više faktora (tip eksplanata, koncentracija hormona, koncentracija mineralnih soli u podlozi, itd.), kako bi se detaljnije analizirao uticaj pojedinačnih faktora na merene parametre, korišćene su i druge statističke analize. U fazi multiplikacije, ožiljavanja na podlogama sa agarom i u fazi aklimatizacije, za podatke prikazane u procentima, korišćena je multinominalna logistička regresija (Chan, 2005). Cilj je bio da se utvrdi uticaj različitih faktora na procenat eksplanata iz kojih su regenerisani pravilno razvijeni izdanci u fazi multiplikacije, odnosno uticaj ispitivanih faktora na procenat ožiljavanja i na procenat aklimatizacije, prema metodologiji koju su koristili Fraga et al. (2004). Za utvrđivanje uticaja sastava podloge i tipa eksplanata na merene parametre (broj izdanaka, broj nodusa) u fazi multiplikacije korišćena je tzv. "multifactor ANOVA", analiza varijanse koja uključuje više faktora - višefaktorska analiza.

4. REZULTATI

4.1. USPOSTAVLJANJE STERILNE KULTURE

Sterilna kultura *in vitro* uspešno je uspostavljena. Pet do sedam dana po postavljanju na medijum, semena sve tri vrste su poela da klijaju da bi nakon 3 nedelje isključalo 96% postavljenog semena vrste *D. serotinus*, 92% semena *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* i 88% semena *D. pinifolius*. Procenat kontaminacija je bio nizak, od 1% (*D. serotinus*), 2,5% (*D. pinifolius*) do 5% (*D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*).

4.2. FAZA MULTIPLIKACIJE ISPITANIH TAKSONA: *D. SEROTINUS*, *D. PINIFOLIUS* I *D. GIGANTEIFORMIS* SSP. *KLADOVANUS*.

4.2.1. UTICAJ BALANSA HORMONA NA RAZVOJ IZDANAKA

4.2.1.1. Vitalnost eksplanata

Za svaki karanfil 25 dana nakon postavljanja eksplanata utvrđen je broj nekrotiranih (slika 12), vitrifikovanih (slika 13) i pravilno razvijenih izdanaka (slika 14). Pri tom su u kategoriju nekrotiranih eksplanata, pored hlorotičnih, svrstani i eksplanati koji su ostali potpuno nepromenjeni (slika 15).



Slika 12 Nekrotirani eksplant (terminalni pupoljak) *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*



Slika 13 Vitrifikovani eksplanti *D. serotinus*



Slika 14 Pravilno razvijeni izdanci *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*



Slika 15 Terminalni pupoljak *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* nepromenjen nakon 25 dana gajenja u kulturi *in vitro*

Kalusno tkivo se formiralo kod odre enog broja eksplanata kod *D. pinifolius* (do 30%) i *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* (<10%), a pre nik kalusnog tkiva uglavnom nije prelazio 5 mm (slika 16).



Slika 16 Kalus u osnovi izdanaka *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*

Pojedini izdanci koji su se razvili iz postavljenih eksplanata vrste *D. pinifolius*, na podlogama sa nižim koncentracijama fitohormona (2,22 i 0,44 μM BAP) obrazovali su kratke (3-5 mm) i malobrojne (2 - 6) korenove u osnovi. Izdanci preostale dve vrste karanfila nisu se ožilili.

D. serotinus

Na svim podlogama eksplanti *D. serotinus* su uspešno regenerisali izdanke, a udeo eksplanata sa pravilno razvijenim izdancima se kretao od 55,0% do 83,5% na MS podlogama (tabela 6), dok je na 1/2MS podlogama iznosio od 68,2% do maksimalnih 100% (tabela 7).

Nepovoljan uticaj visokih koncentracija fitohormona (8,88 μM BAP i 5,37 μM NAA) uo lživ je kod sva tri taksona (tabele 6, 12 i 16) na podlozi MS zbog toga su prilikom gajenja eksplanata na 1/2MS podlogama navedene koncentracije BAP i NAA izostavljene (tabele 7, 13 i 17).

Tabela 6 Vitalnost izdanaka *D. serotinus* na MS podlozi u zavisnosti od koncentracije fitohormona

Tip Eksplanata		poreklom iz nodusnih reznica			poreklom iz terminalnih pupoljaka			poreklom iz vršnih reznica		
Hormoni		nekrotirani	pravilno razvijeni	vitriфикovani	nekrotirani	pravilno razvijeni	vitriфикovani	nekrotirani	pravilno razvijeni	vitriфикovani
BAP μM	NAA μM	%	%	%	%	%	%	%	%	%
8,88	5,37	23,3 ^{ab}	55,0 ^{bc}	21,7 ^{ab}	11,7 ^{bc}	70,2 ^{abc}	18,1 ^{ab}	23,7 ^{ab}	68,3 ^{bc}	8,0 ^{ab}
8,88	2,68	24,3 ^{ab}	57,4 ^{abc}	18,3 ^{bc}	15,0 ^{ab}	68,6 ^{bc}	16,4 ^{abc}	32,0 ^a	61,7 ^{bc}	6,3 ^{abc}
4,44	2,68	19,0 ^{abc}	60,3 ^{abc}	20,7 ^{ab}	11,7 ^{bc}	73,3 ^{abc}	15,0 ^{abc}	16,0 ^{bc}	78,3 ^{abc}	5,7 ^{abc}
4,44	0,54	23,4 ^{ab}	57,4 ^{abc}	19,2 ^{abc}	13,3 ^{abc}	70,3 ^{abc}	16,4 ^{abc}	17,0 ^{bc}	76,7 ^{abc}	6,3 ^{abc}
2,22	2,68	19,4 ^{abc}	58,4 ^{abc}	18,2 ^{bc}	10,2 ^{bc}	75,5 ^{ab}	14,3 ^{bc}	14,8 ^{bc}	81,8 ^{ab}	3,4 ^{bc}
2,22	0,54	17,3 ^{bc}	64,5 ^{ab}	18,2 ^{bc}	12,3 ^{bc}	75,5 ^{ab}	12,2 ^{bc}	20,0 ^{abc}	78,3 ^{ab}	1,7 ^{bc}
0,44	0,54	18,0 ^{bc}	65,5 ^{ab}	16,5 ^{bc}	14,5 ^{abc}	78,3 ^{ab}	7,2 ^{cd}	14,8 ^{bc}	83,5^a	1,7 ^{bc}

Napomena: Vrednosti koje su označene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju ($P < 0,05$).

Tabela 7 Vitalnost izdanaka *D. serotinus* na 1/2MS podlozi u zavisnosti od koncentracije fitohormona

Tip Eksplanata		poreklom iz nodusnih reznica			poreklom iz terminalnih pupoljaka			poreklom iz vršnih reznica		
Hormoni		nekrotirani	pravilno razvijeni	vitriфикovani	nekrotirani	pravilno razvijeni	vitriфикovani	nekrotirani	pravilno razvijeni	vitriфикovani
BAP mg·L ⁻¹	NAA mg·L ⁻¹	%	%	%	%	%	%	%	%	%
4,44	2,68	19,4 ^a	68,5 ^{bc}	12,1 ^{ab}	10,2 ^{ab}	83,1 ^{abc}	6,7 ^{ab}	5,1 ^{abc}	93,2 ^{ab}	1,7 ^{ab}
4,44	0,54	19,1 ^a	68,2 ^{bc}	12,7 ^{ab}	11,9 ^{ab}	81,4 ^{bc}	6,7 ^{ab}	6,8 ^{ab}	91,5 ^{ab}	1,7 ^{ab}
2,22	2,68	17,7 ^{ab}	72,1 ^{abc}	10,2 ^{abc}	0,0 ^d	98,3 ^a	1,7 ^{bc}	2,7 ^{abc}	97,3 ^{ab}	0,0 ^b
2,22	0,54	6,8 ^{bc}	86,0 ^{ab}	7,2 ^{bc}	6,7 ^{bc}	86,6 ^{abc}	6,7 ^{ab}	0,0 ^c	100,0^a	0,0 ^b
0,44	0,54	7,7 ^{bc}	87,2 ^{ab}	5,1 ^{bc}	3,4 ^{bcd}	94,9 ^{ab}	1,7 ^{bc}	0,0 ^c	100,0^a	0,0 ^b

Napomena: Vrednosti koje su označene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju ($P < 0,05$)

Da bi se utvrdio uticaj različitih faktora na stepen regeneracije pravilno razvijenih izdanaka, izvršena je multinominalna logistička regresija. Za ispitivanje uticaja koncentracije BAP i NAA na regeneraciju izdanaka, koncentracije navedenih hormona su posmatrane kao kvantitativan faktor (tabela 8). Međutim, da bi se odredile međusobne interakcije između pojedinih faktora, bilo je potrebno da postoje podloge za BAP bez NAA i obrnuto, što nije bio slučaj, jer se u fazi multiplikacije uobičajeno dodaju i citokinini i auksini zbog njihovog sinergističkog dejstva. Zbog toga je, za određivanje interakcija između pojedinih faktora sastava hormona u medijumu posmatran kao kategorijska veličina - kvalitativna varijabla (tabela 9).

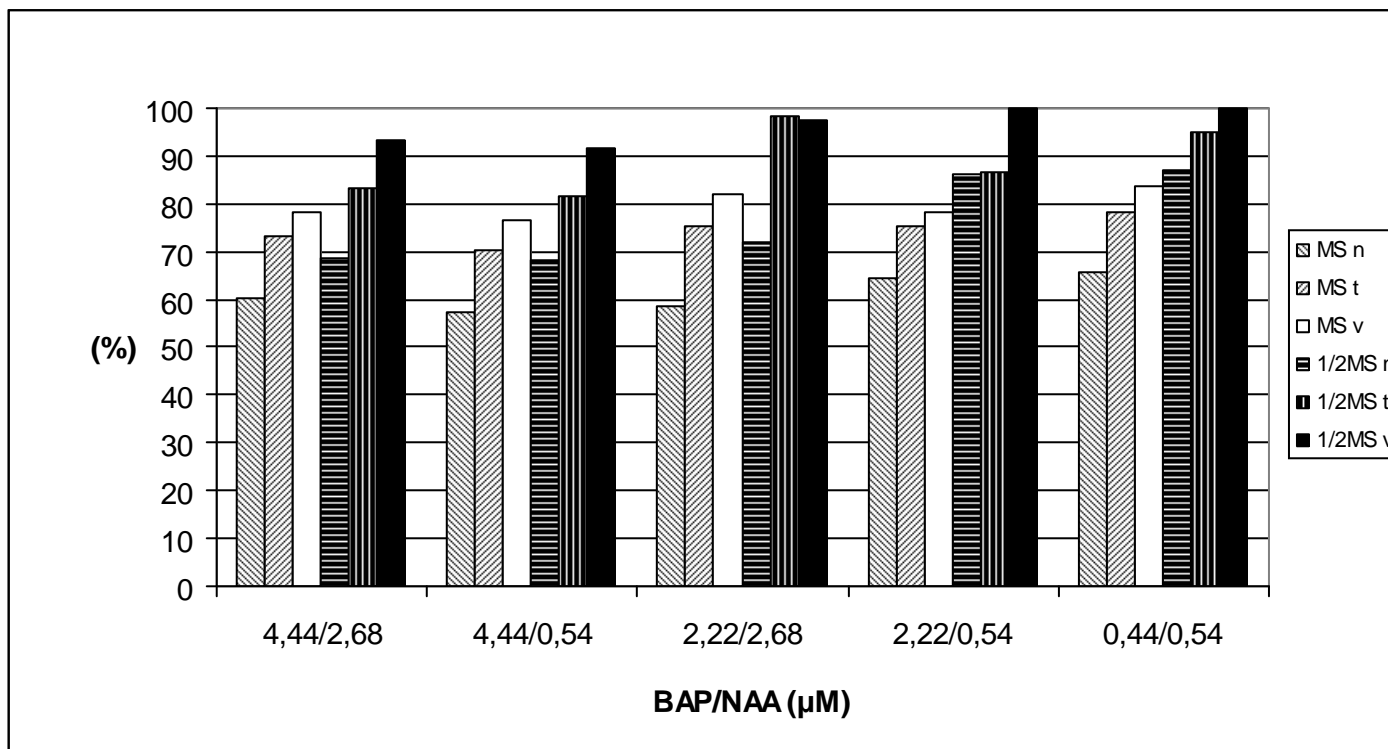
Tabela 8 Značajnost uticaja različitih faktora na regeneraciju pravilno razvijenih izdanaka *D. serotinus*

Faktor	Hi- kvadrat	P-vrednost
BAP	16,3454	<u>0,0001</u>
NAA	0,0289818	0,8648
Tip eksplanta	70,2183	<u>0,0000</u>
Koncentracija MS soli	73,8832	<u>0,0000</u>
Hormoni (BAP+NAA)*	13,9449	<u>0,0075</u>

*kvalitativna varijabla

Tabela 9 Interakcija uticaja različitih faktora na regeneraciju pravilno razvijenih izdanaka *D. serotinus*

Faktor	Hi- kvadrat	P-vrednost
MS soli × tip eksplanta	12,3813	<u>0,0020</u>
MS soli × hormoni	10,7462	<u>0,0296</u>
Tip eksplanta × hormoni	5,56816	0,6955



MS n; MS t; MS v - izdanci poreklom iz nodusnih reznica, terminalnih pupoljaka i vršnih reznica odgajeni na podlogama MS;

1/2MS n; 1/2MS t; 1/2MS v - izdanci poreklom iz nodusnih reznica, terminalnih pupoljaka i vršnih reznica odgajeni na podlogama 1/2MS;

Grafik 1 Procenat pravilno razvijenih izdanaka *D. serotinus* na podlogama MS i 1/2MS

Prisutan je značajan uticaj koncentracija BAP na udeo pravilno razvijenih izdanaka (grafik 1), jer se sa smanjenjem koncentracije BAP povećava broj eksplanata koji su formirali pravilno razvijene izdanke. Takvih razlika nema kada je u pitanju promena koncentracije NAA, jer pri istoj koncentraciji BAP, kod istog tipa eksplanata nema značajnih razlika (tabele 6 i 7), što je potvrđeno i sprovedenom statističkom analizom (tabela 8).

Takođe, nakon izvršene logističke regresije (tabela 8), pokazalo se da su razlike u stepenu regeneracije pravilno razvijenih izdanaka koje se uočavaju između različitih tipova eksplanata i na podlogama sa različitom koncentracijom soli: MS (nodusne reznice 55,0 - 65,5%; terminalni pupoljci 70,2 - 78,3%; vršne reznice 68,3 - 83,5%) ili 1/2 MS (nodusne reznice 68,5 - 87,2%; terminalni pupoljci 83,1 - 94,9%; vršne reznice 93,2 - 100,0%) statistički zaista značajne. Štaviše, uticaj koncentracija MS soli, tipa eksplanata i određenog balansa BAP i NAA je kompleksan i prisutna je interakcija između koncentracije mineralnih soli i druga dva faktora (tabela 9).

Pojava vitifikacije je bila zabeležena jedino kod *D. serotinus*, i to u relativno visokom procentu (tabele 6 i 7). Može se uočiti da na pojavu vitifikacije utiče tip eksplanata, pri čemu se znatno viši procenat vitifikovanih izdanaka regenerisao iz nodusnih reznica (16,5-21,7% na MS podlozi), nešto niži iz terminalnih pupoljaka, a najniži iz vršnih reznica (1,7-8,0% na MS podlozi) (tabela 6). Pored uticaja tipa eksplanata, značajan uticaj ima i koncentracija MS soli, gde je na MS podlogama bilo gotovo dvostruko više vitifikovanih izdanaka nego na podlogama sa 1/2MS koncentracijom soli, pri istoj koncentraciji fitohormona, posmatrajući isti tip eksplanata (tabele 6 i 7).

Uprkos preklapanju između u homogenih grupa uopšteno se može konstatovati da se sa povećanjem koncentracija fitohormona povećava i broj vitifikovanih izdanaka, ali su same razlike u procentu vitifikacije slabo izražene. Uticaj balansa citokinina i auksina nije uočljiv, odnosno nema značajnih razlika u broju vitifikovanih eksplanata na podlozi sa četiri puta više BAP od NAA (2,22 μ M BAP i 0,54 μ M NAA) i na podlozi sa približno jednakom koncentracijom navedenih fitohormona (2,22 μ M BAP i 2,68 μ M NAA) (tabele 6 i 7). Multinomialnom logističkom regresijom je utvrđeno da koncentracija BAP značajno utiče na pojavu vitifikacije, dok koncentracija NAA nema značajan uticaj (tabela 10). Uticaj koncentracije MS soli u podlozi, kao i uticaj tipa

eksplanta na udeo vitrifikovanih eksplanata je statisti ki zna ajan, ali ne postoji interakcija izme u pomenutih faktora kod *D. serotinus* (tabele 10 i 11).

Tabela 10 Zna ajnost uticaja razli itih faktora na vitrifikaciju izdanaka *D. serotinus*

Faktor	Hi- kvadrat	P-vrednost
BAP	7,98634	<u>0,0047</u>
NAA	0,0275395	0,8682
Tip eksplanta	63,261	<u>0,0000</u>
Koncentracija MS soli	29,214	<u>0,0000</u>
Hormoni (BAP+NAA)*	6,90394	<u>0,1411</u>

*kvalitativna varijabla

Tabela 11 Interakcija uticaja razli itih faktora na vitrifikaciju izdanaka *D. serotinus*

Faktor	Hi- kvadrat	P-vrednost
MS soli × tip eksplanta	4,23612	0,8352
MS soli × hormoni	1,98709	0,7381
Tip eksplanta × hormoni	2,51512	0,2843

D. pinifolius

Vitalnost izdanaka *D. pinifolius* je bila visoka, prelaze i 88% na svim podlogama (tabele 12 i 13). Uticaj koncentracija fitohormona je uo lživ i na MS i na 1/2 MS podlogama kod sva tri tipa eksplanata, a najpovoljnijim su se pokazale podloge sa najnižom koncentracijom fitohormona (0,44 μ M BAP i 0,54 μ M NAA) gde su se iz svih postavljenih eksplanata regenerisali pravilno razvijeni izdanci (grafik 2).

Tabela 12 Vitalnost izdanaka *D. pinifolius* na MS podlozi u zavisnosti od koncentracije fitohormona

Tip Eksplanata		poreklom iz nodusnih reznica			poreklom iz terminalnih pupoljaka			poreklom iz vršnih reznica		
Hormoni		nekrotirani	pravilno razvijeni	vitriфикovani	nekrotirani	pravilno razvijeni	vitriфикovani	nekrotirani	pravilno razvijeni	vitriфикovani
BAP μM	NAA μM	%	%	%	%	%	%	%	%	%
8,88	5,37	11,7 ^c	88,3 ^c	0,0 ^a	8,3 ^c	91,7 ^b	0,0 ^a	6,7 ^{bc}	93,3 ^{abc}	0,0 ^a
8,88	2,68	11,7 ^c	88,3 ^c	0,0 ^a	8,3 ^c	91,7 ^b	0,0 ^a	8,3 ^c	91,7 ^{bc}	0,0 ^a
4,44	2,68	6,7 ^b	93,3 ^{bc}	0,0 ^a	5,0 ^{bc}	95,0 ^{ab}	0,0 ^a	5,0 ^b	95,0 ^{ab}	0,0 ^a
4,44	0,54	3,3 ^{ab}	96,7 ^{ab}	0,0 ^a	3,3 ^{ab}	96,7 ^{ab}	0,0 ^a	5,0 ^b	95,0 ^{ab}	0,0 ^a
2,22	2,68	1,7 ^{ab}	98,3 ^{ab}	0,0 ^a	3,3 ^a	96,7 ^{ab}	0,0 ^a	3,3 ^{ab}	96,7 ^{ab}	0,0 ^a
2,22	0,54	3,3 ^{ab}	96,7 ^{ab}	0,0 ^a	0,0 ^a	100,0^a	0,0 ^a	0,0 ^a	100,0^a	0,0 ^a
0,44	0,54	0,0 ^a	100,0^a	0,0 ^a	0,0 ^a	100,0^a	0,0 ^a	0,0 ^a	100,0^a	0,0 ^a

Napomena: Vrednosti koje su označene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju ($P < 0,05$)

Tabela 13 Vitalnost izdanaka *D. pinifolius* na 1/2MS podlozi u zavisnosti od koncentracije fitohormona

Tip Eksplanata		poreklom iz nodusnih reznica			poreklom iz terminalnih pupoljaka			poreklom iz vršnih reznica		
Hormoni		nekrotirani	pravilno razvijeni	vitriфикovani	nekrotirani	pravilno razvijeni	vitriфикovani	nekrotirani	pravilno razvijeni	vitriфикovani
BAP μM	NAA μM	%	%	%	%	%	%	%	%	%
4,44	2,68	8,3 ^{bc}	91,7 ^b	0,0 ^a	5,0 ^b	95,0 ^{ab}	0,0 ^a	6,7 ^b	93,3 ^b	0,0 ^a
4,44	0,54	5,0 ^{abc}	95,0 ^{ab}	0,0 ^a	6,7 ^{bc}	93,3 ^{ab}	0,0 ^a	5,0 ^b	95,0 ^{ab}	0,0 ^a
2,22	2,68	5,0 ^{abc}	95,0 ^{a^b}	0,0 ^a	5,0 ^b	95,0 ^{ab}	0,0 ^a	6,7 ^b	93,3 ^b	0,0 ^a
2,22	0,54	3,3 ^{ab}	96,7 ^{ab}	0,0 ^a	0,0 ^a	100,0^a	0,0 ^a	0,0 ^a	100,0^a	0,0 ^a
0,44	0,54	0,0 ^a	100,0^a	0,0 ^a	0,0 ^a	100,0^a	0,0 ^a	0,0 ^a	100,0^a	0,0 ^a

Napomena: Vrednosti koje su označene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju ($P < 0,05$)

Za razliku od *D. serotinus*, kod *D. pinifolius* koncentracija MS soli u podlozi (MS ili 1/2MS) tip eksplanata nisu značajno uticali na regeneraciju pravilno razvijenih izdanaka (tabela 14). Suviše visoke koncentracije BAP su nepovoljno uticale na regeneraciju svih tipova eksplanata (grafik 2), dok je uticaj promene koncentracije NAA slabije izražen, ali ipak statistički značajan, što nije bio slučaj sa *D. serotinus* (tabela 14). Takođe, kod *D. pinifolius* ne postoji interakcija između različitih faktora (koncentracije MS soli, tipa eksplanata i balansa hormona u medijumu) (tabela 15). Kod *D. pinifolius* vitifikacija nije bila prisutna (tabele 12 i 13).

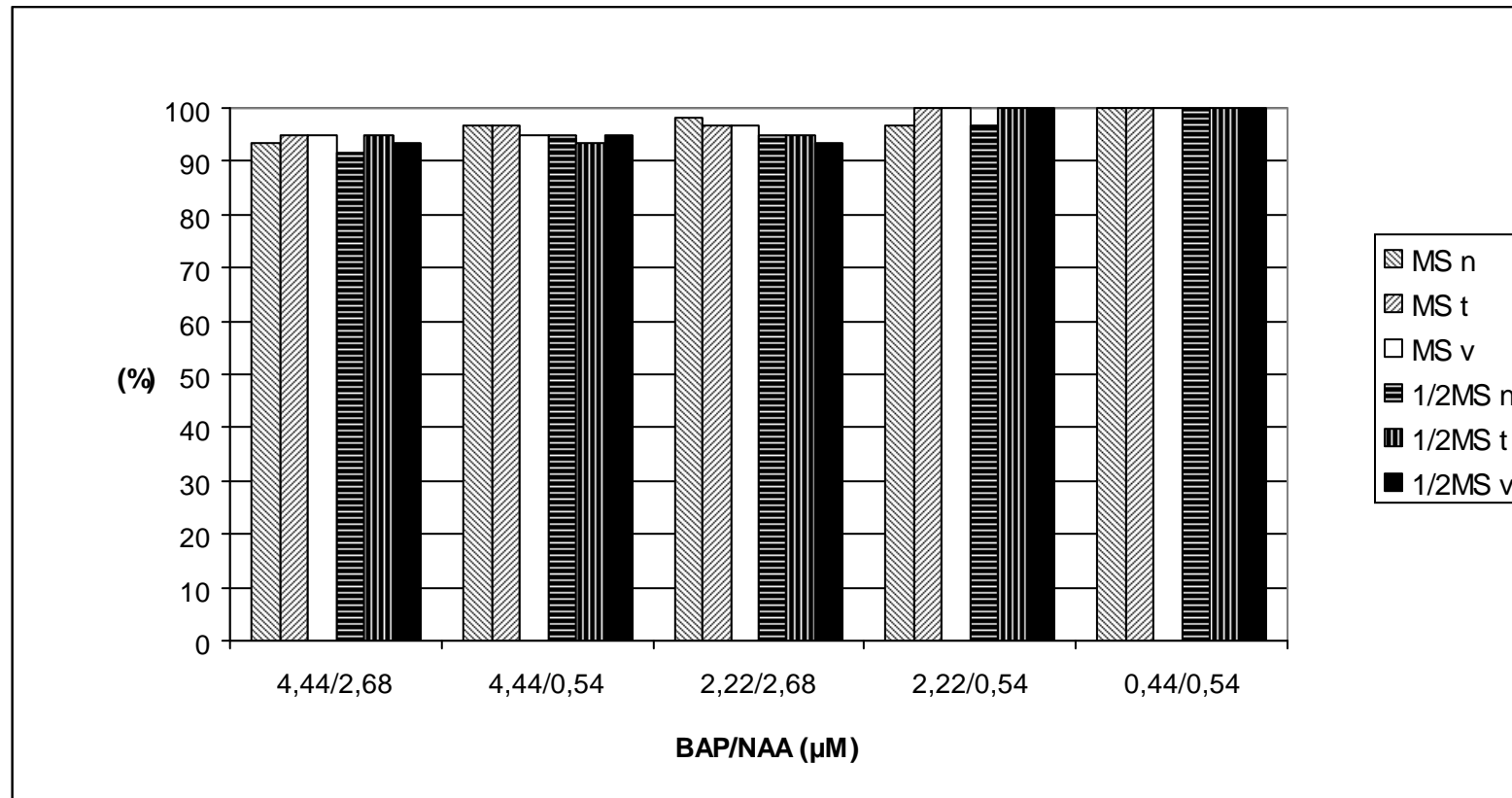
Tabela 14 Značajnost uticaja različitih faktora na regeneraciju pravilno razvijenih izdanaka *D. pinifolius*

Faktor	Hi- kvadrat	P-vrednost
BAP	18,9874	<u>0,0000</u>
NAA	6,66531	<u>0,0098</u>
Koncentracija MS soli	1,85581	0,1731
Tip eksplanata	0,681036	0,7114
Hormoni (BAP+NAA)*	15,207	<u>0,0043</u>

*kvalitativna varijabla

Tabela 15 Interakcija uticaja različitih faktora na regeneraciju pravilno razvijenih izdanaka *D. pinifolius*

Faktor	Hi- kvadrat	P-vrednost
Tip eksplanata × hormoni	9,39457	0,3101
MS soli × hormoni	0,792547	0,9394
MS soli × tip eksplanata	0,0792865	0,9611



MS n; MS t; MS v - izdanci poreklom iz nodusnih reznica, terminalnih pupoljaka i vršnih reznica odgajeni na podlogama MS;

1/2MS n; 1/2MS t; 1/2MS v - izdanci poreklom iz nodusnih reznica, terminalnih pupoljaka i vršnih reznica odgajeni na podlogama 1/2MS;

Grafik 2 Procenat pravilno razvijenih izdanaka *D. pinifolius* na podlogama MS i 1/2MS

D. giganteiformis* ssp. *kladovanus

Regeneracija pravilno razvijenih izdanaka je bila nešto slabija u odnosu na rezultate dobijene kod *D. pinifolius*, ali ipak viša u odnosu na *D. serotinus*. Najniži procenat regeneracije imale su nodusne reznice na MS podlozi sa 8,88 μM BAP i 2,68 μM NAA (81,7%), dok je regeneracija terminalnih pupoljaka i vršnih reznica na MS i 1/2MS podlogama sa niskom koncentracijom BAP (0,44 μM) i NAA (0,54 μM) bila maksimalna (100%) (tabele 16 i 17).

Kod *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*, kao i kod *D. pinifolius*, vitrifikacija nije zabeležena ni na jednoj hranljivoj podlozi, bez obzira na koncentraciju soli, hormona ili tip eksplanata.

Uticaj koncentracije BAP i NAA na procenat regeneracije izdanaka kod *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* bio je prisutan kao i kod *D. serotinus* i *D. pinifolius*, tj. najpovoljnije su bile podloge sa nižom koncentracijom fitohormona (grafik 3), ali kao i kod *D. serotinus*, statistički značajan uticaj je imala samo koncentracija BAP (tabela 18).

Razlike u stepenu regeneracije se javljaju u zavisnosti od tipa eksplanata, pri čemu su najslabiji rezultati dobijeni kod nodusnih reznica, gde maksimalan broj eksplanata koji su se pravilno razvijali nije prešao 98,3% (na MS podlozi sa 0,44 μM BAP i 0,54 μM NAA) (tabele 16 i 17). Sprovedena logistička regresija je pokazala da tip eksplanata značajno utiče na regeneraciju kod *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*, ali i da koncentracija soli u podlozi (MS ili 1/2MS) uopšte nema značajan uticaj kao što je to bio slučaj kod *D. serotinus* (tabela 18). Takođe, ne postoji ni interakcija između uticaja koncentracije soli u medijumu, balansa hormona i tipa eksplanata (tabela 19).

Tabela 16 Vitalnost izdanaka *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* na MS podlozi u zavisnosti od koncentracije fitohormona

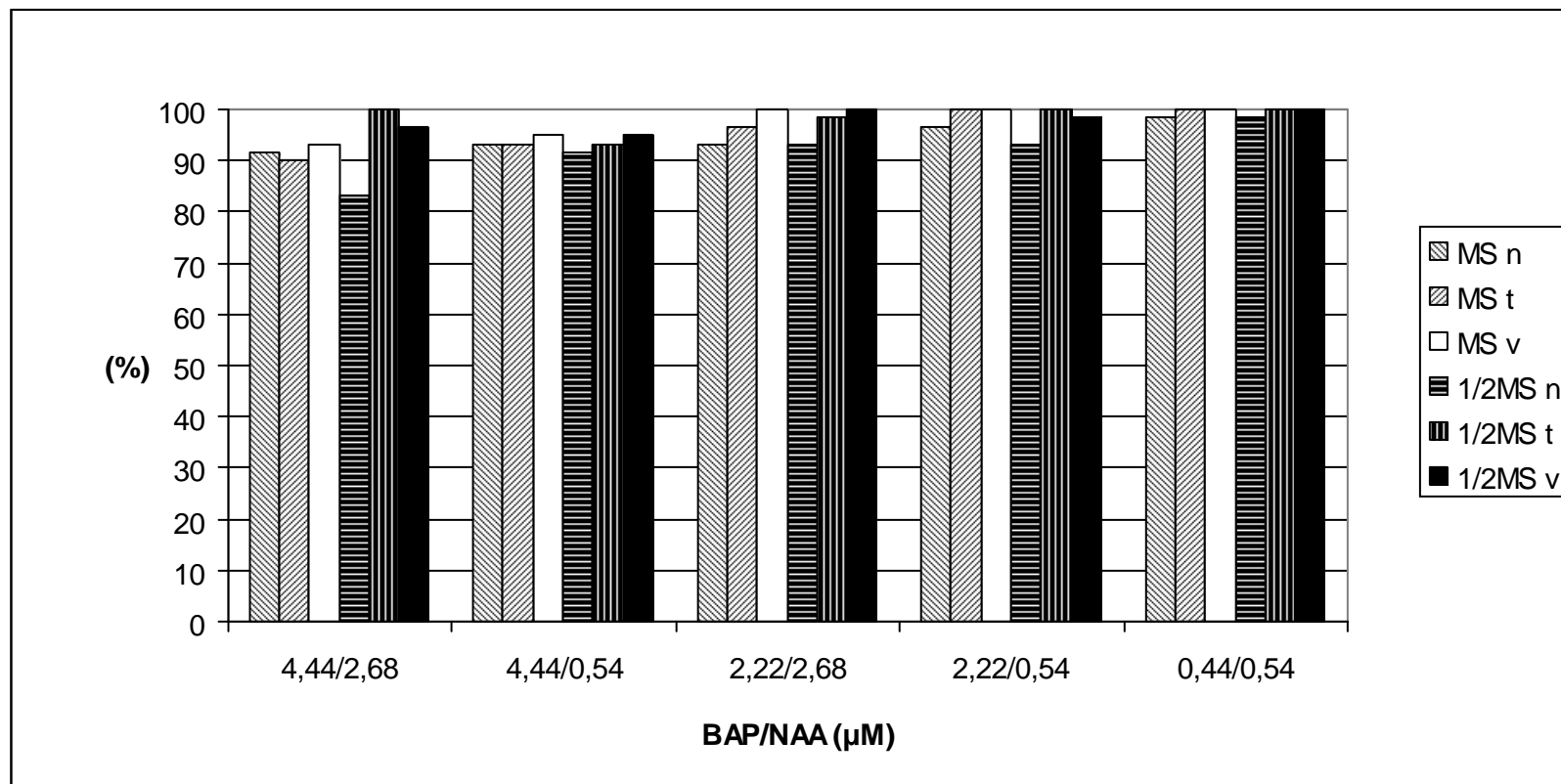
Tip Eksplanata		poreklom iz nodusnih reznica			poreklom iz terminalnih pupoljaka			poreklom iz vršnih reznica		
Hormoni		nekrotirani	pravilno razvijeni	vitriфикovani	nekrotirani	pravilno razvijeni	vitriфикovani	nekrotirani	pravilno razvijeni	vitriфикovani
BAP μM	NAA μM	%	%	%	%	%	%	%	%	%
8,88	5,37	16,7 ^c	83,3 ^b	0,0 ^a	13,4 ^c	86,6 ^{bc}	0,0 ^a	11,7 ^b	88,3 ^{bc}	0,0 ^a
8,88	2,68	18,3 ^c	81,7 ^b	0,0 ^a	15,0 ^d	85,0 ^c	0,0 ^a	13,4 ^b	86,6 ^c	0,0 ^a
4,44	2,68	8,3 ^b	91,7 ^{ab}	0,0 ^a	10,0 ^a	90,0 ^{abc}	0,0 ^a	6,7 ^{ab}	93,3 ^b	0,0 ^a
4,44	0,54	6,7 ^{ab}	93,3 ^{ab}	0,0 ^a	6,7 ^b	93,3 ^{ab}	0,0 ^a	5,0 ^b	95,0 ^b	0,0 ^a
2,22	2,68	6,7 ^{ab}	93,3 ^{ab}	0,0 ^a	3,3 ^{ab}	96,7 ^{ab}	0,0 ^a	0,0 ^a	100,0^a	0,0 ^a
2,22	0,54	3,3 ^{ab}	96,7 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	100,0^a	0,0 ^a	0,0 ^a	100,0^a	0,0 ^a
0,44	0,54	1,7 ^a	98,3 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	100,0^a	0,0 ^a	0,0 ^a	100,0^a	0,0 ^a

Napomena: Vrednosti koje su označene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju ($P < 0,05$)

Tabela 17 Vitalnost izdanaka *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* na 1/2MS podlozi u zavisnosti od koncentracije fitohormona

Tip Eksplanata		poreklom iz nodusnih reznica			poreklom iz terminalnih pupoljaka			poreklom iz vršnih reznica		
Hormoni		nekrotirani	pravilno razvijeni	vitriфикovani	nekrotirani	pravilno razvijeni	vitriфикovani	nekrotirani	pravilno razvijeni	vitriфикovani
BAP μM	NAA μM	%	%	%	%	%	%	%	%	%
4,44	2,68	16,7 ^c	83,3 ^{bc}	0,0 ^a	0,0 ^a	100,0 ^a	0,0 ^a	3,3 ^{ab}	96,7 ^{ab}	0,0 ^a
4,44	0,54	8,3 ^b	91,7 ^a	0,0 ^a	6,7 ^b	93,3 ^{ab}	0,0 ^a	5,0 ^b	95,0 ^{ab}	0,0 ^a
2,22	2,68	6,7 ^{ab}	93,3 ^{ab}	0,0 ^a	1,7 ^{ab}	98,3 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	100,0^a	0,0 ^a
2,22	0,54	6,7 ^{ab}	93,3 ^{ab}	0,0 ^a	0,0 ^a	100,0^a	0,0 ^a	1,7 ^{ab}	98,3 ^{ab}	0,0 ^a
0,44	0,54	1,7 ^a	98,3 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	100,0^a	0,0 ^a	0,0 ^a	100,0^a	0,0 ^a

Napomena: Vrednosti koje su označene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju ($P < 0,05$)



MS n; MS t; MS v - izdanci poreklom iz nodusnih reznica, terminalnih pupoljaka i vršnih reznica odgajeni na podlogama MS;

1/2MS n; 1/2MS t; 1/2MS v - izdanci poreklom iz nodusnih reznica, terminalnih pupoljaka i vršnih reznica odgajeni na podlogama 1/2MS;

Grafik 3 Procenat pravilno razvijenih izdanaka *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* na podlogama MS i 1/2MS

Tabela 18 Značajnost uticaja različitih faktora na regeneraciju pravilno razvijenih izdanaka *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*

Faktor	Hi- kvadrat	P-vrednost
BAP	30,0285	<u>0,0000</u>
NAA	1,31416	0,2516
Koncentracija MS soli	0,0000925894	0,9923
Tip eksplanata	18,2748	<u>0,0001</u>
Hormoni (BAP+NAA)*	15,6017	<u>0,0036</u>

*kvalitativna varijabla

Tabela 19 Interakcija uticaja različitih faktora na regeneraciju pravilno razvijenih izdanaka *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*

Faktor	Hi- kvadrat	P-vrednost
Tip eksplanata × hormoni	14,218	0,0763
MS soli × hormoni	1,6694	0,7963
MS soli × tip eksplanata	4,67664	0,0965

4.2.1.2. Broj izdanaka

Na svim podlogama određen je ukupan broj izdanaka po eksplantu, a prosečan broj izdanaka koji se razvio iz jednog postavljenog eksplanata prikazan je u tabelama 20, 22, 25 posebno za svaki tip eksplanata i za svaki tip hranljive podloge.

D. serotinus

Uprkos preklapanju izme u homogenih grupa, prisutne su razlike u prose nom broju izdanaka po eksplantu na podlogama razli itog sastava (tabela 20). Me utim, posmatraju i razlike kod istog tipa eksplanata, na istoj koncentraciji MS soli (podloge MS ili 1/2MS) ne može se uo iti pravilna veza izme u promene broja izdanaka i promene koncentracije BAP i NAA u podlozi (tabela 20). Uopšteno, možemo konstatovati da je na MS podlozi sa 2,22 μM BAP i 2,68 μM NAA prose an broj izdanaka bio najviši kod sva tri tipa eksplanata. Izuzetak predstavljaju nodusne reznice kod kojih je na MS podlozi sa 8,88 μM BAP i 5,37 μM NAA formirano nešto više (8,8) izdanaka po eksplantu, nego na podlozi MS podlozi sa 2,22 μM BAP i 2,68 μM NAA (8,3), ali treba imati u vidu da obe vrednosti pripadaju istoj homogenoj grupi (tabela 20).

Tabela 20 Prose an broj izdanaka *D. serotinus* koji se razvio iz jednog eksplanata

Hormoni		nodusne reznice		terminalni pupoljci		vršne reznice	
BAP μM	NAA μM	MS	1/2MS	MS	1/2MS	MS	1/2MS
8,88	5,37	8,8 ^a	-	8,7 ^{ab}	-	6,2 ^{bc}	-
8,88	2,68	3,8 ^{bc}	-	7,9 ^{ab}	-	8,0 ^{ab}	-
4,44	2,68	5,2 ^{ab}	3,6 ^{abc}	7,4 ^{ab}	5,2 ^{ab}	9,2 ^{ab}	6,5 ^{ab}
4,44	0,54	6,8 ^{ab}	4,7 ^{ab}	7,0 ^{ab}	7,1 ^a	8,6 ^{ab}	6,2 ^{ab}
2,22	2,68	8,3 ^a	5,1 ^{ab}	9,1 ^a	6,2 ^{ab}	10,1^a	7,2 ^{ab}
2,22	0,54	4,2 ^{abc}	3,7 ^{abc}	3,6 ^{bc}	5,5 ^{ab}	8,8 ^{ab}	5,7 ^{ab}
0,44	0,54	4,5 ^{abc}	3,6 ^{abc}	5,8 ^{bc}	5,1 ^{ab}	9,1 ^{ab}	9,5 ^a

Napomena: Vrednosti koje su ozna ene istim slovom se statisti ki zna ajno ne razlikuju ($P < 0,05$)

Kod sva tri tipa eksplanata prose an broj izdanaka je na skoro svim 1/2MS podlogama bio niži nego na MS podlogama sa istim balansom hormona (tabela 20). Značajnost uticaja koncentracije MS soli u podlozi potvrdila je i višefaktorska analiza varijanse (tabela 21) koja je potvrdila da osim pored koncentracije MS soli značajan uticaj ima i balans hormona dodatih u podlogu.

Takođe, iako je prisutna interakcija između tipa eksplanta i koncentracije MS soli, sam tip eksplanta ne utiče značajno na broj izdanaka (tabela 21). Ta činjenica ide u prilog pretpostavci da na razvoj eksplanata u velikoj mjeri utiče balans endogenih hormona. Naime, ako se ima u vidu da se od jedne vršne reznice kakve su korišćene u ovom eksperimentu može dobiti jedna nodusna reznica i jedan terminalni pupoljak, onda se može očekivati i da prose an broj izdanaka koji se razvije iz vršnih reznica bude zbir prosečnog broja izdanaka koji su se razvili iz nodusnih reznica i terminalnih pupoljaka na medijumu istog sastava. Međutim, takav odnos broja izdanaka postoji samo u dva slučaja: na MS podlogama sa 2,22 ili 0,44 μM BAP i 0,54 μM NAA (tabela 20).

Tabela 21 Analiza varijanse za uticaj sastava medijuma i tipa eksplanta na prose an broj izdanaka *D. serotinus*

	Suma kvadrata	F-odnos	P-vrednost
OSNOVNI FAKTORI			
A: hormoni	18,6047	5,74	<u>0,0177</u>
B: tip eksplanta	5,694	3,51	0,0804
C: koncentracija MS soli	25,0253	30,87	<u>0,0005</u>
INTERAKCIJE FAKTORA			
AB	9,65933	1,49	0,2931
AC	8,798	2,71	0,1071
BC	38,4607	23,72	<u>0,0004</u>

D. pinifolius

Prose an broj izdanaka *D. pinifolius* se razlikovao zavisno od sastava podloge i tipa eksplanta i kretao se od 2,7 (nodusne reznice na 1/2MS podlozi sa 4,44 μM BAP i 2,68 μM NAA) do 15,4 (vršne reznice na 1/2MS podlozi sa 2,22 μM BAP i 0,54 μM NAA) (tabela 22).

Pravilnost uticaja promene koncentracije BAP ili NAA u hranljivim podlogama na broj izdanaka se ne može uo iti, razlike su uglavnom male i postoji preklapanje izme u homogenih grupa. Najve i prose an broj izdanaka se formirao na MS podlogama, kod nodusnih reznica (6,9) na podlozi sa 2,22 μM BAP i 2,68 μM NAA, a kod terminalnih pupoljaka (7,2) i vršnih reznica (15,4) na podlozi sa 2,22 μM BAP i 0,54 μM NAA.

Tabela 22 Prose an broj izdanaka *D. pinifolius* koji se razvio iz jednog eksplanta

Hormoni		nodusne reznice		terminalni pupoljci		vršne reznice	
BAP μM	NAA μM	MS	1/2MS	MS	1/2MS	MS	1/2MS
8,88	5,37	4,3 ^{bc}	-	3,3 ^{bc}	-	5,8 ^{cd}	-
8,88	2,68	3,7 ^{bc}	-	3,1 ^{bc}	-	6,1 ^{cd}	-
4,44	2,68	6,5 ^a	2,7 ^{bc}	6,5 ^{ab}	5,3 ^{ab}	9,1 ^{abc}	7,1 ^{abc}
4,44	0,54	5,9 ^{ab}	2,5 ^{bc}	6,3 ^{ab}	4,8 ^{bc}	8,3 ^{bc}	6,7 ^{bc}
2,22	2,68	6,9 ^a	3,0 ^{bc}	6,5 ^{ab}	5,8 ^{ab}	12,1 ^{ab}	9,4 ^{ab}
2,22	0,54	6,0 ^{ab}	5,1 ^a	7,2 ^a	5,9 ^{ab}	15,4^a	10,3 ^a
0,44	0,54	4,6 ^{abc}	4,1 ^{ab}	4,7 ^{bc}	6,9 ^a	7,0 ^{bcd}	6,0 ^{bc}

Napomena: Vrednosti koje su ozna ene istim slovom se statisti ki zna ajno ne razlikuju ($P < 0,05$)

Razlike u broju izdanaka formiranih iz nodusnih reznica ili terminalnih pupoljaka sa jedne strane i broja izdanaka formiranih iz vršnih reznica su uo ljuvije i

eš e se javljaju (tabela 22), što nije bio slu aj kod *D. serotinus*. Samim tim, što je bilo o ekivano, višefaktorska analiza varijanse (tabela 23) je pokazala da i balans hormona, i koncentracija MS soli, i tip eksplanta zna ajno uti u na prose an broj izdanaka po eksplantu. Kada je u pitanju tip eksplanta, u tabeli 22 mogu se uo iti razlike u prose nom broju izdanaka, za koje je analiza višestrukih opsega utvrdila du su statisti ki zna ajne jer postoje tri homogene grupe za sva tri tipa eksplanata- nodusnih i vršnih reznica i terminalnih pupoljaka (tabela 24).

Tabela 23 Analiza varijanse za uticaj sastava medijuma i tipa eksplanta na prose an broj izdanaka *D. pinifolius*

	Suma kvadrata	F-odnos	P-vrednost
OSNOVNI FAKTORI			
A: hormoni	32,3813	8,91	<u>0,0048</u>
B: tip eksplanta	103,194	56,81	<u>0,0000</u>
C: koncentracija MS soli	25,0253	27,55	<u>0,0008</u>
INTERAKCIJE FAKTORA			
AB	25,2927	3,48	<u>0,0484</u>
AC	8,028	2,21	0,1579
BC	6,60067	3,63	0,0754

Tabela 24 Uticaj tipa eksplanta na broj izdanaka *D. pinifolius* - metod najmanje zna ajne razlike

Tip eksplanta	Homogene grupe
nodusne reznice	X
terminalni pupoljci	X
vršne reznice	X

D. giganteiformis ssp. kladovanus

Prose an broj izdanaka *D. giganteiformis ssp. kladovanus* je bio niži u odnosu na *D. serotinus* i *D. pinifolius* i kretao se od 1,7 (vršne reznice na MS podlozi sa 8,88 μM BAP i 5,37 μM NAA, terminalni pupoljci na 1/2MS podlozi sa 0,44 μM BAP i 0,54 μM NAA) do 4,6 (terminalni pupoljci na MS podlozi sa 2,22 μM BAP i 2,68 μM NAA). Razlike koje se javljaju kod istog tipa eksplanta, na podlozi sa istom koncentracijom MS soli i razli itim sadržajem hormona, su uglavnom male, sa preklapanjem izme u homogenih grupa (tabela 25), pa stoga ni ne postoji statisti ki zna ajan uticaj balansa BAP i NAA na broj izdanaka koji je formiran.

Tabela 25 Prose an broj izdanaka *D. giganteiformis ssp. kladovanus* koji se razvio iz jednog eksplanta

Hormoni		nodusne reznice		terminalni pupoljci		vršne reznice	
BAP μM	NAA μM	MS	1/2MS	MS	1/2MS	MS	1/2MS
8,88	5,37	2,1 ^{ab}	-	2,5 ^{abc}	-	1,7 ^{bc}	-
8,88	2,68	2,1 ^{ab}	-	3,1 ^{ab}	-	2,0 ^{bc}	-
4,44	2,68	3,1 ^{ab}	3,3 ^{ab}	3,2 ^{ab}	3,8 ^{ab}	4,1 ^a	3,8 ^{ab}
4,44	0,54	3,3 ^{ab}	3,9 ^{ab}	3,4 ^{ab}	2,6 ^{ab}	3,6 ^{ab}	3,8 ^{ab}
2,22	2,68	2,9 ^{ab}	4,4 ^a	4,6^a	2,8 ^{ab}	4,0 ^a	3,9 ^{ab}
2,22	0,54	3,7 ^a	4,5 ^a	4,1 ^{ab}	4,2 ^a	3,7 ^{ab}	4,1 ^{ab}
0,44	0,54	3,6 ^a	2,7 ^{ab}	2,8 ^{bc}	1,7 ^{abc}	3,7 ^{ab}	3,5 ^{bc}

Napomena: Vrednosti koje su ozna ene istim slovom se statisti ki zna ajno ne razlikuju ($P < 0,05$)

Ako se porede razli iti tipovi eksplanata na podlogama istog sastava, može se primetiti da je prose an broj izdanaka varijabilan, gde je nemogu e uo iti bilo kakvu

pravilnost (tabela 25). Analiza varijanse je potvrdila da tip eksplanta značajno ne utiče na broj izdanaka koji se formiraju (tabela 26).

Takođe, za razliku od prethodno istraživanih karanfila, ni koncentracija MS soli u podlozi nema značajnog uticaja na broj izdanaka po eksplantu kod *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* (tabela 26).

Tabela 26 Analiza varijanse za uticaj sastava medijuma i tipa eksplanta na prosečan broj izdanaka *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*

	Suma kvadrata	F-odnos	P-vrednost
OSNOVNI FAKTORI			
A: hormoni	3,67533	3,02	0,0856
B: tip eksplanta	1,256	2,07	0,1890
C: koncentracija MS soli	0,0213333	0,07	0,7977
INTERAKCIJE FAKTORA			
AB	1,95067	0,80	0,6184
AC	1,13533	0,93	0,4908
BC	1,36267	2,24	0,1686

4.2.1.3. Dužina izdanaka

D. serotinus

Dužina izdanaka se razlikovala zavisno od tipa eksplanta, koncentracije MS soli i koncentracije hormona dodatih u podlogu. Iz nodusnih reznica na MS podlogama sa višim koncentracijama BAP (2,22 µM, 4,44 µM i 8,88 µM) udeo izdanaka kraćih od 10 mm se kretao u granicama 70 - 80% i statističkih razlika nije bilo (tabela 27), izuzev podloge sa 2,22 µM BAP i 0,54 µM NAA gde su svi izdanci (100%) bili kraćih od 10

mm, što je više nego na svim ostalim podlogama (tabela 27). To može biti posledica velike razlike u koncentraciji hormona, gde je BAP bilo 4 puta više nego NAA koji utiče na izduživanje izdanaka. Međutim, u tom slučaju možemo očekivati sličnu pojavu i na podlozi sa 4,44 μM BAP i 0,1 μM NAA, što nije bio slučaj. Na podlozi sa relativno niskom koncentracijom BAP (0,44 μM) izdanaka kraćih od 10 mm bilo je najmanje (43,2%). Kada su u pitanju izdanci dužine od 10 do 20 mm i izdanci duži od 20 mm, na podlogama sa višim koncentracijama BAP nema značajnijih razlika jer se javljaju preklapanja između u homogenih grupa (tabela 27). Na podlozi sa 0,44 μM BAP i 0,54 μM NAA izdanaka dužih od 20 mm je upadljivo najviše, skoro 40%.

Posmatrajući i 1/2MS podloge, dužina izdanaka koji su se razvili iz nodusnih reznica bila je znatno kraća u odnosu na MS podloge (tabela 27) krećući se od 72,5% do 97,8% na svim podlogama. Izdanaka dužih od 20 mm gotovo da nije ni bilo (0,0 - 3,5%) na većini podloga, a svega 8% na podlozi sa 0,44 μM BAP i 0,54 μM NAA.

Tabela 27 Dužina izdanaka *D. serotinus* koji su se razvili iz nodusnih reznica

Hormoni		Podloga					
		MS	MS	MS	1/2MS	1/2MS	1/2MS
BAP μM	NAA μM	< 10 mm (%)	10 - 20 mm (%)	>20 mm (%)	< 10 mm (%)	10 - 20 mm (%)	>20 mm (%)
8,88	5,37	79,5 ^b	8,8 ^{bc}	11,7 ^{bc}	-	-	-
8,88	2,68	75,2 ^b	16,2 ^{ab}	8,6 ^{bc}	-	-	-
4,44	2,68	76,0 ^b	7,7 ^{bc}	16,3 ^b	85,3 ^b	12,8 ^{ab}	1,9 ^b
4,44	0,54	79,6 ^b	3,1 ^{bc}	17,3 ^b	88,4 ^b	9,7 ^{ab}	1,9 ^b
2,22	2,68	71,5 ^b	21,3 ^a	7,2 ^{bc}	84,2 ^b	12,3 ^{ab}	3,5 ^{ab}
2,22	0,54	100 ^a	0,0 ^c	0,0 ^c	97,8 ^a	2,2 ^b	0,0 ^b
0,44	0,54	43,2 ^c	17,4 ^{ab}	39,4 ^a	72,5 ^b	19,5 ^a	8,0 ^a

Napomena: Vrednosti koje su označene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju ($P < 0,05$)

Izdanci koji su se razvili iz terminalnih pupoljaka na MS podlogama su nešto duži u odnosu na izdanke formirane iz nodusnih reznica (tabele 27 i 28), odnosno na pojedinim podlogama (4,44 μM BAP i 0,54 μM NAA; 2,22 μM BAP i 2,68 μM NAA) je manji udeo izdanaka kraćih od 10 mm (65,8% i 63,5%). Međutim, na podlozi sa 0,44 μM BAP i 0,54 μM NAA broj izdanaka dužine do 10 mm je znatno veći (73,2%) (tabela 28). Kada su u pitanju izdanci koji su se razvili iz terminalnih pupoljaka na 1/2MS podlogama, nema značajnijih razlika u odnosu dužinu izdanaka obrazovanih iz nodusnih reznica (tabele 27 i 28).

Tabela 28 Dužina izdanaka *D. serotinus* koji su se razvili iz terminalnih pupoljaka

Hormoni		Podloga					
		MS	MS	MS	1/2MS	1/2MS	1/2MS
BAP μM	NAA μM	< 10 mm (%)	10 - 20 mm (%)	>20 mm (%)	< 10 mm (%)	10 - 20 mm (%)	>20 mm (%)
8,88	5,37	80,1 ^b	14,1 ^a	5,8 ^{bc}	-	-	-
8,88	2,68	75,6 ^b	12,0 ^a	12,4 ^{ab}	-	-	-
4,44	2,68	78,5 ^b	10,2 ^{ab}	11,3 ^{ab}	82,5 ^b	15,1 ^a	2,4 ^b
4,44	0,54	65,8 ^c	15,3 ^a	18,9 ^a	77,7 ^b	16,8 ^a	5,5 ^{ab}
2,22	2,68	63,5 ^c	16,8 ^a	19,7 ^a	75,5 ^b	20,9 ^a	3,6 ^b
2,22	0,54	93,5 ^a	6,5 ^b	0,0 ^c	95,2 ^a	4,8 ^b	0,0 ^b
0,44	0,54	73,2 ^b	5,7 ^b	21,1 ^a	79,6 ^b	10,2 ^{ab}	10,2 ^a

Napomena: Vrednosti koje su označene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju ($P < 0,05$)

Kada je u pitanju dužina izdanaka koji su se razvili iz vršnih reznica, MS podloge sa višom koncentracijom BAP (4,44 μM i 8,88 μM) su imale najveći udeo izdanaka kraćih od 10 mm, između 60% i 80% (tabela 29). Najviše izdanaka dužine do 10 mm bilo je na MS i 1/2 MS podlogama sa 2,22 μM BAP i 0,54 μM NAA, slično kao i kod izdanaka koji su se formirali iz terminalnih pupoljaka i iz nodusnih reznica, ali i na MS podlozi sa 8,88 μM BAP i 5,37 μM NAA.

Razlike u dužini izdanaka gajenih na podlogama MS i 1/2MS sa istim koncentracijama fitohormona su znatno manje izražene (tabele 27, 28 i 29). Najduži izdanci formirani su na podlogama sa 0,44 μ M BAP i 0,54 μ M NAA.

Tabela 29 Dužina izdanaka *D. serotinus* koji su se razvili iz vršnih reznica

Hormoni		Podloga					
		MS	MS	MS	1/2MS	1/2MS	1/2MS
BAP μ M	NAA μ M	< 10 mm (%)	10 - 20 mm (%)	>20 mm (%)	< 10 mm (%)	10 - 20 mm (%)	>20 mm (%)
8,88	5,37	78,1 ^a	12,5 ^b	9,4 ^{bc}	-	-	-
8,88	2,68	70,3 ^a	17,1 ^{ab}	12,6 ^{bc}	-	-	-
4,44	2,68	65,2 ^{ab}	19,7 ^a	15,1 ^b	68,2 ^a	20,6 ^a	11,2 ^b
4,44	0,54	61,2 ^b	20,4 ^a	18,4 ^b	60,5 ^{ab}	26,3 ^a	13,2 ^b
2,22	2,68	53,5 ^b	25,5 ^a	21,0 ^b	55,6 ^{ab}	29,0 ^a	15,4 ^b
2,22	0,54	75,3 ^a	13,2 ^b	11,5 ^{bc}	75,8 ^a	13,3 ^b	10,9 ^b
0,44	0,54	41,5 ^b	28,0 ^a	30,5 ^a	54,4 ^{ab}	23,9 ^a	21,7 ^a

Napomena: Vrednosti koje su označene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju ($P < 0,05$)

D. pinifolius

Kod vrste *D. pinifolius* formirali su se duži izdanci nego kod *D. serotinus* i *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*, naročito na MS podlogama sa nižim koncentracijama BAP (2,22 μ M i 0,44 μ M) gde udeo izdanaka kraćih od 10 mm nije prelazio 55% (tabele 30, 31 i 32).

Posmatrajući dužinu izdanaka koji su se razvili iz nodusnih reznica na MS podlogama, uočljiv je uticaj povećanja koncentracije BAP na smanjenje dužine izdanaka, odnosno na pojavu većeg procenta izdanaka koji pripadaju kategoriji dužine

do 10 mm (tabela 30). Taj uticaj koncentracije je pravilno izražen i statistički značajan, jer su formirane homogene grupe bez preklapanja, jedna na koncentracijama 4,44 μM i 8,88 μM BAP (65,3 - 75,6%), druga pri koncentraciji 2,22 μM BAP (47,6 - 52,8%) i treća pri koncentraciji 0,44 μM BAP (28,0%). Kako se koncentracija NAA znatno menjala pri istoj koncentraciji BAP (npr. 2,68 μM i 0,54 μM NAA), a nije bilo statistički značajnih razlika u procentu izdanaka pri promeni koncentracije NAA, možemo smatrati da NAA nije uticala na dužinu izdanaka (tabela 30).

Međutim, u drugim dužinskim kategorijama na MS podlogama i u svim dužinskim kategorijama na 1/2MS podlogama, pravilna zavisnost dužine od promene koncentracije hormona (bilo BAP ili NAA) ne postoji jer se javlja preklapanje između homogenih grupa ili je formirana samo jedna homogena grupa (izdanci dužine do 10 mm na 1/2 MS podlogama) (tabela 30).

Tabela 30 Dužina izdanaka *D. pinifolius* koji su se razvili iz nodusnih reznica

Hormoni		Podloga					
		MS	MS	MS	1/2MS	1/2MS	1/2MS
BAP μM	NAA μM	< 10 mm (%)	10 - 20 mm (%)	>20 mm (%)	< 10 mm (%)	10 - 20 mm (%)	>20 mm (%)
8,88	5,37	75,6 ^a	21,9 ^b	2,5 ^c	-	-	-
8,88	2,68	72,8 ^a	25,3 ^{ab}	1,9 ^c	-	-	-
4,44	2,68	68,3 ^a	23,4 ^{ab}	8,3 ^b	64,1 ^a	34,6 ^a	1,3 ^c
4,44	0,54	65,3 ^a	22,6 ^{ab}	12,1 ^b	68,3 ^a	31,7 ^a	0,0 ^c
2,22	2,68	52,8 ^b	23,8 ^{ab}	23,5 ^{ab}	60,0 ^a	13,3 ^c	26,7 ^a
2,22	0,54	47,6 ^b	25,6 ^{ab}	26,9 ^{ab}	69,6 ^a	23,9 ^b	6,5 ^b
0,44	0,54	28,0 ^c	34,4 ^a	37,6 ^a	55,2 ^a	37,9 ^a	6,9 ^b

Napomena: Vrednosti koje su označene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju ($P < 0,05$)

Dužina izdanaka koji su se razvili iz terminalnih pupoljaka je zavisila od koncentracije BAP, sli no kao i dužina izdanaka koji su se razvili iz nodusnih reznica. Naime, postoji statistički značajna razlika u procentu izdanaka dužine do 10 mm na MS podlogama sa različitim koncentracijom BAP (uz malo preklapanje homogenih grupa), dok se kod iste dužinske kategorije na 1/2 MS podlogama formira jedna homogena grupa, odnosno - značajna razlika ne postoji (tabela 31). Međutim, kada je u pitanju kategorija izdanaka dužih od 20 mm, moguće je uočiti vezu između povećanja koncentracije BAP i smanjenja broja izdanaka u toj kategoriji, s tim da se na MS podlogama značajne razlike javljaju između podloga sa 0,44 μM i 2,22 μM BAP, što nije slučaj na 1/2MS podlogama gde se značajne razlike javljaju tek pri višim koncentracijama BAP (4,44 μM), a nema značajnih razlika na podlogama sa 2,22 μM i 0,44 μM BAP (tabela 31).

Tabela 31 Dužina izdanaka *D. pinifolius* koji su se razvili iz terminalnih pupoljaka

Hormoni		Podloga					
		MS	MS	MS	1/2MS	1/2MS	1/2MS
BAP μM	NAA μM	< 10 mm (%)	10 - 20 mm (%)	>20 mm (%)	< 10 mm (%)	10 - 20 mm (%)	>20 mm (%)
8,88	5,37	73,1 ^a	23,5 ^a	3,4 ^d	-	-	-
8,88	2,68	73,8 ^a	24,5 ^a	1,7 ^d	-	-	-
4,44	2,68	60,1 ^{ab}	32,6 ^a	7,3 ^{cd}	60,7 ^a	33,9 ^a	5,4 ^b
4,44	0,54	68,3 ^a	22,5 ^a	9,2 ^c	65,4 ^a	31,4 ^a	3,2 ^b
2,22	2,68	53,6 ^b	21,6 ^a	24,7 ^b	65,5 ^a	24,1 ^b	10,3 ^a
2,22	0,54	49,8 ^b	25,6 ^a	24,6 ^b	52,3 ^a	38,5 ^a	9,2 ^a
0,44	0,54	22,4 ^c	30,6 ^a	47,1 ^a	53,9 ^a	36,8 ^a	9,2 ^a

Napomena: Vrednosti koje su označene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju ($P < 0,05$).

Posmatrano u celini, uticaj koncentracija BAP i NAA na dužinu izdanaka kraćih od 10 mm koji su se razvili iz vršnih reznica se manifestovao na slici 31 i 32 kao i kod izdanaka poreklom iz nodusnih reznica i terminalnih pupoljaka (tabela 32). Međutim, interesantno je primetiti da se najveći broj izdanaka dužih od 20 mm na 1/2MS podlogama kod sva tri tipa eksplanata formirao na podlozi sa 2,22 μ M BAP i 2,68 μ M NAA, ali su kod terminalnih pupoljaka te razlike neznatne u odnosu na ostale podloge sa nižom koncentracijom hormona (10,3%), dok su i kod nodusnih i kod vršnih reznica razlike prilično uočljive (26,7% - nodusne reznice; 24,0% - vršne reznice) (tabela 32).

Tabela 32 Dužina izdanaka *D. pinifolius* koji su se razvili iz vršnih reznica

Hormoni		Podloga					
		MS	MS	MS	1/2MS	1/2MS	1/2MS
BAP μ M	NAA μ M	< 10 mm (%)	10 - 20 mm (%)	>20 mm (%)	< 10 mm (%)	10 - 20 mm (%)	>20 mm (%)
8,88	5,37	80,5 ^a	13,8 ^b	5,7 ^c	-	-	-
8,88	2,68	77,6 ^a	11,1 ^b	11,3 ^c	-	-	-
4,44	2,68	58,3 ^b	22,9 ^{ab}	18,8 ^b	64,7 ^a	26,0 ^b	9,3 ^b
4,44	0,54	57,2 ^b	26,7 ^a	16,1 ^b	69,3 ^a	23,5 ^b	7,2 ^b
2,22	2,68	43,6 ^b	32,3 ^a	24,1 ^b	45,6 ^b	30,4 ^b	24,0 ^a
2,22	0,54	50,8 ^b	27,9 ^a	21,3 ^b	72,4 ^a	22,2 ^b	5,4 ^b
0,44	0,54	29,0 ^c	34,9 ^a	36,1 ^a	17,6 ^c	58,8 ^a	23,5 ^a

Napomena: Vrednosti koje su označene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju ($P < 0,05$)

Posmatrajući i razlike u dužini izdanaka formiranih na MS i 1/2MS podlogama u većiini slučajeva nema uočljivih razlika u procentu izdanaka koji pripadaju kategoriji dužine do 10 mm (tabele 30, 31 i 32), naročito na podlogama sa višom koncentracijom BAP (4,44 μ M). Međutim, kada je u pitanju kategorija izdanaka dužih od 20 mm, kod sva tri tipa eksplanata uočavamo da je procentualna zastupljenost izdanaka u navedenoj kategoriji manja na 1/2MS podlogama pri istim koncentracijama BAP i NAA (tabele 30, 31 i 32).

D. giganteiformis ssp. kladovanus

Dužina izdanaka koji su se razvili iz nodusnih reznica se menjala sa promenom koncentracije BAP, tako da je veći i procenat kraćih izdanaka (<10 mm) bio na podlogama sa većom koncentracijom BAP i obrnuto, veći i procenat izdanaka dužih od 20 mm bio je na podlogama sa nižom koncentracijom BAP (2,22 μ M i 0,44 μ M) (tabela 33). Za razliku od *D. serotinus* i *D. pinifolius*, kod *D. giganteiformis ssp. kladovanus* se u pojedinim slučajevima manifestovao statistički značajan uticaj NAA (tabela 33). Tako, na primer, na MS podlogama sa 4,44 μ M BAP, pri koncentraciji 0,54 μ M NAA udeo izdanaka kraćih od 10 mm iznosio je 81,2%, a sa povećanjem koncentracije NAA na 2,68 μ M - 68,2%, ali na 1/2MS podlogama sa istim sadržajem hormona, takvih razlika nije bilo.

Tabela 33 Dužina izdanaka *D. giganteiformis ssp. kladovanus* koji su se razvili iz nodusnih reznica

Hormoni		Podloga					
		MS	MS	MS	1/2MS	1/2MS	1/2MS
BAP μ M	NAA μ M	< 10 mm (%)	10 - 20 mm (%)	>20 mm (%)	< 10 mm (%)	10 - 20 mm (%)	>20 mm (%)
8,88	5,37	80,5 ^a	19,5 ^b	0,0 ^c	-	-	-
8,88	2,68	83,5 ^a	15,3 ^b	1,2 ^c	-	-	-
4,44	2,68	68,2 ^b	22,5 ^b	9,3 ^{bc}	84,5 ^a	13,7 ^c	1,8 ^c
4,44	0,54	81,2 ^a	13,2 ^b	5,6 ^c	86,5 ^a	10,1 ^c	3,4 ^c
2,22	2,68	65,4 ^b	15,2 ^b	19,4 ^b	59,6 ^b	25,2 ^b	15,2 ^b
2,22	0,54	61,5 ^b	20,0 ^b	18,5 ^b	42,3 ^c	45,6 ^a	12,1 ^b
0,44	0,54	39,2 ^c	30,7 ^a	30,1 ^a	27,8 ^d	44,7 ^a	27,5 ^a

Napomena: Vrednosti koje su označene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju ($P < 0,05$).

Me utim, tako e na MS podlogama, ali sa 2,22 μ M BAP, prilikom promena koncentracije NAA (0,54 μ M i 2,68 μ M) nije bilo zna ajnih razlika ni u jednoj dužinskoj kategoriji, na 1/2MS podlogama sa istim koncentracijama BAP i NAA statisti ki zna ajne razlike postoje kod izdanaka kra ih od 10 mm i kod izdanaka dužine 10 - 20 mm (tabela 33).

Izdanci koji su se razvili iz terminalnih pupoljaka su uglavnom bili duži od izdanaka formiranih iz nodusnih reznica na podlogama istog sastava. Dok je procenat izdanaka dužine do 10 mm formiranih iz nodusnih reznica na ve ini podloga bio u granicama 60 - 87% (tabela 33), procenat izdanaka u istoj dužinskoj kategoriji formiranih iz terminalnih pupoljaka ni na jednoj podlozi nije prešao 80%, a na polovini od ukupnog broja medijuma se kretao u granicama 50 - 66% (tabela 34).

Tabela 34 Dužina izdanaka *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* koji su se razvili iz terminalnih pupoljaka

Hormoni		Podloga					
		MS	MS	MS	1/2MS	1/2MS	1/2MS
BAP μ M	NAA μ M	< 10 mm (%)	10 - 20 mm (%)	>20 mm (%)	< 10 mm (%)	10 - 20 mm (%)	>20 mm (%)
8,88	5,37	61,3 ^{ab}	29,9 ^a	8,8 ^c	-	-	-
8,88	2,68	65,3 ^a	26,2 ^a	8,5 ^c	-	-	-
4,44	2,68	64,2 ^a	24,6 ^a	11,2 ^c	49,3 ^c	49,6 ^a	1,1 ^c
4,44	0,54	78,3 ^a	14,3 ^b	7,4 ^c	72,0 ^a	23,7 ^b	4,3 ^c
2,22	2,68	55,1 ^b	23,6 ^a	21,3 ^b	57,8 ^b	24,1 ^b	18,1 ^b
2,22	0,54	56,3 ^b	23,0 ^a	20,7 ^b	38,6 ^c	49,7 ^a	11,7 ^b
0,44	0,54	36,2 ^c	24,6 ^a	39,2 ^a	22,7 ^d	41,9 ^a	35,4 ^a

Napomena: Vrednosti koje su ozna ene istim slovom se statisti ki zna ajno ne razlikuju ($P < 0,05$).

Dužina izdanaka koji su se razvili iz vršnih reznica je bila slična na dužini izdanaka koji su se razvili iz terminalnih pupoljaka i na isti način je zavisila koncentracija BAP (tabele 34 i 35). Uticaj promene koncentracije NAA na dužinu izdanaka pri istoj koncentraciji BAP se ređe javljao, a pravilne zavisnosti nije bilo. Tako na 1/2MS podlogama, pri koncentraciji od 4,44 μM BAP, procenat izdanaka kraćih od 10 mm je bio veći na nižoj koncentraciji NAA (0,54 μM), dok je pri koncentraciji od 2,22 μM BAP situacija bila suprotna i procenat izdanaka u istoj kategoriji (< 10 mm) bio je veći na višoj koncentraciji NAA (2,68 μM), a sve navedene razlike su bile statistički značajne (tabela 35).

Tabela 35 Dužina izdanaka *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* koji su se razvili iz vršnih reznica

Hormoni		Podloga					
		MS	MS	MS	1/2MS	1/2MS	1/2MS
BAP μM	NAA μM	< 10 mm (%)	10 - 20 mm (%)	>20 mm (%)	< 10 mm (%)	10 - 20 mm (%)	>20 mm (%)
8,88	5,37	54,8 ^{bc}	34,0 ^a	11,2 ^c	-	-	-
8,88	2,68	63,2 ^b	29,3 ^a	7,5 ^c	-	-	-
4,44	2,68	61,2 ^b	26,3 ^a	12,5 ^c	45,7 ^b	50,5 ^a	3,8 ^c
4,44	0,54	80,0 ^a	7,8 ^b	12,2 ^c	72,8 ^a	21,5 ^c	5,7 ^c
2,22	2,68	51,1 ^c	25,4 ^a	23,5 ^b	56,4 ^b	23,9 ^c	19,7 ^b
2,22	0,54	52,8 ^c	25,4 ^a	21,8 ^b	41,2 ^b	46,0 ^a	12,8 ^b
0,44	0,54	32,4 ^d	24,1 ^a	43,5 ^a	28,9 ^c	33,6 ^b	37,5 ^a

Napomena: Vrednosti koje su označene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju ($P < 0,05$).

Kod sva tri tipa eksplanata evidentna je znatna razlika izme u podloga sa najnižom koncentracijom BAP i NAA i ostalih podloga, gde je relativno visok procenat izdanaka dužih od 20 mm (tabele 33, 34 i 35). Me utim, za razliku od *D. serotinus*, kao i *D. pinifolius*, kod *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* nema značajnih razlika u dužini izdanaka koji su se formirali na MS i 1/2MS podlogama sa istom koncentracijom hormona, ali su u nekim slučajevima na 1/2MS podlogama formirani duži izdanci (tabele 33, 34 i 35).

4.2.1.4. Broj nodusa

D. serotinus

Kod *D. serotinus* se broj nodusa kretao od 2,6 na MS podlozi sa 2,22 μM BAP i 0,54 μM NAA (nodusne reznice) do 15,3 na 1/2MS podlozi sa 2,22 μM BAP i 2,68 μM NAA (terminalni pupoljci) (tabela 36). Uticaj koncentracije BAP je teško uočljiv, odnosno ne postoje značajne statističke razlike u prosečnom broju nodusa kod istog tipa eksplanata izme u podloga sa 8,88, 4,44, 2,22 i 0,44 μM BAP na MS podlogama, dok su na 1/2MS podlogama prisutna preklapanja izme u homogenih grupa (tabela 36). Me utim, statistički značajne razlike se uočavaju sa promenom koncentracije NAA (2,68 μM ili 0,54 μM), pri istoj koncentraciji BAP (4,44 μM ili 2,22 μM) (tabela 36).

Pored uticaja NAA mogu se uočiti razlike izme u tipova eksplanata na medijumu istog sastava, ali u pojedinim slučajevima i izme u podloga sa MS i 1/2MS koncentracijom soli kod istog tipa eksplanata (tabela 36).

Analiza varijanse je pokazala da, pored balansa hormona, na prosečan broj nodusa značajno utiče tip eksplanata (tabela 37), sa tim da vršne reznice i terminalni pupoljci pripadaju istoj homogenoj grupi (tabela 38), što znači da razlike prikazane u tabeli 36, nisu statistički značajne izme u vršnih reznica i terminalnih pupoljaka. Značajne interakcije izme u navedenih faktora (tip eksplanata, balans hormona, koncentracija soli) nije bilo (tabela 37).

Tabela 36 Prose an broj nodusa *D. serotinus* koji se razvio iz jednog eksplanta

Hormoni		nodusne reznice		terminalni pupoljci		vršne reznice	
BAP μM	NAA μM	MS	1/2MS	MS	1/2MS	MS	1/2MS
8,88	5,37	10,9 ^a	-	11,5 ^{ab}	-	10,1 ^{ab}	-
8,88	2,68	5,1 ^c	-	11,1 ^{ab}	-	9,6 ^{ab}	-
4,44	2,68	8,2 ^{ab}	7,9 ^{ab}	12,5 ^a	10,5 ^{ab}	10,7 ^{ab}	8,4 ^{ab}
4,44	0,54	3,5 ^c	2,9 ^c	5,7 ^c	5,8 ^c	6,8 ^c	4,9 ^c
2,22	2,68	10,5 ^a	5,2 ^b	13,2^a	15,3 ^a	11,3 ^{ab}	13,2^a
2,22	0,54	2,6 ^{cd}	3,4 ^c	3,3 ^d	3,9 ^{cd}	5,5 ^c	5,7 ^c
0,44	0,54	9,2 ^{ab}	9,5 ^a	8,4 ^{bc}	7,3 ^c	12,3 ^a	10,1 ^{ab}

Napomena: Vrednosti koje su označene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju ($P < 0,05$).

Tabela 37 Analiza varijanse za uticaj sastava medijuma i tipa eksplanta na prose an broj nodusa *D. serotinus*

	Suma kvadrata	F-odnos	P-vrednost
OSNOVNI FAKTORI			
A: hormoni	250,739	24,69	<u>0,0001</u>
B: tip eksplanta	40,4667	7,97	<u>0,0125</u>
C: koncentracija MS soli	3,13633	1,24	0,2986
INTERAKCIJE FAKTORA			
AB	42,0833	2,07	0,1615
AC	3,55867	0,35	0,8368
BC	1,32267	0,26	0,7769

Tabela 38 Uticaj tipa eksplanta na broj nodusa *D. serotinus* - metod najmanje zna ajne razlike

Tip eksplanta	Homogene grupe
nodusne reznice	X
terminalni pupoljci	X
vršne reznice	X

D. pinifolius

Prose an broj nodusa kod *D. pinifolius* bio je nešto niži u odnosu na *D. serotinus*, od 1,0 (nodusne reznice na 1/2MS podlozi, 2,22 μ M BAP i 0,54 μ M NAA) do 9,7 (vršne reznice na MS podlozi sa 2,22 μ M BAP i 0,54 μ M NAA) (tabela 39).

Tabela 39 Prose an broj nodusa *D. pinifolius* koji se razvio iz jednog eksplanta

Hormoni		nodusne reznice		terminalni pupoljci		vršne reznice	
BAP μ M	NAA μ M	MS	1/2MS	MS	1/2MS	MS	1/2MS
8,88	5,37	5,7 ^{ab}	-	4,5 ^c	-	4,4 ^{bc}	-
8,88	2,68	5,2 ^{ab}	-	4,6 ^c	-	3,8 ^{bc}	-
4,44	2,68	7,1 ^a	2,5 ^{ab}	6,8 ^{ab}	3,2 ^a	6,5 ^b	2,7 ^a
4,44	0,54	3,4 ^c	2,7 ^{ab}	5,2 ^{bc}	1,5 ^b	6,2 ^b	1,3 ^c
2,22	2,68	6,6 ^a	3,0 ^a	6,9 ^{ab}	1,2 ^b	9,5 ^a	1,5 ^c
2,22	0,54	6,2 ^{ab}	1,0 ^c	8,5 ^a	2,1 ^{ab}	9,7^a	1,3 ^c
0,44	0,54	6,0 ^{ab}	1,4 ^c	8,3 ^a	1,1 ^b	8,2 ^{ab}	1,6 ^{bc}

Napomena: Vrednosti koje su ozna ene istim slovom se statisti ki zna ajno ne razlikuju ($P < 0,05$).

Uprkos tome što postoje značajne razlike u broju nodusa na podlogama sa različitom koncentracijom hormona, teško je uočiti bilo kakvu pravilnu vezu između koncentracije BAP ili NAA i broja nodusa. Kod *D. serotinus* sa povećanjem koncentracije NAA, povećavao se i broj nodusa, pri nepromenjenoj koncentraciji BAP. Međutim, kod *D. pinifolius* takve pravilnosti nema, odnosno uglavnom ne postoje statistički značajne razlike na podlogama sa 8,88, 4,44, 2,22 μM BAP pri promeni koncentracije NAA. Izuzetak predstavljaju nodusne reznice na MS podlogama sa 4,44 μM BAP, zatim na 1/2MS podlogama sa 2,22 μM BAP, terminalni pupoljci na 1/2MS podlogama sa 4,44 μM BAP i vršne reznice na 1/2MS podlogama sa 4,44 μM BAP, kod kojih je na pri koncentraciji 2,68 μM NAA prosečan broj nodusa statistički značajno veći nego pri 0,54 μM NAA (tabela 39).

Analiza varijanse je potvrdila da balans BAP i NAA nema značajnog uticaja na prosečan broj nodusa (tabela 40).

Tabela 40 Analiza varijanse za uticaj sastava medijuma i tipa eksplanta na prosečan broj nodusa *D. pinifolius*

	Suma kvadrata	F-odnos	P-vrednost
OSNOVNI FAKTORI			
A: hormoni	8,962	3,15	0,0784
B: tip eksplanta	3,722	2,62	0,1335
C: koncentracija MS soli	197,633	277,90	<u>0,0000</u>
INTERAKCIJE FAKTORA			
AB	5,048	0,89	0,5651
AC	13,7567	4,84	<u>0,0281</u>
BC	8,58067	6,03	<u>0,0253</u>

U tabeli 39 evidentna je razlika u prosečnom broju nodusa između eksplanata gajenih na MS i 1/2MS podlogama. Takođe, zapaža se i razlika između tipova

eksplanata na medijumu istog sastava, ali ne postoji pravilnost, odnosno na nekim podlogama je ve i broj nodusa kod vršnih reznica, na drugim podlogama kod nodusnih (tabela 39). U skladu sa tim su i rezultati analize varijanse koji pokazuju da tip eksplanata zna ajno ne uti e na broj nodusa, ali je zato uticaj koncentracije soli (MS ili 1/2MS) statisti ki zna ajan (tabela 40).

Tako e, prisutna je i interakcija izme u koncentracije MS soli sa jedne i tipa eksplanata i balansa hormona sa druge strane (tabela 40).

D. giganteiformis* ssp. *kladovanus

Prose an broj nodusa kod *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* se kretao od 2,7 na MS podlozi sa 8,88 μ M BAP i 5,37 μ M NAA (terminalni pupoljci) do 12,5 na MS podlozi sa 0,44 μ M BAP i 0,54 μ M NAA (vršne reznice) (tabela 41), što je neznatno više u odnosu na *D. serotinus* i primetno više u odnosu na *D. pinifolius*.

Tabela 41 Prose an broj nodusa *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* koji se razvio iz jednog eksplanta

Hormoni		nodusne reznice		terminalni pupoljci		vršne reznice	
BAP μ M	NAA μ M	MS	1/2MS	MS	1/2MS	MS	1/2MS
8,88	5,37	3,3 ^c	-	2,7 ^c	-	3,5 ^c	-
8,88	2,68	3,8 ^c	-	3,1 ^{bc}	-	3,6 ^c	-
4,44	2,68	4,1 ^c	7,5 ^{ab}	7,2 ^{ab}	11,4 ^a	10,5 ^{ab}	8,2 ^{ab}
4,44	0,54	6,3 ^{ab}	9,4 ^a	8,8 ^a	7,5 ^b	6,0 ^b	7,2 ^b
2,22	2,68	9,2 ^a	9,1 ^a	5,1 ^b	8,2 ^b	9,8 ^{ab}	8,4 ^{ab}
2,22	0,54	3,7 ^c	4,5 ^c	4,9 ^b	7,1 ^b	9,3 ^{ab}	9,4 ^a
0,44	0,54	8,5 ^{ab}	7,9 ^{ab}	6,5 ^{ab}	4,7 ^c	12,5^a	11,8 ^a

Napomena: Vrednosti koje su ozna ene istim slovom se statisti ki zna ajno ne razlikuju ($P < 0,05$).

Me utim, ako posmatramo razlike izme u razli itih tipova eksplanata, može se uo iti da je prose an broj nodusa prili no varijabilan (tabela 41) i nema pravilnosti u pogledu uticaja koncentracije MS soli i balansa hormona u podlogama. Takva konstatacija je statisti ki potvr ena i analizom varijanse (tabela 42) gde ni jedan od posmatranih faktora (tip eksplanta, hormoni ili koncentracija soli) zna ajno ne uti u na prose an broj nodusa.

Tabela 42 Analiza varijanse za uticaj sastava medijuma i tipa eksplanta na prose an broj nodusa *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*

	Suma kvadrata	F-odnos	P-vrednost
OSNOVNI FAKTORI			
A: hormoni	17,382	0,77	0,5740
B: tip eksplanta	12,5627	1,11	0,3746
C: koncentracija MS soli	28,6163	5,07	0,0544
INTERAKCIJE FAKTORA			
AB	15,964	0,35	0,9186
AC	29,6553	1,31	0,3432
BC	1,45867	0,13	0,8806

Može se re i da je broj nodusa parametar koji je kod istraživanih taksona razli ito zavisio od posmatranih faktora (tip eksplanta, hormoni ili koncentracija soli). Naime, kod *D. serotinus* zna ajan uticaj na prose an broj nodusa imali su balans dodatih hormona u podlozi i tip eksplanta, kod *D. pinifolius* - koncentracija MS soli, a kod *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* ni jedan od navedenih faktora nije imao statisti ki zna ajnog uticaja.

4.2.1.5. Dužina internodija

Pored dužine izdanaka merena je i dužina internodija (tabele 43, 46 i 48) jer iako se može otkriti korelacija između ta dva parametra, izdanci iste dužine mogu imati različitu dužinu internodija, a ukoliko je dužina internodija suviše mala, mora se nakon faze multiplikacije ubaciti i mekušica izduživanja izdanaka pre nego što se eksplanti postave na podloge za ožiljavanje. Druga mogućnost je dodavanje odgovarajućih hormona u medijum (giberelinska kiselina) koji će uticati na izduživanje izdanaka. U svakom slučaju, na taj način postupak razmnožavanja *in vitro* postaje složeniji.

D. serotinus

Prosečna dužina internodija *D. serotinus* se kretala od 1,8 mm na MS podlozi sa 4,44 μ M BAP i 0,54 μ M NAA (terminalni pupoljci) do 4,1 mm na MS podlozi sa 0,44 μ M BAP i 0,54 μ M NAA (vršne reznice) (tabela 43).

Tabela 43 Prosečna dužina internodija izdanaka *D. serotinus*

Hormoni		nodusne reznice		terminalni pupoljci		vršne reznice	
BAP μ M	NAA μ M	MS	1/2MS	MS	1/2MS	MS	1/2MS
8,88	5,37	2,3 ^{bc}	-	2,0 ^{bc}	-	2,1 ^b	-
8,88	2,68	2,1 ^{bc}	-	2,5 ^{bc}	-	2,5 ^b	-
4,44	2,68	3,4 ^a	3,6 ^a	3,2 ^{ab}	3,1 ^{ab}	3,1 ^{ab}	3,3 ^{ab}
4,44	0,54	2,1 ^{bc}	2,0 ^{bc}	1,8 ^c	2,1 ^{bc}	2,1 ^b	2,4 ^b
2,22	2,68	3,2 ^a	2,8 ^b	2,6 ^{bc}	2,4 ^{bc}	2,9 ^{ab}	2,8 ^b
2,22	0,54	1,9 ^{bc}	2,1 ^{bc}	2,1 ^{bc}	2,2 ^{bc}	2,2 ^b	2,3 ^{bc}
0,44	0,54	3,8 ^a	3,6 ^a	3,7 ^a	3,8 ^a	4,1^a	3,9 ^a

Napomena: Vrednosti koje su označene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju ($P < 0,05$).

Uticaj koncentracije oba fitohormona na promenu dužine internodija je uo lživ. Na podlogama sa jednakom koncentracijom BAP (4,44 μM ili 2,22 μM) i razli itom koncentracijom NAA (0,54 μM i 2,68 μM) internodije su duže na podlogama sa višom koncentracijom NAA (2,68 μM), mada se u pojedinim slu ajevima javlja preklapanje izme u homogenih grupa (tabela 43).

Interesantno je da pri istoj koncentraciji NAA (0,54 μM ili 2,68 μM) prilikom promene koncentracije BAP, zna ajnih razlika ima samo u slu aju kada je koncentracija BAP niska (0,44 μM), dok izme u podloga sa 2,22 μM i 4,44 μM BAP, pri konstantnoj koncentraciji NAA, nema statisti ki zna ajnih razlika u prose noj dužini internodija i na MS i na 1/2MS podlogama (tabela 43).

Tabela 44 Analiza varijanse za uticaj sastava medijuma i tipa eksplanta na prose nu dužinu internodija *D. serotinus*

	Suma kvadrata	F-odnos	P-vrednost
OSNOVNI FAKTORI			
A: hormoni	13,3413	223,60	<u>0,0000</u>
B: tip eksplanta	0,234	7,84	<u>0,0130</u>
C: koncentracija MS soli	0,00133333	0,09	0,7726
INTERAKCIJE FAKTORA			
AB	0,432667	3,63	<u>0,0435</u>
AC	0,178667	2,99	0,0874
BC	0,0206667	0,69	0,5279

Zna ajan uticaj balansa BAP i NAA u podlogama je potvr en i analizom varijanse (tabela 44). Pored toga, prisutan je i zna ajan uticaj tipa eksplanta (tabela 44), zbog ega je izvršena dalja analiza podataka metodom najmanje zna ajne razlike koja je pokazala da se prose na dužina internodija izdanaka koji su se razvili iz terminalnih pupoljaka zna ajno razlikuje od dužine internodija izdanaka formiranih iz nodusnih ili vršni reznica (tabela 45). Na osnovu toga, a prema podacima prikazanim u tabeli 43, može se konstatovati da se iz terminalnih pupoljaka razvili izdanci sa najkra im internodijama.

Tabela 45 Uticaj tipa eksplanta na dužinu internodija *D. serotinus* - metod najmanje značajne razlike

Tip eksplanta	Homogene grupe
terminalni pupoljci	X
nodusne reznice	X
vršne reznice	X

D. pinifolius

Kod *D. pinifolius* prose na dužina internodija se kretala u sličnom rasponu kao i kod *D. serotinus*, od 1,9 mm do 4,1 mm, ali su formirane na podlozi drugačijeg sastava i kod drugačijeg tipa eksplanta (tabela 46).

Tabela 46 Prose na dužina internodija izdanaka *D. pinifolius*

Hormoni		nodusne reznice		terminalni pupoljci		vršne reznice	
BAP μM	NAA μM	MS	1/2MS	MS	1/2MS	MS	1/2MS
8,88	5,37	1,9 ^{bc}	-	2,1 ^{bc}	-	2,0 ^c	-
8,88	2,68	2,0 ^{bc}	-	2,2 ^{bc}	-	2,3 ^{bc}	-
4,44	2,68	3,0 ^{ab}	3,2 ^{ab}	3,3 ^{ab}	2,9 ^b	3,0 ^b	3,1 ^b
4,44	0,54	2,2 ^b	2,3 ^b	2,0 ^c	2,3 ^{bc}	2,2 ^{bc}	2,5 ^{bc}
2,22	2,68	3,1 ^{ab}	3,1 ^{ab}	2,9 ^{ab}	2,7 ^b	3,2 ^b	2,7 ^{bc}
2,22	0,54	2,3 ^b	2,5 ^b	2,6 ^b	2,4 ^{bc}	2,4 ^{bc}	2,4 ^c
0,44	0,54	4,2^a	3,9 ^a	3,8 ^a	4,1 ^a	4,0 ^a	3,8 ^a

Napomena: Vrednosti koje su označene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju ($P < 0,05$).

Najkra e internodije (prosek 1,9 mm) su formirane na MS podlozi sa 8,88 μM BAP i 5,37 μM NAA (nodusne reznice) a najduže (prosek 4,1 mm) na 1/2MS podlozi sa sa 0,44 μM BAP i 0,54 μM NAA (terminalni pupoljci).

Kod *D. pinifolius* tip eksplanta nema značajnog uticaja na prosečnu dužinu internodija, kao ni MS koncentracija soli, ali je prisutan statistički značajan uticaj balansa dodatih hormona (tabela 47).

Uticaj koncentracija BAP i NAA se manifestuje na sličan način kao i kod *D. serotinus*, odnosno sa povećanjem koncentracije NAA (sa 0,54 μM na 2,68 μM), pri nepromenjenoj koncentraciji BAP (2,22 μM ili 4,44 μM) povećava se i dužina internodija; dok se prilikom promene koncentracije BAP, pri istoj koncentraciji NAA, značajne razlike javljaju samo između podloga sa 0,44 μM BAP i podloga sa 2,22 μM ili 4,44 μM BAP (tabela 46).

Tabela 47 Analiza varijanse za uticaj sastava medijuma i tipa eksplanta na prosečnu dužinu internodija *D. pinifolius*

	Suma kvadrata	F-odnos	P-vrednost
OSNOVNI FAKTORI			
A: hormoni	10,8447	70,12	<u>0,0000</u>
B: tip eksplanta	0,0326667	0,42	0,6693
C: koncentracija MS soli	0,003	0,08	0,7877
INTERAKCIJE FAKTORA			
AB	0,137333	0,44	0,8641
AC	0,168667	1,09	0,4229
BC	0,014	0,18	0,8377

D. giganteiformis* ssp. *kladovanus

Prose na dužina internodija izdanaka *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* se kretala u sli nom opsegu kao kod *D. serotinus* i *D. pinifolius* - od 1,7 mm (nodusne reznice na MS podlozi sa 8,88 μ M BAP i 5,37 μ M NAA) do 4,1 mm (vršne reznice na na MS podlozi sa 0,44 μ M BAP i 0,54 μ M NAA) (tabela 48). Uticaj koncentracije NAA na dužinu internodija je prisutan, izuzev na podlogama sa visokom koncentracijom BAP (8,88 μ M). Tako e, kod svih tipova eksplanata, na MS i 1/2MS podlogama sa 0,44 μ M BAP formirani su izdanci sa najdužim internodijama, dok se prose na dužina internodija na podlogama sa 2,22 μ M i 4,44 μ M BAP zna ajno me usobno ne razlikuje pri nepromenjenoj koncentraciji NAA (tabela 48).

Tabela 48 Prose na dužina internodija izdanaka *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*

Hormoni		nodusne reznice		terminalni pupoljci		vršne reznice	
BAP μ M	NAA μ M	MS	1/2MS	MS	1/2MS	MS	1/2MS
8,88	5,37	1,7 ^c	-	2,0 ^c	-	2,1 ^c	-
8,88	2,68	1,9 ^c	-	2,0 ^c	-	1,9 ^c	-
4,44	2,68	2,8 ^b	3,0 ^b	2,9 ^b	2,6 ^b	3,0 ^b	2,9 ^b
4,44	0,54	2,0 ^{bc}	2,1 ^c	2,1 ^c	2,2 ^c	2,4 ^{bc}	2,6 ^{bc}
2,22	2,68	2,7 ^b	2,8 ^b	2,9 ^b	2,5 ^{bc}	3,1 ^b	2,7 ^b
2,22	0,54	2,5 ^b	2,2 ^c	2,4 ^{bc}	2,2 ^c	2,6 ^{bc}	2,3 ^c
0,44	0,54	3,9 ^a	3,8 ^a	3,6 ^a	3,9 ^a	4,1^a	3,9 ^a

Napomena: Vrednosti koje su ozna ene istim slovom se statisti ki zna ajno ne razlikuju ($P < 0,05$).

Uticaj balansa hormona u podlogama potvr uje i analiza varijanse (tabela 49), me utim, pored toga na prose nu dužinu internodija uti e i tip eksplanta, dok koncentracija MS soli nema zna ajnog uticaja. Tako e, interakcije izme u navedenih faktora nema (tabela 49).

Kada je u pitanju uticaj tipa eksplanta (tabela 50), formirane su dve homogene grupe i prose na dužina internodija izdanaka obrazovanih iz vršnih reznica se zna ajno razlikuje od dužine internodija izdanaka poreklom iz terminalnih pupoljaka ili nodusnih reznica koje su kra e (tabela 48). Kod *D. serotinus* u istoj homogenoj grupi su bile internodije izdanaka razvijenih iz nodusnih i vršnih reznica, a terminalni pupoljci su formirali najkra e internodije.

Tabela 49 Analiza varijanse za uticaj sastava medijuma i tipa eksplanta na prose nu dužinu internodija *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*

	Suma kvadrata	F-odnos	P-vrednost
OSNOVNI FAKTORI			
A: hormoni	9,892	103,76	<u>0,0000</u>
B: tip eksplanta	0,292667	6,14	<u>0,0242</u>
C: koncentracija MS soli	0,0563333	2,36	0,1627
INTERAKCIJE FAKTORA			
AB	0,104	0,55	0,7953
AC	0,165333	1,73	0,2351
BC	0,0326667	0,69	0,5312

Tabela 50 Uticaj tipa eksplanta na dužinu internodija *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* - metod najmanje zna ajne razlike

Tip eksplanta	Homogene grupe
terminalni pupoljci	X
nodusne reznice	X
vršne reznice	X

Opseg u kom se kretala prose na dužina internodija je gotovo isti kod sva tri ispitivana taksona (1,7 - 4,1 mm). Sa pove anjem koncentracije NAA pove avala se i dužina internodija, što je i bilo o ekivano, dok je uticaj BAP slabije izražen i zna ajne razlike se javljaju tek pri niskim koncentracijama BAP (0,44 μ M).

4.2.2. UTICAJ pH VREDNOSTI HRANLJIVE PODLOGE NA RAZVOJ IZDANAKA *D. SEROTINUS*, *D. PINIFOLIUS*, *D. GIGANTEIFORMIS* SSP. *KLADOVANUS*

4.2.2.1. Vitalnost eksplanata

D. serotinus

Posmatraju i stepen regeneracije pravilno razvijenih izdanaka *D. serotinus* (65-98,9% zavisno od tipa reznica) najpovoljnijim su se pokazale podloge sa nižom koncentracijom MS soli (osnovna podloga 1/2MS) ija je pH vrednost 5,8 i 6,8 (tabela 51). Na regeneraciju izdanaka su uticali svi posmatrani faktori (tip eksplanta, pH vrednost podloge i koncentracija MS soli), a izme u tipa eksplanta i ostala dva faktora postojala je i statisti ki zna ajna interakcija što je pokazano sprovedenom logisti kom regresijom (tabela 52).

Kod *D. serotinus* vitrifikacija se javljala u relativno visokom procentu (tabela 51). Tako e, uprkos preklapanju izme u homogenih grupa, možemo uo iti da pH vrednost podloge i tip eksplanata imaju uticaja na vitrifikaciju. Procenat vitrifikovanih eksplanata koji se razvio iz nodusnih reznica je na pojedinim hranljivim podlogama prelazio 20%, što nije bio slu aj sa terminalnim pupoljcima i izdancima sa jednim nodusom.

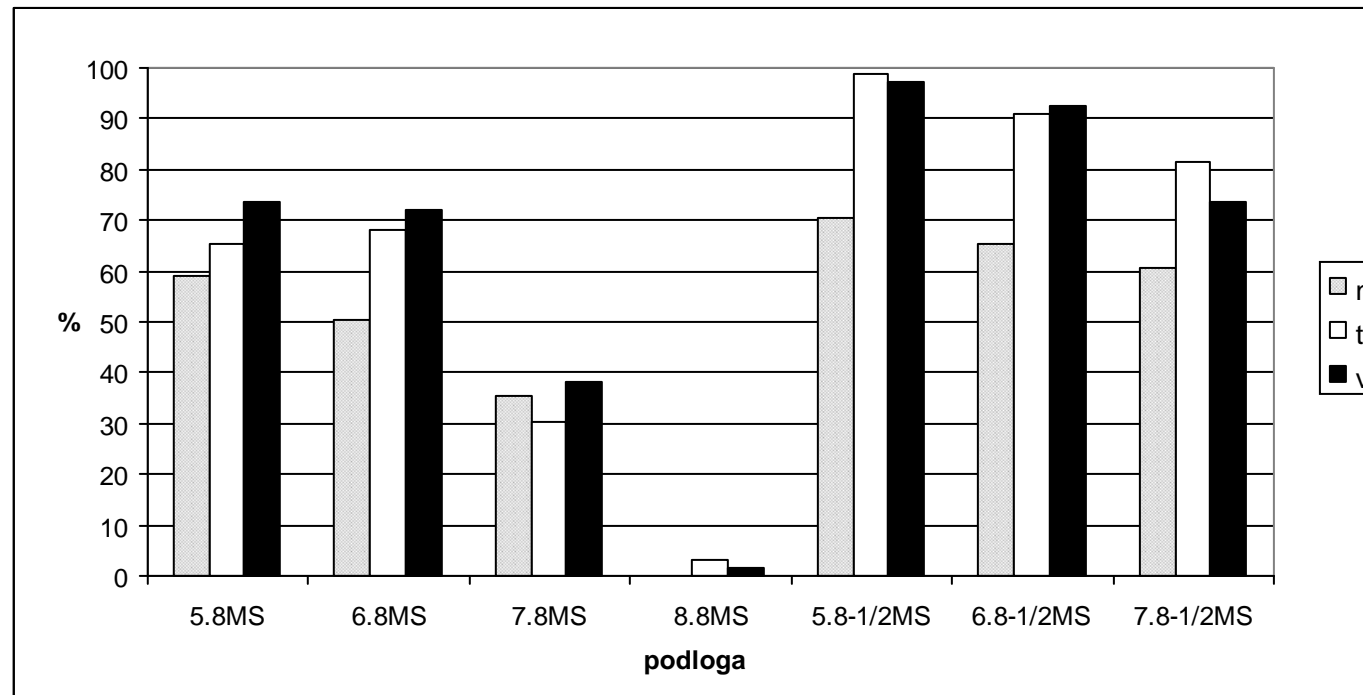
Tako e, pH vrednost hranljive podloge, kod istog tipa eksplanata je imala uticaja na udeo vitrifikovanih izdanaka. Na MS podlozi ija je pH vrednost iznosila 7,8 bilo je vitrifikovano svega 8,2% izdanaka koji su se razvili iz nodusnih reznica, dok se na ostalim hranljivim podlogama udeo vitrifikovanih nodusnih reznica kretao od 19% do skoro 30%, a jedino je na 1/2MS podlozi bio nešto niži (14.5%).

Tabela 51 Vitalnost izdanaka *D. serotinus* na MS i 1/2MS podlogama sa različitom pH vrednošću

Tip Eksplanata		poreklom iz nodusnih reznica			poreklom iz terminalnih pupoljaka			poreklom iz vršnih reznica		
pH vrednost	podloga	nekrotirani (%)	pravilno razvijeni (%)	vitriфикovani (%)	nekrotirani (%)	pravilno razvijeni (%)	vitriфикovani (%)	nekrotirani (%)	pravilno razvijeni (%)	vitriфикovani (%)
5,8	MS	18,2 ^c	58,9 ^{abc}	22,9 ^{ab}	9,5 ^d	65,5 ^c	25,0 ^a	21,2 ^c	73,5 ^b	5,3 ^b
6,8	MS	21,5 ^c	50,2 ^{bc}	28,3 ^a	12,1 ^{cd}	68,3 ^c	19,6 ^{ab}	15,5 ^{cd}	72,1 ^b	12,4 ^a
7,8	MS	56,5 ^b	35,3 ^c	8,2 ^c	56,5 ^b	30,2 ^d	13,3 ^b	51,2 ^b	38,2 ^c	10,6 ^a
8,8	MS	100,0 ^a	0,0 ^d	0,0 ^d	94,1 ^a	3,3 ^e	2,6 ^c	96,7 ^a	1,7 ^d	1,6 ^{bc}
5,8	1/2MS	15,2 ^{cd}	70,3 ^a	14,5 ^{bc}	0,0 ^e	98,9^a	1,1 ^{cd}	2,7 ^e	97,3 ^a	0,0 ^c
6,8	1/2MS	12,8 ^{cd}	65,2 ^{ab}	22,0 ^{ab}	5,3 ^d	90,8 ^{ab}	3,9 ^c	3,3 ^e	92,5 ^a	4,2 ^b
7,8	1/2MS	20,5 ^c	60,5 ^{ab}	19,0 ^{abc}	17,4 ^c	81,5 ^b	1,1 ^{cd}	14,9 ^{cd}	73,8 ^b	11,3 ^a
*8,8	1/2MS	100,0 ^a	0,0 ^d	0,0 ^d	100,0 ^a	0,0 ^{ef}	0,0 ^d	100,0 ^a	0,0 ^d	0,0 ^c

Napomena: Vrednosti koje su označene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju ($P < 0,05$).

*S obzirom da su na 1/2MS podlozi čija je pH vrednost iznosila 8,8 svi eksplanti nekrotirali, navedena podloga je izostavljena iz daljnjeg prikaza merenih parametara.



n, t, v - izdanci poreklom iz nodusnih reznica, terminalnih pupoljaka i vršnih reznica; 5,8MS, 6,8MS, 7,8MS i 8,8MS - MS podloge sa pH vrednoš u 5,8, 6,8, 7,8 i 8,8; 5,8-1/2MS; 6,8-1/2MS, 7,8-1/2MS - 1/2MS podloge sa pH vrednoš u 5,8, 6,8 i 7,8

Grafik 4 Procenat pravilno razvijenih izdanaka *D. serotinus* na podlogama MS i 1/2MS sa razli itom pH vrednoš u

Procenat vitrifikovanih eksplanata kod vrste *D. serotinus* je uglavnom viši na podlogama koja je pH vrednost 6,8, nego na podlogama koja je pH iznosi 5,8, ali je na podlogama koja je pH=7,8 niži. Međutim, na podlogama sa pH vrednošću 7,8 raste procenat nekrotiranih izdanaka. Takođe, kod izdanaka koji su se razvili iz terminalnih pupoljaka i izdanaka sa jednim nodusom primetuje se veći procenat vitrifikacije na MS podlogama u odnosu na 1/2MS podloge, dok kod nodusnih reznica takve razlike nisu prisutne.

Pravilnosti u pogledu uticaja pH vrednosti i koncentracije MS soli u medijumu su slabo izražene, što dovodi do pretpostavke da su ta dva faktora u međusobnoj interakciji (grafik 4). Značajnost uticaja pH vrednosti podloge, koncentracije MS soli i tipa eksplanta na pojavu vitrifikacije potvrđena je i multinominalnom logističkom regresijom koja je takođe pokazala da postoji i značajna interakcija između navedenih faktora (tabela 53).

Tabela 52 Značajnost i interakcija uticaja različitih faktora na regeneraciju pravilno razvijenih izdanaka *D. serotinus*

Faktor	Hi- kvadrat	P-vrednost
pH vrednost podloge	37,0918	<u>0,0000</u>
tip eksplanta	149,784	<u>0,0000</u>
koncentracija MS soli	12,2575	<u>0,0000</u>
pH vrednost podloge × tip eksplanta	77,265	<u>0,0000</u>
pH vrednost podloge × koncentracija MS soli	0,180117	0,6713
tip eksplanta × koncentracija MS soli	184,918	<u>0,0000</u>

Tabela 53 Značajnost i interakcija uticaja različitih faktora na pojavu vitifikacije kod *D. serotinus*

Faktor	Hi- kvadrat	P-vrednost
pH vrednost podloge	7,79667	<u>0,0052</u>
tip eksplanta	14,0975	<u>0,0009</u>
koncentracija MS soli	8,72808	<u>0,0031</u>
pH vrednost podloge × tip eksplanta	10,8567	<u>0,0044</u>
pH vrednost podloge × koncentracija MS soli	7,25089	<u>0,0071</u>
tip eksplanta × koncentracija MS soli	19,8857	<u>0,0000</u>

D. pinifolius

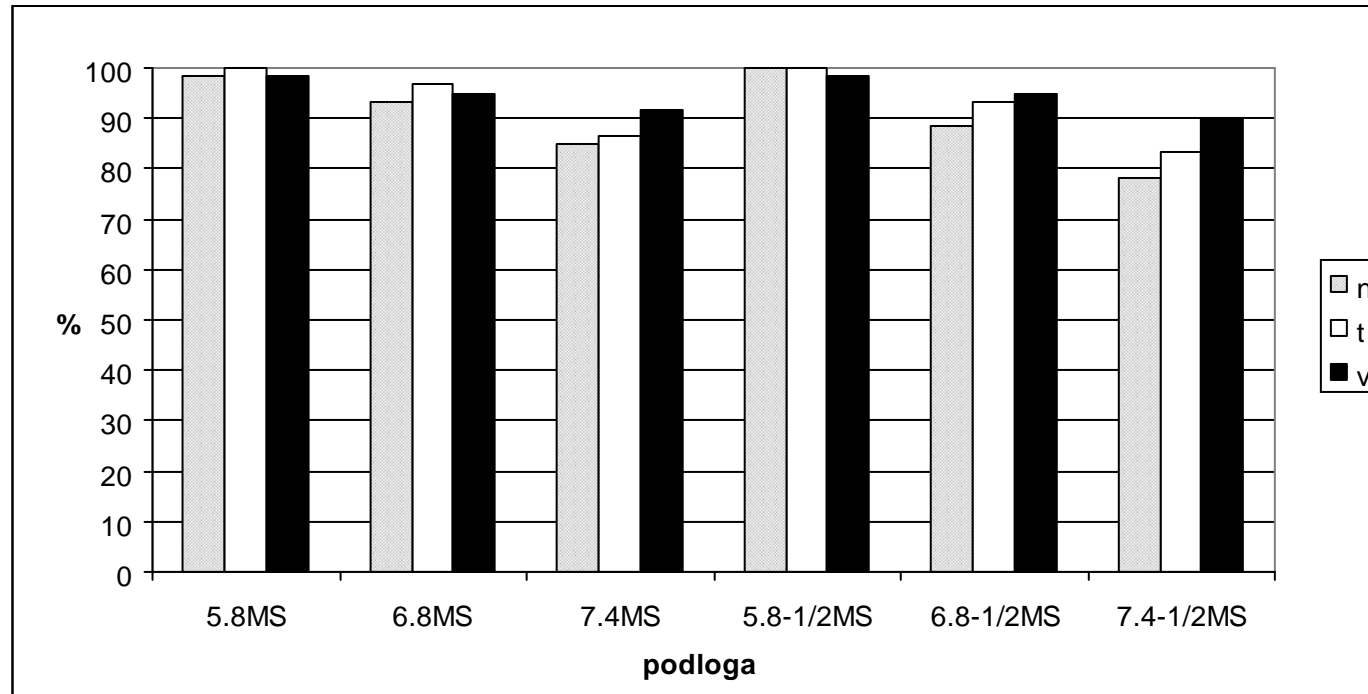
Za razliku od *D. serotinus*, kod *D. pinifolius* uticaj pH vrednosti na regeneraciju eksplanata je pravilnije izražen (tabela 54). Najpovoljnijim su se pokazale podloge čija je pH vrednost 5,8 što se moglo i otkrivati s obzirom da je u pitanju vrsta koja na svom prirodnom staništu raste na zemljištu čija je reakcija slabo kisela do neutralna.

Utjecaj koncentracija MS soli, zbog čega su prisutne razlike, iako male, između MS i 1/2MS podloga, pri čemu je stepen regeneracije neznatno viši na MS podlogama (grafik 5). Međutim, multinominalna logistička regresija je pokazala da pomenuti uticaj koncentracije MS soli nije statistički značajan (tabela 55). Također, na stepen regeneracije statistički značajno ne utiče ni tip eksplanta iz kojeg se izdanci razvijaju, niti postoji značajna interakcija između posmatranih parametara (koncentracije MS soli, pH vrednosti podloge i tipa eksplanta) (tabela 55).

Tabela 54 Vitalnost izdanaka *D. pinifolius* na MS i 1/2MS podlogama sa različitom pH vrednošću

Tip Eksplanata		poreklom iz nodusnih reznica			poreklom iz terminalnih pupoljaka			poreklom iz vršnih reznica		
pH vrednost	podloga	nekrotirani (%)	pravilno razvijeni (%)	vitriфикovani (%)	nekrotirani (%)	pravilno razvijeni (%)	vitriфикovani (%)	nekrotirani (%)	pravilno razvijeni (%)	vitriфикovani (%)
5,8	MS	1,7 ^{cd}	98,3 ^a	0,0 ^c	0,0 ^d	100,0 ^a	0,0 ^b	1,7 ^{bc}	98,3 ^a	0,0 ^b
6,8	MS	3,3 ^{cd}	93,4 ^{ab}	3,3 ^{bc}	3,3 ^{cd}	96,7 ^{ab}	0,0 ^b	5,0 ^{abc}	95,0 ^{ab}	0,0 ^b
7,4	MS	11,7 ^{ab}	85,0 ^{ab}	3,3 ^{bc}	10,0 ^{ab}	86,7 ^{abc}	3,3 ^{ab}	6,7 ^{abc}	91,6 ^{ab}	1,7 ^{ab}
5,8	1/2MS	0,0 ^d	100,0 ^a	0,0 ^c	0,0 ^d	100,0 ^a	0,0 ^b	1,7 ^{bc}	98,3 ^a	0,0 ^b
6,8	1/2MS	6,7 ^b	88,3 ^a	8,3 ^a	6,7 ^{bc}	93,3 ^{ab}	0,0 ^b	5,0 ^{abc}	95,0 ^{ab}	0,0 ^b
7,4	1/2MS	15,1 ^a	78,2 ^{bc}	6,7 ^{ab}	13,4 ^a	83,3 ^{bc}	3,3 ^{ab}	8,4 ^{ab}	89,9 ^{abc}	1,7 ^{ab}

Napomena: Vrednosti koje su označene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju ($P < 0,05$).



n, t, v- izdanci poreklom iz nodusnih reznica, terminalnih pupoljaka i vršnih reznica; 5,8MS, 6,8MS i 7,4MS - MS podloge sa pH vrednoš u 5,8, 6,8 i 7,4; 5,8-1/2MS; 6,8-1/2MS i 7,4-1/2MS - 1/2MS podloge sa pH vrednoš u 5,8, 6,8 i 7,4

Grafik 5 Procenat pravilno razvijenih izdanaka *D. pinifolius* na podlogama MS i 1/2MS

Vitrifikacija je bila prisutna, ali u malom procentu i javljala se samo na podlogama sa višom pH vrednošću (6,8 i 7,4), s tim da je bila nešto češća kod nodusnih reznica (3,3 - 8,3%), dok je kod terminalnih pupoljaka i izdanaka sa 1 - 2 nodusa bila slabije prisutna, samo na podlogama sa pH = 7,4 (1,7 - 3,3%). Navedene razlike između tipova eksplanta su statistički značajne, što je pokazano sprovedenom logističkom regresijom, odnosno pokazalo se da pored pH vrednosti podloge, na pojavu vitrifikacije značajno utiče i tip eksplanta, kao i da postoji interakcija između pH vrednosti podloge i tipa eksplanata koja je statistički značajna (tabela 56).

Koncentracija MS soli u podlozi nije imala značajan uticaj na pojavu vitrifikacije, što se moglo uočiti u tabeli 54, gde se broj vitrifikovanih izdanaka na MS i 1/2MS podlogama sa istom pH vrednošću, kod istog tipa eksplanta međusobno statistički značajno ne razlikuje. To je potvrđeno i logističkom regresijom, koja je pokazala da uticaj koncentracije MS soli nije statistički značajan, niti postoji interakcija između koncentracije soli i druga dva posmatrana parametra (tabela 56).

Tabela 55 Značajnost i interakcija uticaja različitih faktora na regeneraciju pravilno razvijenih izdanaka *D. pinifolius*

Faktor	Hi- kvadrat	P-vrednost
pH vrednost podloge	55,4594	<u>0,0000</u>
tip eksplanta	5,03452	0,0807
koncentracija MS soli	1,86257	0,1723
pH vrednost podloge × tip eksplanta	3,37411	0,1851
pH vrednost podloge × koncentracija MS soli	0,147806	0,7006
tip eksplanta × koncentracija MS soli	0,228085	0,8922

Tabela 56 Značajnost i interakcija uticaja različitih faktora na pojavu vitifikacije kod *D. pinifolius*

Faktor	Hi- kvadrat	P-vrednost
pH vrednost podloge	244,939	<u>0,0000</u>
tip eksplanta	7,00416	<u>0,0301</u>
koncentracija MS soli	2,69924	0,1004
pH vrednost podloge × tip eksplanta	6,77279	<u>0,0338</u>
pH vrednost podloge × koncentracija MS soli	0,0350069	0,8516
tip eksplanta × koncentracija MS soli	0,381645	0,8263

D. giganteiformis* ssp. *kladovanus

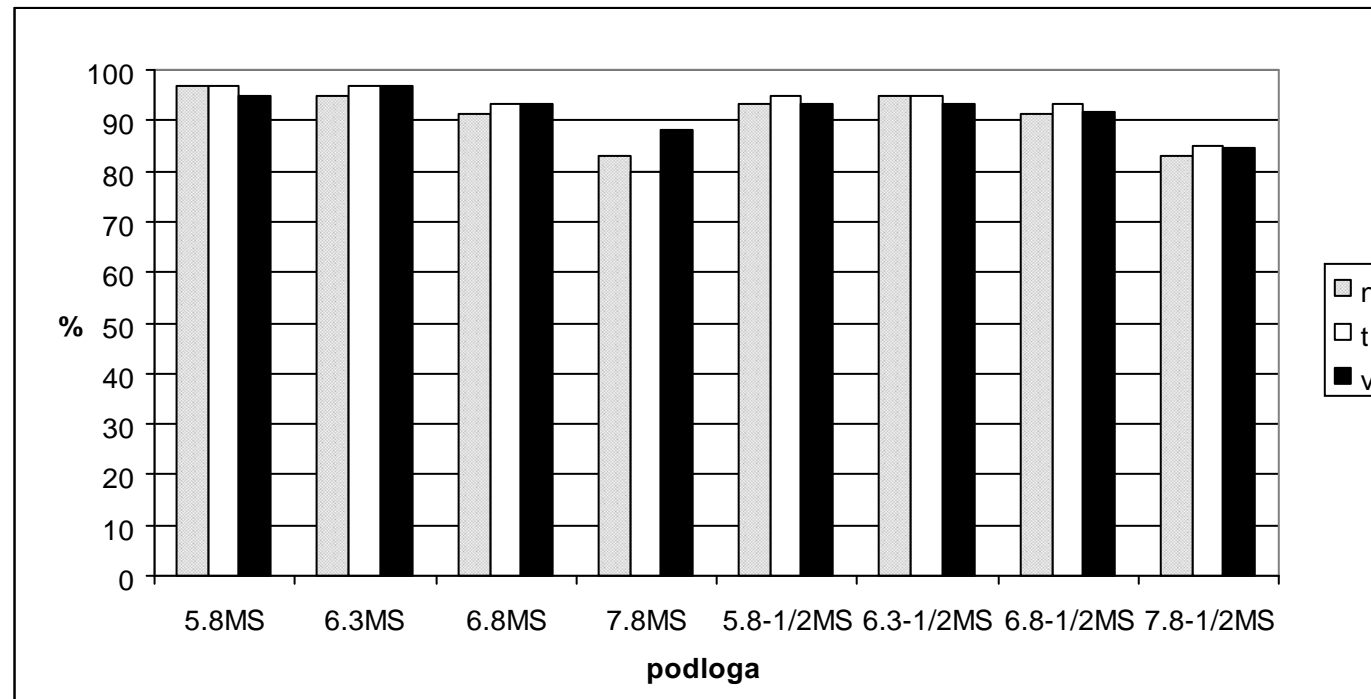
Promena pH vrednosti podloge je slabo uticala na razvoj izdanaka *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*. Uočajnije razlike su prisutne samo na podlogama gde je pH vrednost bila relativno visoka (7,8), dok kod podloga sa nižom pH vrednošću (5,8 i 6,3) gotovo da nema razlike jer se javlja preklapanje između u homogenih grupa (tabela 57).

Vitifikacija se javljala retko, samo kod nodusnih reznica i terminalnih pupoljaka, u malom procentu (1,7-3,3%) i samo na podlogama gde je pH vrednost iznosila 7,8 (tabela 57). Pri tom, procenat vitifikovanih izdanaka koji su se razvili iz istog tipa eksplanta na MS i 1/2MS podlogama pripada istoj homogenoj grupi, što ukazuje da nema statistički značajnih razlika između podloga sa MS i 1/2MS koncentracijom soli (tabela 57). Samim tim, bilo je potpuno otkrivano da i multinominalna logistička regresija potvrđuje da na pojavu vitifikacije značajno utiče pH vrednost podloge, dok MS koncentracija soli nema značajnog uticaja (tabela 59). Iako se vitifikacija nije javljala kod vršnih reznica ni na jednoj podlozi, već samo kod nodusnih reznica i terminalnih pupoljaka, uticaj tipa eksplanta na pojavu vitifikacije nije statistički značajan pri nivou značajnosti od $P < 0,05$ (dobijena vrednost je iznosila 0,0536) (tabela 59).

Tabela 57 Vitalnost izdanaka *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* na MS i 1/2MS podlogama sa različitom pH vrednošću

Tip Eksplanata		poreklom iz nodusnih reznica			poreklom iz terminalnih pupoljaka			poreklom iz vršnih reznica		
pH vrednost	podloga	nekrotirani (%)	pravilno razvijeni (%)	vitriфикovani (%)	nekrotirani (%)	pravilno razvijeni (%)	vitriфикovani (%)	nekrotirani (%)	pravilno razvijeni (%)	vitriфикovani (%)
5,8	MS	3,3 ^{bc}	96,7^a	0,0 ^b	3,3 ^{bcd}	96,7^{ab}	0,0 ^b	5,0 ^{bc}	95,0 ^{ab}	0,0 ^a
6,3	MS	5,0 ^{abc}	95,0 ^{ab}	0,0 ^b	3,3 ^{bcd}	96,7^{ab}	0,0 ^b	3,3 ^{bc}	96,7^{ab}	0,0 ^a
6,8	MS	8,5 ^{abc}	91,5 ^{ab}	0,0 ^b	6,7 ^{bc}	93,3 ^{ab}	0,0 ^b	6,7 ^{abc}	93,3 ^{ab}	0,0 ^a
7,8	MS	15,2 ^a	83,1 ^{bc}	1,7 ^{ab}	17,0 ^a	79,7 ^{bc}	3,3 ^{ab}	11,9 ^a	88,1 ^{bc}	0,0 ^a
5,8	1/2MS	6,7 ^{abc}	93,3 ^{ab}	0,0 ^b	5,0 ^{bc}	95,0 ^{ab}	0,0 ^b	6,7 ^{abc}	93,3 ^{ab}	0,0 ^a
6,3	1/2MS	5,0 ^{abc}	95,0 ^{ab}	0,0 ^b	5,0 ^{bc}	95,0 ^{ab}	0,0 ^b	6,7 ^{abc}	93,3 ^{ab}	0,0 ^a
6,8	1/2MS	8,5 ^{abc}	91,5 ^{ab}	0,0 ^b	6,8 ^{bc}	93,2 ^{abc}	0,0 ^b	8,4 ^{abc}	91,6 ^{abc}	0,0 ^a
7,8	1/2MS	13,6 ^{ab}	83,1 ^{bc}	3,3 ^{ab}	11,9 ^{ab}	84,8 ^{bc}	3,3 ^{ab}	10,2 ^{ab}	84,7 ^{bc}	0,0 ^a

Napomena: Vrednosti koje su označene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju ($P < 0,05$).



n, t, v - izdanci poreklom iz nodusnih reznica, terminalnih pupoljaka i vršnih reznica; 5,8MS, 6,3MS, 6,8MS i 7,4MS - MS podloge sa pH vrednoš u 5,8, 6,3, 6,8 i 7,4; 5,8-1/2MS; 6,3-1/2MS, 6,8-1/2MS i 7,4-1/2MS - 1/2MS podloge sa pH vrednoš u 5,8, 6,3, 6,8 i 7,4

Grafik 6 Procenat pravilno razvijenih izdanaka *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* na podlogama MS i 1/2MS

Me utim, pomenuti uticaj pH vrednosti podloge na regeneraciju izdanaka jeste statisti ki zna ajan (tabela 58). Efekat koncentracije MS soli na regeneraciju nije uo lživ, kao ni uticaj tipa eksplanta (grafik 6), što je i potvr eno logisti kom regresijom (tabela 58).

Tabela 58 Zna ajnost i interakcija uticaja razli itih faktora na regeneraciju pravilno razvijenih izdanaka *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*

Faktor	Hi- kvadrat	P-vrednost
pH vrednost podloge	34,577	<u>0,0000</u>
tip eksplanta	0,252676	0,8813
koncentracija MS soli	0,483137	0,4870
pH vrednost podloge × tip eksplanta	1,13655	0,5665
pH vrednost podloge × koncentracija MS soli	0,914356	0,3390
tip eksplanta × koncentracija MS soli	0,598973	0,7412

Tabela 59 Zna ajnost i interakcija uticaja razli itih faktora na pojavu vitrifikacije kod *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*

Faktor	Hi- kvadrat	P-vrednost
pH vrednost podloge	19,4565	<u>0,0000</u>
tip eksplanta	5,85067	0,0536
koncentracija MS soli	0,136869	0,7114
pH vrednost podloge × tip eksplanta	0,0000123816	1,0000
pH vrednost podloge × koncentracija MS soli	0,00000712603	1,0000
tip eksplanta × koncentracija MS soli	0,183678	0,9123

4.2.2.2. Broj izdanaka

D. serotinus

Prilikom određivanja broja izdanaka, izostavljene su podloge čija je pH vrednost iznosila 8,8 jer je na MS podlogama veoma mali broj eksplanata regenerisao normalno razvijene izdanke (zbog čega je bila nemoguća statistička obrada podataka), a na 1/2MS podlogama ih nije ni bilo.

Tabela 60 Prosečan broj izdanaka *D. serotinus* koji se razvio iz jednog eksplanata na MS i 1/2MS podlogama sa različitim pH vrednostima

Tip eksplanata	poreklom iz nodusnih reznica		poreklom iz terminalnih pupoljaka		poreklom iz vršnih reznica	
	MS	1/2MS	MS	1/2 MS	MS	1/2MS
pH vrednost						
5,8	10,1 ^a	4,5 ^b	8,8 ^{ab}	7,8 ^a	10,7 ^{ab}	7,5 ^{ab}
6,8	5,8 ^b	5,3 ^{ab}	11,5 ^a	7,2 ^a	11,5 ^a	5,8 ^b
7,8	6,0 ^b	5,8 ^a	6,9 ^b	4,6 ^b	9,3 ^b	8,2 ^a

Napomena: Vrednosti koje su označene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju ($P < 0,05$).

Na prosečan broj izdanaka koji su se razvili iz jednog postavljene eksplanata vrste *D. serotinus* uočljiv je uticaj pH vrednosti podloge (tabela 60). Međutim, iako su prisutne razlike kod posmatranih tipova eksplanata, ne postoji određena pravilna zavisnost između prosečnog broja izdanaka i promene pH vrednosti podloge. Na primer, najveći prosečan broj izdanaka poreklom iz vršnih reznica na 1/2MS podlozi formirao se kada je pH vrednost iznosila 7,8, dok je iz terminalnih pupoljaka na podlozi istog sastava pri pH = 7,8 formiran najmanji prosečan broj izdanaka (tabela 60). Takođe, vrednosti prosečnog broja izdanaka na podlogama pH vrednosti 6,8 se ne razlikuju statistički značajno od vrednosti dobijenih na podlogama čija je pH 5,8 (pri istoj

koncentraciji MS soli), izuzev kod izdanaka poreklom iz nodusnih reznica na MS podlogama (tabela 60). Višefaktorska analiza varijanse pokazala je da pH vrednost ipak nema značajnog uticaja na prosečan broj izdanaka po eksplantu (tabela 61).

Razlike u pogledu tipa eksplanata su prisutne, ali slabije izražene. Tako, najveći prosečan broj izdanaka na MS podlogama koji se razvio iz nodusnih reznica iznosi 10,1 na podlozi koja je pH = 5,8, dok se najveći prosečan broj izdanaka iz terminalnih pupoljaka i vršnih reznica (11,5 u oba slučaja) formirao na podlogama koja je pH=6,8. Najviše su uočljive razlike između eksplanata koji su rasli na podlogama sa različitim koncentracijom MS soli (tabela 60) gde je na svim 1/2MS podlogama prosečan broj izdanaka niži u odnosu na broj izdanaka koji su se razvili na MS podlogama iste pH vrednosti. Višefaktorskom analizom varijanse je potvrđeno da koncentracija MS soli ima statistički značajan uticaj na prosečan broj formiranih izdanaka, ali i da tip eksplanta iz kog su se izdanci formirali nema uticaja (tabela 61).

Tabela 61 Analiza varijanse uticaja pH vrednosti medijuma, koncentracije MS soli i tipa eksplanta na prosečan broj izdanaka *D. serotinus*

	Suma kvadrata	F-odnos	P-vrednost
OSNOVNI FAKTORI			
A: pH vrednost podloge	6,60778	1,06	0,4272
B: tip eksplanta	20,2878	3,25	0,1449
C: koncentracija MS soli	31,7339	10,18	<u>0,0332</u>
Interakcije faktora			
AB	10,7556	0,86	0,5552
AC	4,80778	0,77	0,5209
BC	1,17444	0,19	0,8352

Zbog svega navedenog, uprkos pretpostavci da viša pH vrednost pogoduje regeneraciji i razvoju izdanaka vrste *D. serotinus*, ipak možemo zaključiti da

najpovoljnija podloga za ovu vrstu posmatraju i prose an broj izdanaka, može da ima pH vrednost u opsegu 5,8 - 6,8, ali je potrebno da sadrži MS koncentraciju soli.

D. pinifolius

Posmatraju i prethodne rezultate, dobijene sa vrstom *D. serotinus* koja u prirodi raste na alkalnom zemljištu, moglo se o ekivati da e za optimalan razvoj *D. pinifolius* najviše pogodovati pH vrednost 5,8 što se i pokazalo ta nim (tabela 62). Najve i broj izdanaka se formirao upravo na podlogama ija je pH iznosila 5,8, nešto manji na podlogama sa pH 6,8, a najmanje na podlogama gde je pH vrednost bila 7,4. Iako su prisutna preklapanja izme u homogenih grupa posmatraju i vrednosti dobijene na podlogama sa pH 5,8 i pH 6,8, ipak su u svim slu ajevima, kod sva tri tipa eksplanta i na obe ispitivane koncentracije MS soli, na podlogama sa pH 6,8 dobijene niže vrednosti (tabela 62). Statisti ku zna ajnost uticaja pH vrednosti na prose an broj izdanaka potvrdila je i višefaktorska analiza varijanse (tabela 63).

Tabela 62 Prose an broj izdanaka *D. pinifolius* koji se razvio iz jednog eksplanta na MS i 1/2MS podlogama sa razli itom pH vrednoš u

Tip Eksplanata	poreklom iz nodusnih reznica		poreklom iz terminalnih pupoljaka		poreklom iz vršnih reznica	
	MS	1/2MS	MS	1/2MS	MS	1/2MS
pH vrednost						
5,8	7,2 ^a	7,0 ^a	6,1 ^a	5,9 ^a	7,3 ^a	6,2 ^a
6,8	5,6 ^{ab}	5,9 ^{ab}	4,8 ^{ab}	4,6 ^{ab}	5,8 ^{ab}	6,1 ^a
7,4	4,5 ^b	4,2 ^b	2,8 ^c	2,5 ^c	3,8 ^c	3,6 ^b

Napomena: Vrednosti koje su ozna ene istim slovom se statisti ki zna ajno ne razlikuju ($P < 0,05$).

Za razliku od rezultata dobijenih kod *D. serotinus* koncentracija MS soli nije uticala na prose an broj izdanaka *D. pinifolius* (tabela 62). Pored toga što je broj izdanaka uglavnom neznatno ve i na MS podlogama (tabela 62), te razlike su male i nisu statisti ki zna ajne (tabela 63).

U tabeli 62 primetne su razlike izme u tipova eksplanata, odnosno na svim ispitivanim podlogama najmanji prose an broj izdanaka formirao se iz terminalnih pupoljaka. Ta razlika je i statisti ki potvr ena (tabela 63), pri emu terminalni pupoljci pripadaju jednoj, a nodusne i vršne reznice drugoj homogenoj grupi (tabela 64). Takve razlike su donekle bile o ekivane, jer terminalni pupoljci imaju samo apikalni meristem, nodusne reznice imaju dva aksilarna pupoljka, a vršne reznice i apikalni i aksilarne pupoljke, pa samim tim i mogu nost formiranja ve eg broja izdanaka. Me utim, uprkos o ekivanju, takve razlike kod *D. serotinus* se nisu ispoljile.

Tabela 63 Analiza varijanse uticaja pH vrednosti medijuma, koncentracije MS soli i tipa eksplanta na prose an broj izdanaka *D. pinifolius*

	Suma kvadrata	F-odnos	P-vrednost
OSNOVNI FAKTORI			
A: pH vrednost podloge	28,47	188,40	<u>0,0001</u>
B: tip eksplanta	5,50333	36,42	<u>0,0027</u>
C: koncentracija MS soli	0,200556	2,65	0,1786
INTERAKCIJE FAKTORA			
AB	0,506667	1,68	0,3145
AC	0,307778	2,04	0,2455
BC	0,0544444	0,36	0,7180

Tabela 64 Uticaj tipa eksplanta na broj izdanaka *D. pinifolius* - metod najmanje zna ajne razlike

Tip eksplanta	Homogene grupe
terminalni pupoljci	X
vršne reznice	X
nodusne reznice	X

D. giganteiformis* ssp. *kladovanus

Kladovski karanfil sli no kao i *D. serotinus* raste na neutralnom do alkalnom zemljištu, ali je kod ovog taksona povoljan uticaj više pH vrednosti podloge uo lživiji. Pri tom, najpovoljnijom se pokazala podloga sa pH vrednoš u 6,3, ali uz male razlike, sa preklapanjem izme u homogenih grupa, u odnosu na podloge ija je pH vrednost iznosila 5,8 i 6,8 (tabela 65). Najnepovoljnijom se pokazala visoko alkalna podloga sa pH 7,8, na kojoj su kod svih tipova eksplanata dobijene najniže vrednosti prose nog broja izdanaka.

Uticaj koncentracije MS soli na broj izdanaka nije izražen (tabela 65), što je potvr eno i sprovedenom analizom varijanse (tabela 66).

Najve i broj izdanaka regenerisao se iz vršnih reznica, za razliku od nodusnih reznica koje su se u nešto ve em broju (3,6) regenerisale jedino na MS podlozi sa pH 5,8 (tabela 65). Na svakoj podlozi uo ljive su razlike izme u tipova eksplanata (tabela 65) i one su statisti ki zna ajne (tabela 66). Pri tom, zna ajne razlike se javljaju izme u vršnih reznica sa jedne strane i nodusnih reznica i terminalnih pupoljaka sa druge (tabela 67). Pored toga, prisutna je i statisti ki zna ajna interakcija izme u tipa eksplanta i druga dva posmatrana parametra (tabela 66).

Tabela 65 Prose an broj izdanaka *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* koji se razvio iz jednog eksplanta na MS i 1/2MS podlogama sa razli itom pH vrednoš u

Tip Eksplanata	poreklom iz nodusnih reznica		poreklom iz terminalnih pupoljaka		poreklom iz vršnih reznica	
	MS	1/2MS	MS	1/2MS	MS	1/2MS
pH vrednost						
5,8	3,6 ^a	2,7 ^{ab}	2,8 ^{bc}	1,7 ^{bc}	3,7 ^{ab}	3,5 ^{ab}
6,3	2,9 ^{ab}	3,3 ^a	5,1 ^a	4,2 ^a	4,1 ^a	3,8 ^a
6,8	3,0 ^{ab}	2,8 ^{ab}	3,1 ^b	2,2 ^{bc}	3,7 ^{ab}	3,2 ^{ab}
7,8	2,1 ^c	2,5 ^{ab}	2,3 ^{bc}	1,5 ^{bc}	3,2 ^{ab}	2,8 ^{ab}

Napomena: Vrednosti koje su ozna ene istim slovom se statisti ki zna ajno ne razlikuju ($P < 0,05$).

Tabela 66 Analiza varijanse uticaja pH vrednosti medijuma, koncentracije MS soli i tipa eksplanta na prose an broj izdanaka *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*

	Suma kvadrata	F-odnos	P-vrednost
OSNOVNI FAKTORI			
A: pH vrednost podloge	6,885	35,23	<u>0,0003</u>
B: tip eksplanta	2,1675	16,64	<u>0,0036</u>
C: koncentracija MS soli	1,215	18,65	0,0550
INTERAKCIJE FAKTORA			
AB	4,0425	10,34	<u>0,0060</u>
AC	0,231667	1,19	0,3914
BC	0,7525	5,78	<u>0,0399</u>

Tabela 67 Uticaj tipa eksplanta na broj izdanaka *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* - metod najmanje zna ajne razlike

Tip eksplanta	Homogene grupe
nodusne reznice	X
terminalni pupoljci	X
vršne reznice	X

4.2.2.3. Dužina izdanaka

Prilikom merenja dužine izdanaka oni su svrstani u odgovaraju e dužinske kategorije i njihova dužina je izražena kao procentualno u eš e u svakoj od tih kategorija (tabele 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75 i 76).

D. serotinus

Dužina izdanaka se razlikovala zavisno od tipa eksplanta, koncentracije MS soli i pH vrednosti podloge (tabele 68, 69 i 70). Najuo lživiji je uticaj koncentracije MS soli, gde su na 1/2MS podlogama izdanci bili primetno kra i u odnosu na MS podloge. Tako, procenat izdanaka dužih od 20 mm koji su se razvili iz nodusnih reznica na 1/2MS podlogama se kretao od 1,2% do 6,7%, na MS podlogama od 21,9 do 50,0% (tabela 68), iz terminalnih pupoljaka - na 1/2MS podlogama od 1,9% do 6,4%, na MS podlogama od 1,6% do 25,4% (tabela 69) i iz vršnih reznica - na 1/2MS podlogama od 3,3% do 16,9%, na MS podlogama od 10,8% do 23,6% (tabela 70).

Tabela 68 Dužina izdanaka *D. serotinus* koji su se razvili iz nodusnih reznica na MS i 1/2MS podlogama sa razli itom pH vrednoš u

pH vrednost	Podloga					
	MS	MS	MS	1/2MS	1/2MS	1/2MS
	< 10 mm (%)	10 - 20 mm (%)	>20 mm (%)	< 10 mm (%)	10 - 20 mm (%)	>20 mm (%)
5,8	15,7 ^b	34,3 ^{ab}	50,0 ^a	67,2 ^b	27,8 ^a	5,0 ^a
6,8	14,2 ^b	40,5 ^a	45,3 ^a	70,0 ^b	23,3 ^a	6,7 ^a
7,8	35,6 ^a	42,5 ^a	21,9 ^b	88,9 ^a	9,9 ^b	1,2 ^b

Napomena: Vrednosti koje su ozna ene istim slovom se statisti ki zna ajno ne razlikuju ($P < 0,05$).

Uticaj pH vrednosti je tako e bio uo lživ, a statisti ki se zna ajno razlikuju dužine na podlogama ija je pH = 7,8 od podloga ija pH vrednost iznosi 5,8, kod svih tipova eksplanata, na MS i 1/2MS podlogama (tabele 68, 69 i 70). Kada su u pitanju podloge ija je pH = 6,8, prisutna su preklapanja izme u homogenih grupa, pa u nekim slu ajevima se statisti ki zna ajne razlike javljaju u odnosu na podloge pH = 7,8 (tabela 68), a u nekim u odnosu na podloge ija je pH = 5,8 (vršne reznice na 1/2MS podlogama) (tabela 70).

Tabela 69 Dužina izdanaka *D. serotinus* koji su se razvili iz terminalnih pupoljaka na MS i 1/2MS podlogama sa različitom pH vrednošću

pH vrednost	Podloga					
	MS	MS	MS	1/2MS	1/2MS	1/2MS
	< 10 mm (%)	10 - 20 mm (%)	>20 mm (%)	< 10 mm (%)	10 - 20 mm (%)	>20 mm (%)
5,8	65,1 ^{ab}	24,4 ^a	10,5 ^b	66,4 ^b	27,2 ^a	6,4 ^a
6,8	58,4 ^b	16,2 ^b	25,4 ^a	72,7 ^{ab}	25,3 ^a	2,0 ^{ab}
7,8	72,9 ^a	25,5 ^a	1,6 ^c	88,6 ^a	9,5 ^b	1,9 ^{ab}

Napomena: Vrednosti koje su označene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju ($P < 0,05$).

Tabela 70 Dužina izdanaka *D. serotinus* koji su se razvili iz vršnih reznica na MS i 1/2MS podlogama sa različitom pH vrednošću

pH vrednost	Podloga					
	MS	MS	MS	1/2MS	1/2MS	1/2MS
	< 10 mm (%)	10 - 20 mm (%)	>20 mm (%)	< 10 mm (%)	10 - 20 mm (%)	>20 mm (%)
5,8	61,1 ^a	23,4 ^a	15,5 ^{ab}	52,3 ^b	30,8 ^a	16,9 ^a
6,8	58,2 ^a	18,2 ^a	23,6 ^a	71,2 ^a	22,9 ^{ab}	5,9 ^b
7,8	67,5 ^a	21,7 ^a	10,8 ^b	75,2 ^a	21,5 ^{ab}	3,3 ^b

Napomena: Vrednosti koje su označene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju ($P < 0,05$).

Na osnovu svega, može se smatrati da je dužina izdanaka, odnosno procentualno učešće broja izdanaka u odgovarajućoj dužinskoj kategoriji u vezi sa intenzitetom razvoja izdanaka, odnosno sa razvojem odgovarajućih pupoljaka. To znači da podloge koje su se pokazale nepovoljne za regeneraciju izdanaka, tj. na kojima je bio

nizak procenat pravilno razvijenih izdanaka, nepovoljno uti u i na rast tih formiranih izdanaka. Konkretno, na podlozi ija je pH vrednost 7,8, ne samo da je bio nizak procenat pravilno razvijenih izdanaka, nego su i ti izdanci uglavnom bili slabog porasta, odnosno, ve ina je bila kra a od 10 mm (tabele 68, 69 i 72).

D. pinifolius

Na dužinu izdanaka uticao je sastav podloge kao i njena pH vrednost. Me utim, sam uticaj se razli ito manifestvovao kod razli itih tipova eksplanta. Na primer, na 1/2MS podlogama, iz nodusnih reznica se formirao mali procenat izdanaka dužih od 20 mm (6,3 - 8,3%) pri emu uopšte nije bilo statisti ki zna ajne razlike izme u podloga sa razli itom pH vrednoš u, dok je na MS podlogama 18,5 - 34,9% izdanaka bilo duže od 20 mm i te vrednosti su se me usobno zna ajno razlikovale, zavisno od pH vrednosti medijuma (tabela 71).

Me utim, ako posmatramo istu kategoriju dužine izdanaka (> 20 mm) koji su se formirali iz terminalnih pupoljaka i vršnih reznica, može se uo iti da je procenat u toj kategoriji na 1/2MS podlogama mnogo viši (do 36,7%), kao i da se vrednosti dobijene na podlogama sa razli itom pH vrednoš u me usobno statisti ki zna ajno razlikuju (tabele 72 i 73).

Tabela 71 Dužina izdanaka *D. pinifolius* koji su se razvili iz nodusnih reznica na MS i 1/2MS podlogama sa razli itom pH vrednoš u

pH vrednost	Podloga					
	MS	MS	MS	1/2MS	1/2MS	1/2MS
	< 10 mm (%)	10 - 20 mm (%)	>20 mm (%)	< 10 mm (%)	10 - 20 mm (%)	>20 mm (%)
5,8	31,2 ^b	33,9 ^a	34,9 ^a	53,2 ^a	39,7 ^a	7,1 ^a
6,8	45,1 ^{ab}	28,7 ^a	26,2 ^{ab}	42,6 ^{ab}	49,1 ^a	8,3 ^a
7,4	57,1 ^a	24,4 ^a	18,5 ^b	49,5 ^a	44,2 ^a	6,3 ^a

Napomena: Vrednosti koje su ozna ene istim slovom se statisti ki zna ajno ne razlikuju ($P < 0,05$).

Ipak, i pored navedenih razlika, kod sva tri tipa eksplanata, na podlogama sa pH = 7,4 udeo izdanaka dužih od 20 mm bio je najkra i (4,8 - 8,1% na 1/2MS podlogama; 7,3 - 18,5% na MS podlogama). Tako e, suprotno o ekivanjima, na podlogama sa pH vrednoš u 6,8 izdanci su imali dobar porast, pri emu je više od 50% izdanaka bilo duže od 10 mm (tabele 71, 72 i 73).

Tabela 72 Dužina izdanaka *D. pinifolius* koji su se razvili iz terminalnih pupoljaka na MS i 1/2MS podlogama sa razli itom pH vrednoš u

pH vrednost	Podloga					
	MS	MS	MS	1/2MS	1/2MS	1/2MS
	< 10 mm (%)	10 - 20 mm (%)	>20 mm (%)	< 10 mm (%)	10 - 20 mm (%)	>20 mm (%)
5,8	26,5 ^b	31,2 ^a	42,3 ^a	41,9 ^b	44,6 ^a	13,5 ^b
6,8	43,6 ^{ab}	27,7 ^a	28,7 ^b	26,6 ^c	36,7 ^a	36,7 ^a
7,4	58,3 ^a	29,2 ^a	12,5 ^c	54,1 ^a	37,8 ^a	8,1 ^b

Napomena: Vrednosti koje su ozna ene istim slovom se statisti ki zna ajno ne razlikuju ($P < 0,05$).

Tabela 73 Dužina izdanaka *D. pinifolius* koji su se razvili iz vršnih reznica na MS i 1/2MS podlogama sa razli itom pH vrednoš u

pH vrednost	Podloga					
	MS	MS	MS	1/2MS	1/2MS	1/2MS
	< 10 mm (%)	10 - 20 mm (%)	>20 mm (%)	< 10 mm (%)	10 - 20 mm (%)	>20 mm (%)
5,8	32,7 ^b	32,8 ^a	34,5 ^a	48,6 ^a	31,7 ^a	19,7 ^b
6,8	44,3 ^{ab}	24,0 ^a	31,7 ^a	32,9 ^b	34,2 ^a	32,9 ^a
7,4	57,1 ^a	35,6 ^a	7,3 ^b	53,3 ^a	41,9 ^a	4,8 ^c

Napomena: Vrednosti koje su ozna ene istim slovom se statisti ki zna ajno ne razlikuju ($P < 0,05$).

D. giganteiformis ssp. *kladovanus*

Uticaj visoke pH vrednosti na smanjenje dužine izdanaka je prisutan kod sva tri ispitivana taksona, ali je najuo lživiji kod *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*. Na podlogama sa pH vrednoš u 7,8 udeo izdanaka kra ih od 10 mm koji se regenerisao iz nodusnih reznica i terminalnih pupoljaka kretao se od 70,1% do ak 85,2% (tabele 74 i 75) dok je prilikom regeneracije izdanaka iz vršnih reznica procentualna zastupljenost izdanaka u kategoriji nešto niža (66,0% i 69,2%) (tabela 76).

Tabela 74 Dužina izdanaka *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* koji su se razvili iz nodusnih reznica na MS i 1/2MS podlogama sa razli itom pH vrednoš u

pH vrednost	Podloga					
	MS	MS	MS	1/2MS	1/2MS	1/2MS
	< 10 mm (%)	10 - 20 mm (%)	>20 mm (%)	< 10 mm (%)	10 - 20 mm (%)	>20 mm (%)
5,8	53,3 ^b	31,7 ^a	15,0 ^a	49,5 ^b	35,2 ^{ab}	15,3 ^a
6,3	65,8 ^{ab}	28,5 ^a	5,7 ^b	51,2 ^b	34,8 ^{ab}	14,0 ^a
6,8	79,5 ^a	18,2 ^b	2,3 ^b	54,8 ^b	41,7 ^a	3,5 ^b
7,8	85,2 ^a	13,1 ^b	1,7 ^b	71,8 ^a	26,7 ^b	1,5 ^b

Napomena: Vrednosti koje su ozna ene istim slovom se statisti ki zna ajno ne razlikuju ($P < 0,05$).

Veza izme u dužine izdanaka i promene pH vrednosti se može uo iti u tabelama 74, 75 i 76, gde se sa pove anjem pH vrednosti od 5,8 do 7,8 pove ava i procenat izdanaka kra ih od 10 mm, a istovremeno smanjuje procenat izdanaka dužih od 20 mm. Tako e, može se primetiti da nema zna ajnijih razlika izme u podloga sa MS i 1/2MS koncentracijom soli, kao ni razlika izme u koriš enih tipova eksplanata.

Tabela 75 Dužina izdanaka *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* koji su se razvili iz terminalnih pupoljaka na MS i 1/2MS podlogama sa različitom pH vrednošću

pH vrednost	Podloga					
	MS	MS	MS	1/2MS	1/2MS	1/2MS
	< 10 mm (%)	10 - 20 mm (%)	>20 mm (%)	< 10 mm (%)	10 - 20 mm (%)	>20 mm (%)
5,8	46,2 ^b	28,3 ^{ab}	25,5 ^a	40,1 ^b	38,2 ^a	21,7 ^a
6,3	49,6 ^b	38,2 ^a	12,2 ^b	55,0 ^{ab}	34,5 ^a	10,5 ^b
6,8	71,9 ^a	25,0 ^{ab}	3,1 ^c	62,5 ^a	33,9 ^a	3,6 ^c
7,8	79,2 ^a	18,2 ^b	2,6 ^c	70,1 ^a	28,2 ^a	1,7 ^c

Napomena: Vrednosti koje su označene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju ($P < 0,05$).

Tabela 76 Dužina izdanaka *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* koji su se razvili iz vršnih reznica MS i 1/2MS podlogama sa različitom pH vrednošću

pH vrednost	Podloga					
	MS	MS	MS	1/2MS	1/2MS	1/2MS
	< 10 mm (%)	10 - 20 mm (%)	>20 mm (%)	< 10 mm (%)	10 - 20 mm (%)	>20 mm (%)
5,8	48,3 ^b	27,2 ^a	24,5 ^a	33,2 ^b	38,5 ^a	28,3 ^a
6,3	55,6 ^b	25,6 ^a	18,8 ^a	48,0 ^{ab}	30,5 ^a	21,5 ^a
6,8	74,3 ^a	21,6 ^a	4,1 ^b	57,3 ^a	38,0 ^a	4,7 ^b
7,8	69,2 ^a	28,5 ^a	2,3 ^b	66,0 ^a	31,2 ^a	2,8 ^b

Napomena: Vrednosti koje su označene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju ($P < 0,05$).

4.2.2.4. Broj nodusa

D. serotinus

Kod *D. serotinus* prose an broj nodusa se kretao od 4,6 na MS podlozi (pH = 6,8) do maksimalnih 15,1 nodusa na MS podlozi ija je pH bila 5,8 (tabela 77). Razlike u broju nodusa po eksplantu koji su se regenerisali na MS i 1/2MS podlogama iste pH vrednosti nisu izražene.

Me utim, uo ljava je razlika izme u vršnih i nodusnih reznica, gde se je prose an broj nodusa izdanaka koji su se obrazovali iz terminalnih pupoljaka i vršnih reznica u pojedinim slu ajevima primetno ve i u odnosu na broj nodusa koji se razvio iz nodusnih reznica (tabela 77). Ipak, i pored toga, analizom varijanse je pokazano da navedene razlike nisu statisti ki zna ajne, odnosno da tip eksplanta zna ajno ne uti e na broj formiranih nodusa na podlogama sa razli itom pH vrednoš u (tabela 78).

Tabela 77 Prose an broj nodusa *D. serotinus* koji se razvio iz jednog eksplanta

Tip Eksplanata	poreklom iz nodusnih reznica		poreklom iz terminalnih pupoljaka		poreklom iz vršnih reznica	
	MS	1/2MS	MS	1/2MS	MS	1/2MS
pH vrednost						
5,8	11,1 ^a	7,1 ^{ab}	12,3 ^{ab}	15,1 ^a	11,2 ^{ab}	13,5 ^a
6,8	4,6 ^b	7,9 ^{ab}	14,9 ^a	11,9 ^{ab}	14,5 ^a	10,5 ^{ab}
7,8	6,1 ^{ab}	8,9 ^a	7,1 ^b	9,2 ^b	8,1 ^b	9,3 ^b

Napomena: Vrednosti koje su ozna ene istim slovom se statisti ki zna ajno ne razlikuju ($P < 0,05$).

Kada je u pitanju uticaj pH vrednosti na broj formiranih nodusa *D. serotinus*, na svim ispitivanim podlogama, kod sva tri tipa eksplanata formirane su dve homogene grupe (tabela 77). Me utim, prisutna su preklapanja izme u tih homogenih grupa, a sam uticaj pH vrednosti kod razli itih tipova eksplanata na podlozi istog sastava se razli ito manifestvuje.

Na primer, na MS podlozi najmanji prose an broj nodusa izdanaka poreklom iz nodusnih reznica bio je na podlozi sa pH = 6,8 (4,6 nodusa), a na istoj podlozi je kod terminalnih pupoljaka i vršnih reznica bio maksimalan broj nodusa (14,9 i 14,5 respektivno) (tabela 77). Zbog takvih razlika je verovatno i višefaktorska analiza varijanse pokazala da pH vrednost podloge statistički značajno ne utiče na broj formiranih nodusa (tabela 78).

Tabela 78 Analiza varijanse uticaja pH vrednosti medijuma, koncentracije MS soli i tipa eksplanta na prose an broj nodusa *D. serotinus*

	Suma kvadrata	F-odnos	P-vrednost
OSNOVNI FAKTORI			
A: pH vrednost podloge	41,44	2,77	0,1762
B: tip eksplanta	60,2533	4,02	0,1104
C: koncentracija MS soli	0,680556	0,09	0,7781
INTERAKCIJE FAKTORA			
AB	24,2167	0,81	0,5794
AC	8,00444	0,53	0,6229
BC	0,697778	0,05	0,9550

D. pinifolius

Uticaj pH vrednosti podloge na prose an broj nodusa kod *D. pinifolius* je prisutan, ali se javljaju preklapanja između u homogenih grupa (tabela 79). Razlike su najuo ljivije kod nodusnih reznica, gde se na MS podlozi sa pH = 5,8 formirao značajno veći broj nodusa (6,1) u odnosu na podlogu čija je pH vrednost iznosila 6,8 i 7,8 (3,8 i 3,5 respektivno) (tabela 79). Međutim, i pored preklapanja između u homogenih grupa, u tabeli 79 može se uočiti pravilan pad vrednosti prosejnog broja nodusa sa povećanjem

pH podloge. Verovatno zbog toga je i višefaktorska analiza varijanse pokazala da pH vrednost podloge zna ajno uti e na prose an broj nodusa kod *D. pinifolius*, pri nivou zna ajnosti od $P < 0,05$ (tabela 80).

Za razliku od rezultata dobijenih kod *D. serotinus*, kod *D. pinifolius* postoji zna ajna razlika izme u eksplanata koji su se razvijali na MS i 1/2MS podlogama, gde je na MS podlogama iste pH vrednosti, kod istog tipa eksplanata prose an broj nodusa 2 do 3 puta ve i nego na 1/2MS podlogama (tabela 79). Zna ajnost uticaja koncentracije MS soli je potvr ena i analizom varijanse (tabela 80).

Tabela 79 Prose an broj nodusa *D. pinifolius* koji se razvio iz jednog eksplanta

Tip Eksplanata	poreklom iz nodusnih reznica		poreklom iz terminalnih pupoljaka		poreklom iz vršnih reznica	
	MS	1/2MS	MS	1/2MS	MS	1/2MS
pH vrednost						
5,8	6,1 ^a	1,9 ^a	8,3 ^a	2,7 ^a	8,2 ^a	2,6 ^{ab}
6,8	3,8 ^b	1,4 ^a	5,2 ^{ab}	2,4 ^{ab}	6,6 ^{ab}	3,0 ^a
7,4	3,5 ^b	1,9 ^a	4,0 ^{ab}	1,6 ^{ab}	4,4 ^{ab}	2,2 ^{ab}

Napomena: Vrednosti koje su ozna ene istim slovom se statisti ki zna ajno ne razlikuju ($P < 0,05$).

Razlike izme u tipova eksplanata su prisutne, na ve ini podloga najmanji prose an broj nodusa se formirao iz nodusnih reznica (tabela 79). Višefaktorskom analizom varijanse je utv eno da tip eksplanta ima zna ajnog uticaja na prose an broj nodusa kod *D. pinifolius* (tabela 80) i da se vrednosti dobijene kod sva tri tipa eksplanata me usobno zna ajno razlikuju (tabela 81).

Tako e, postoji statisti ki zna ajna interakcija izme u sva tri posmatrana faktora (pH vrednost podloge, koncentracija MS soli i tip eksplanta) (tabela 80) ime se mogu objasniti "nepravilnosti" u promeni broja nodusa. To se može uo iti i u tabeli 79, gde su na primer razlike izme u nodusnih reznica, terminalnih pupoljaka i vršnih reznica izražene na isti na in na MS i 1/2MS podlogama sa pH = 5,8, i na na MS i 1/2MS podlogama sa pH = 6,8.

Tabela 80 Analiza varijanse uticaja pH vrednosti medijuma, koncentracije MS soli i tipa eksplanta na prose an broj nodusa *D. pinifolius*

	Suma kvadrata	F-odnos	P-vrednost
OSNOVNI FAKTORI			
A: pH vrednost podloge	12,5911	106,91	<u>0,0313</u>
B: tip eksplanta	6,09778	51,77	<u>0,0014</u>
C: koncentracija MS soli	51,3422	871,85	<u>0,0000</u>
INTERAKCIJE FAKTORA			
AB	1,98222	8,42	<u>0,0314</u>
AC	7,49778	63,66	<u>0,0009</u>
BC	0,964444	8,19	<u>0,0385</u>

Tabela 81 Uticaj tipa eksplanta na broj nodusa *D. pinifolius* - metod najmanje zna ajne razlike

Tip eksplanta	Homogene grupe
nodusne reznice	X
terminalni pupoljci	X
vršne reznice	X

D. giganteiformis ssp. kladovanus

Kod *D. giganteiformis ssp. kladovanus* uo lživ je uticaj pH vrednosti podloge na prose an broj nodusa, gde sa pove anjem pH vrednosti, broj nodusa opada i na podlogama MS i 1/2MS (tabela 82). Kod svih tipova eksplanata, na podlogama sa MS i 1/2MS koncentracijom soli, najviše vrednosti prose nog broja nodusa dobijene su pri pH vrednosti 5,8 i kre u se od 4,7 (terminalni pupoljci na 1/2MS) do 12,5 (vršne reznice na podlozi MS) (tabela 82).

Pored uticaja pH vrednosti podloge, evidentan je i uticaj tipa eksplanta na broj nodusa, gde su najviše vrednosti dobijane kod izdanaka poreklom iz vršnih reznica, zatim nodusnih reznica i najmanje kod izdanaka koji su se razvili iz terminalnih pupoljaka (tabela 82). Izuzetak ine podloge sa pH = 7,8, gde je broj nodusa formiran iz terminalnih pupoljaka viši u odnos na broj nodusa obrazovan iz nodusnih reznica.

Tabela 82 Prose an broj nodusa *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* koji se razvio iz jednog eksplanta

Tip Eksplanata	poreklom iz nodusnih reznica		poreklom iz terminalnih pupoljaka		poreklom iz vršnih reznica	
	MS	1/2MS	MS	1/2MS	MS	1/2MS
pH vrednost						
5,8	8,5 ^a	7,9 ^a	6,5 ^a	4,7 ^a	12,5 ^a	11,8 ^a
6,3	6,3 ^{ab}	5,1 ^{ab}	5,9 ^{ab}	4,0 ^{ab}	9,2 ^{ab}	8,7 ^{ab}
6,8	3,5 ^b	2,7 ^b	3,1 ^b	2,4 ^b	5,8 ^{ab}	3,9 ^b
7,8	1,5 ^{bc}	1,4 ^{bc}	3,3 ^b	2,0 ^b	2,9 ^b	2,4 ^{bc}

Napomena: Vrednosti koje su ozna ene istim slovom se statisti ki zna ajno ne razlikuju ($P < 0,05$).

Višefaktorskom analizom varijanse je potvr eno da i pH vrednost i tip eksplanta zna ajno uti u na broj nodusa, kao i da postoji statisti ki zna ajna interakcija izme u navedenih faktora (tabela 83). Razlike izme u sva tri tipa eksplanata su statisti ki zna ajne (tabela 84).

Razlike izme u rezultata dobijenih na MS i 1/2MS podlogama, kod istog tipa eksplanta, pri istoj pH vrednosti su male (tabela 82) i analizom varijanse je utvr eno da nisu statisti ki zna ajne (tabela 83).

Tabela 83 Analiza varijanse uticaja pH vrednosti medijuma, koncentracije MS soli i tipa eksplanta na prose an broj nodusa *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*

	Suma kvadrata	F-odnos	P-vrednost
OSNOVNI FAKTORI			
A: pH vrednost podloge	150,243	259,60	<u>0,0000</u>
B: tip eksplanta	44,8825	116,33	<u>0,0000</u>
C: koncentracija MS soli	6,0	31,10	0,0614
INTERAKCIJE FAKTORA			
AB	23,6942	20,47	<u>0,0009</u>
AC	0,29	0,50	0,6952
BC	0,5925	1,54	0,2894

Tabela 84 Uticaj tipa eksplanta na broj nodusa *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* - metod najmanje zna ajne razlike

Tip eksplanta	Homogene grupe
terminalni pupoljci	X
nodusne reznice	X
vršne reznice	X

4.2.3. UTICAJ VRSTE I KONCENTRACIJE ŠE ERA NA RAZVOJ IZDANAKA *D. SEROTINUS*, *D. PINIFOLIUS* I *D. GIGANTEIFORMIS* SSP. *KLADOVANUS*

4.2.3.1. Vitalnost eksplanata

Kao i u prethodnim eksperimentima, za svaku vrstu karanfila, najpre je utvrđena vitalnost eksplanata 25 dana od postavljanja, odnosno broj nekrotiranih, vitrifikovanih i pravilno razvijenih izdanaka (tabele 85, 86, 89, 90 i 93).

Kako je navedeno u poglavlju "Materijal i metod rada", pojedini parametri uslova za rast kultura su podešeni na osnovu preliminarnih rezultata dobijenih tokom prethodnih oglada. Tokom svih oglada sprovedenih tokom ispitivanja uticaja še era u fazi multiplikacije izdanaka, svaka podloga različitog sastava u pogledu vrste i koncentracije še era je posmatrana kao poseban tretman. To znači da je bilo po 12 tretmana na podlogama sa MS i 1/2MS koncentracijom soli kod *D. serotinus* i *D. pinifolius* i dodatna 4 tretmana na podlogama sa MS koncentracijom soli kod *D. serotinus* koja su uključivala i dodavanja šeernog alkohola sorbitola. Kako u prethodnim eksperimentima kod *D. giganteiformis* ssp. *kladovanu*, za razliku od *D. serotinus* i *D. pinifolius*, nije bilo statistički značajnih razlika ni u jednom slučaju, kod svih merenih parametara između podloga sa MS i 1/2MS koncentracijom soli, ispitivanje uticaja vrste i koncentracije še era obavljeno je samo na podlogama sa 1/2MS koncentracijom soli, ukupno 12 tretmana.

D. serotinus

Vitalnost izdanaka *D. serotinus* razlikovala se zavisno od vrste i koncentracije še era, tipa eksplanta kao i koncentracije MS soli (tabele 85 i 86). Kako je kod *D. serotinus* izvršeno i preliminarno ispitivanje uticaja dodavanja šeernog alkohola sorbitola na rast kultura i ti tretmani su uključeni u analizu, a dobijene vrednosti su testirane metodom najmanje značajne razlike i analizom varijanse (tabela 85).

Tabela 85 Vitalnost izdanaka *D. serotinus* na MS podlogama sa razli itom koncentracijom še era

Vrsta še era	Konc.	poreklom iz nodusnih reznica			poreklom iz terminalnih pupoljaka			poreklom iz vršnih reznica		
		nekrotirani	pravilno razvijeni	vitriфикovani	nekrotirani	pravilno razvijeni	vitriфикovani	nekrotirani	pravilno razvijeni	vitriфикovani
	gL ⁻¹	%	%	%	%	%	%	%	%	%
saharoza	10	5,0 ^{de}	85,0 ^a	10,0 ^{abc}	13,3 ^d	68,4 ^b	18,3 ^{ab}	0,0 ^c	88,3 ^a	11,7 ^{ab}
	30	10,0 ^{cde}	73,3 ^{abc}	16,7 ^{ab}	6,7 ^{de}	90,0^a	3,3 ^b	5,0 ^{bc}	90,0^a	5,0 ^b
	50	13,3 ^{cde}	70,0 ^{abc}	16,7 ^{ab}	10,0 ^{de}	81,7 ^{ab}	8,3 ^b	6,7 ^{bc}	90,0^a	3,3 ^b
	70	5,0 ^{de}	83,3 ^{ab}	11,7 ^{ab}	6,7 ^{de}	73,3 ^{ab}	20,0 ^{ab}	5,0 ^{bc}	86,7 ^a	8,3 ^{ab}
glukoza	10	71,6 ^{bc}	21,7 ^c	6,7 ^{bc}	41,7 ^b	36,6 ^{bc}	21,7 ^a	18,3 ^{bc}	60,0 ^{ab}	21,7 ^a
	30	73,4 ^{bc}	18,3 ^c	8,3 ^{bc}	20,0 ^c	65,0 ^b	15,0 ^{ab}	3,3 ^c	85,0 ^{ab}	11,7 ^{ab}
	50	76,6 ^{bc}	16,7 ^{cd}	6,7 ^{bc}	25,0 ^c	51,6 ^{bc}	23,4 ^a	28,3 ^{bc}	56,7 ^b	15,0 ^{ab}
	70	93,3 ^{ab}	6,7 ^{de}	0,0 ^c	43,4 ^b	11,7 ^{cd}	11,7 ^{ab}	76,7 ^a	15,0 ^{bc}	8,3 ^b
fruktoza	10	83,3 ^{abc}	11,7 ^{cd}	5,0 ^{bc}	46,7 ^b	35,0 ^{cd}	18,3 ^{ab}	70,0 ^a	18,3 ^{bc}	11,7 ^{ab}
	30	48,3 ^{cd}	48,3 ^{bc}	3,4 ^{bc}	43,4 ^b	48,3 ^c	8,3 ^{ab}	53,3 ^{ab}	41,7 ^{bc}	5,0 ^b
	50	61,7 ^{cd}	25,0 ^c	13,3 ^{ab}	58,3 ^b	20,0 ^{cd}	21,7 ^a	65,0 ^a	28,3 ^{bc}	6,7 ^b
	70	96,7 ^a	3,3 ^{de}	0,0 ^c	88,3 ^a	5,0 ^d	6,7 ^{ab}	69,9 ^a	23,4 ^{bc}	6,7 ^b
fruktoza-sorbitol	10	63,4 ^{bcd}	18,3 ^c	18,3 ^a	26,7 ^c	55,0 ^{bc}	18,3 ^{ab}	6,7 ^{bc}	73,3 ^{ab}	20,0 ^a
	30	35,0 ^{cde}	46,7 ^{bc}	18,3 ^a	21,7 ^c	56,6 ^{bc}	21,7 ^a	20,0 ^b	66,7 ^{ab}	13,3 ^{ab}
	50	46,7 ^{cd}	41,6 ^{bc}	11,7 ^{ab}	23,4 ^c	51,6 ^{bc}	25,0 ^a	15,0 ^b	70,0 ^{ab}	15,0 ^{ab}
	70	85,0 ^{abc}	8,3 ^{de}	6,7 ^{bc}	41,7 ^b	50,0 ^{bc}	8,3 ^b	43,3 ^{ab}	35,0 ^{bc}	21,7 ^a

Tabela 86 Vitalnost izdanaka *D. serotinus* na 1/2MS podlogama sa razli itom koncentracijom še era

Vrsta še era	Koncentracija gL ⁻¹	poreklom iz nodusnih reznica			poreklom iz terminalnih pupoljaka			poreklom iz vršnih reznica		
		nekrotirani	pravilno razvijeni	vitriфикovani	nekrotirani	pravilno razvijeni	vitriфикovani	nekrotirani	pravilno razvijeni	vitriфикovani
		%	%	%	%	%	%	%	%	%
saharoza	10	6,7 ^b	91,6 ^a	1,7 ^a	3,3 ^b	96,7 ^a	0,0 ^b	5,0 ^b	95,0 ^a	0,0 ^a
	30	8,3 ^b	90,0 ^a	1,7 ^a	1,7 ^b	98,3^a	0,0 ^b	3,3 ^b	96,7 ^a	0,0 ^a
	50	8,3 ^b	90,0 ^a	1,7 ^a	3,3 ^b	96,7 ^a	0,0 ^b	3, ^{3b}	96,7 ^a	0,0 ^a
	70	10,0 ^{ab}	88,3 ^{ab}	1,7 ^a	8,3 ^b	91,7 ^a	0,0 ^b	5,0 ^b	95,0 ^a	0,0 ^a
glukoza	10	1,7 ^b	98,3^a	0,0 ^a	1,7 ^b	98,3 ^a	0,0 ^b	1,7 ^b	98,3^a	0,0 ^a
	30	1,7 ^b	98,3^a	0,0 ^a	3,3 ^b	96,7 ^a	0,0 ^b	1,7 ^b	98,3^a	0,0 ^a
	50	5,0 ^b	95,0 ^a	0,0 ^a	3,3 ^b	96,7 ^a	0,0 ^b	1,7 ^b	98,3^a	0,0 ^a
	70	8,3 ^b	91,7 ^a	0,0 ^a	20,0 ^a	80,0 ^a	0,0 ^b	5,0 ^b	95,0 ^a	0,0 ^a
fruktoza	10	3,3 ^b	96,7 ^a	0,0 ^a	1,7 ^b	98,3^a	0,0 ^b	3,3 ^b	96,7 ^a	0,0 ^a
	30	3,3 ^b	96,7 ^a	0,0 ^a	5,0 ^b	95,0 ^a	0,0 ^b	5,0 ^b	93,3 ^a	1,7 ^a
	50	18,3 ^{ab}	80,0 ^{ab}	1,7 ^a	28,3 ^a	70,0 ^b	1,7 ^b	16,7 ^a	80,0 ^{ab}	3,3 ^a
	70	31,7 ^a	65,0 ^b	3,3 ^a	33,3 ^a	61,7 ^b	5,0 ^{ab}	20,0 ^a	76,7 ^b	3,3 ^a

Napomena: Vrednosti koje su ozna ene istim slovom se statisti ki zna ajno ne razlikuju ($P < 0,05$).

Utjecaj koncentracije MS soli na udeo pravilno razvijenih izdanaka je bio uo lživ, na MS podlogama njihov procenat se kretao od 3,3% do 90,0% zavisno od vrste i koncentracije še era i tipa eksplanta (tabela 85), dok je na 1/2MS podlogama bio u granicama 61,7 - 98,3% (tabela 86). Zna ajnost uticaja koncentracije MS soli potvr ena je i multinominalnom logisti kom regresijom (tabela 87).

Regeneracija izdanaka na 1/2MS podlogama koje su sadržale saharozu i glukozu i niže koncentracije fruktoze (10 i 30 gL⁻¹) bila je visoka, bez zna ajnijih razlika. Na MS podlogama stepen pravilno regenerisanih eksplanata bio je najpovoljniji na podlogama koje sadrže saharozu, dok se zna ajno smanjuje na podlogama sa fruktozom i glukozom (tabele 85 i 86). Sprovedena logisti ka regresija je pokazala da promena koncentracije dodatih še era u podlozi zna ajno uti u na regeneraciju pravilno razvijenih izdanaka (tabela 87).

Preliminarno ispitivanje efekta dodavanja še ernog alkohola sorbitola je imalo diskutabilan efekat na razvoj pravilno razvijenih izdanaka. Analiziraju i podatke prikazane u tabeli 85 može se primetiti da je kod terminalnih pupoljaka regeneracija na podlozi sa 70 gL⁻¹ kombinacije fruktoze i sorbitola (1: 1) iznosila 50,0%, a na podlozi sa 70 gL⁻¹ fruktoze svega 5,0%. Me utim, uzimaju i u obzir da je sadržaj fruktoze u navedenoj podlozi sa sorbitolom oko 35 gL⁻¹ i porede i procenat regeneracije sa podlogom koja sadrži 30 gL⁻¹ fruktoze (regeneracija 48,3%), onda možemo smatrati da dodavanje sorbitola u ovom slu aju nema efekta na regeneraciju pravilno razvijenih izdanaka. Analogno tome, analiziraju i procenat regeneracije normalno razvijenih izdanaka iz vršnih i nodusnih reznica, dolazimo do zaklju ka da dodavanje sorbitola u tom slu aju može imati i negativan efekat (tabela 85).

S druge strane, ako posmatramo procenat regeneracije vršnih reznica na podlozi sa 30 gL⁻¹ fruktoze (41,7%) i na podlozi sa 30 gL⁻¹ kombinacije fruktoze i sorbitola (66,7%), zatim na podlogama sa 10 gL⁻¹ fruktoze (18,3%) i sa 10 gL⁻¹ kombinacije fruktoze i sorbitola (73,3%) o igledan je pozitivan efekat dodavanja sorbitola u medijum koji se u manjoj meri manifestvovao i kod nodusnih reznica i terminalnih pupoljaka (tabela 85). Zbog toga možemo opravdano da pretpostavimo da *D. serotinus* može da koristi sorbitol kao izvor energije, ne samo kao osmotikum, što treba potvrditi dodatnim istraživanjima.

Kako su istraživanja uticaja sorbitola na razvoj izdanaka *D. serotinus* sprovedena preliminarno, multinominalna logisti ka regresija nije obuhvatila podloge sa sorbitolom (tabele 87 i 88).

Posmatraju i uticaj tipa eksplanata, uz manja odstupanja najve i procenat pravilno regenerisanih izdanaka imaju vršne reznice, zatim terminalni pupoljci, a najmanji nodusne reznice (tabele 85 i 86), a navedene razlike su statisti ki zna ajne (tabela 87). Na MS podlogama sa glukozom razlike izme u koriš enih tipova eksplanata su naro ito izražene, što se pregledno može uo iti na grafiku 7.

Zna ajan problem pri razmnožavanju *D. serotinus* predstavlja pojava vitrifikacije. Ona je bila zabeležena i u prethodnim ogledima prilikom ispitivanja uticaja balansa hormona i pH vrednosti na razvoj izdanaka ove vrste, a kako se u tabelama 85 i 86 može videti, pojava vitrifikacije je povezana i sa sadržajem še era u hranljivim podlogama. Najzna ajniji uticaj, ipak ima koncentracija MS soli u podlogama, gde procenat vitrifikovanih eksplanata na MS podlogama esto prelazi 20%, dok na 1/2MS podlogama jedva da je prisutna vitrifikacija i to u malom procentu (1,7 - 5%) (tabele 85 i 86).

Me utim, teško je uo iti pravilnosti u pogledu uticaja vrste še era jer se dobijeni podaci razlikuju dodatno zavisno od tipa eksplanata i koncentracije dodatog še era (grafik 7). Tako je na MS podlogama, vitrifikacija kod nodusnih reznica prisutnija na podlogama sa saharozom i kombinacijom fruktoze i sorbitola, u odnosu na podloge sa glukozom i fruktozom (tabela 85), dok se kod terminalnih pupoljaka i vršnih reznica procenat vitrifikacije razlikuje na podlogama sa razli itom koncentracijom še era, uz preklapanje izme u homogenih grupa, dok razlike u pogledu same vrste še era nisu prisutne. Na 1/2MS podlogama vitrifikacije uopšte nema na podlogama sa glukozom, na podlogama sa saharozom se javlja samo kod nodusnih reznica bez obzira na koncentraciju še era u podlozi, dok se na podlogama sa fruktozom javlja kod sva tri tipa eksplanata, pove avaju i se neznatno sa pove anjem koncentracije fruktoze (tabela 86).

Posmatraju i zavisnost vitrifikacije i promene koncentracije še era u podlozi, i na MS i na 1/2MS podlogama postoji preklapanje izme u homogenih grupa, i esto nema zna ajnih razlika u procentu vitrifikacije izdanaka na podlogama sa 10 ili 70 gL⁻¹ posmatranog še era (saharoze, glukoze i fruktoze) (tabele 85 i 86). Zbog toga je bio sasvim o ekivan rezultat dobijen logisti kom regresijom koji je potvrdio da promena

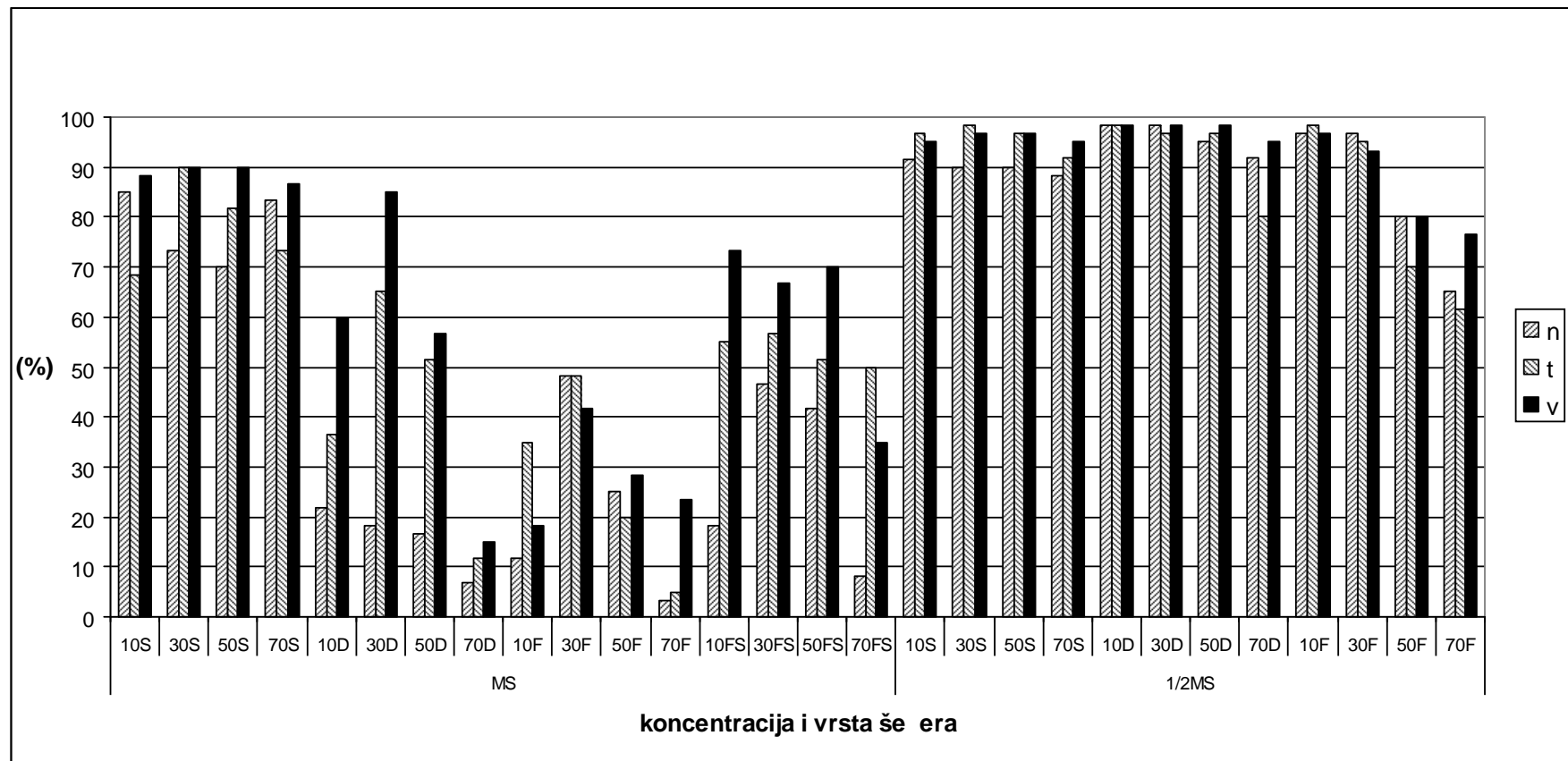
koncentracije ispitivanih še era ne utiče na vitrifikaciju (tabela 88). Međutim, uticaj tipa eksplanta i koncentracije MS soli u podlozi na pojavu vitrifikacije jesu statistički značajni (tabela 88).

Tabela 87 Značajnost uticaja različitih faktora na regeneraciju pravilno razvijenih izdanaka *D. serotinus* na podlogama sa različitim koncentracijom šeera

Faktor	Hi- kvadrat	P-vrednost
saharoza	32,0811	<u>0,0000</u>
glukoza	69,925	<u>0,0000</u>
fruktoza	196,383	<u>0,0000</u>
tip eksplanta	44,3892	<u>0,0000</u>
koncentracija MS soli	168,018	<u>0,0000</u>

Tabela 88 Značajnost uticaja različitih faktora na pojavu vitrifikacije kod *D. serotinus* na podlogama sa različitim koncentracijom šeera

Faktor	Hi- kvadrat	P-vrednost
saharoza	0,620871	0,4307
glukoza	1,54594	0,2137
fruktoza	1,92822	0,1650
tip eksplanta	14,1559	<u>0,0008</u>
koncentracija MS soli	240,048	<u>0,0000</u>



n, v, i - izdanci poreklom iz nodusnih reznica, terminalnih pupoljaka i vršnih reznica na MS i 1/2MS podlogama; 10S, 30S, 50S, 70S, 10D, 30D, 50D, 70D, 10F, 30F, 50F, 70F, 10FS, 30FS, 50FS, 70FS - sadržaj še'era u podlogama, konc. (10, 30, 50 ili 70 gL⁻¹) saharoze (S), glukoze (D), fruktoze (F) i fruktoze+sorbitola (FS)

Grafik 7 Procenat pravilno razvijenih izdanaka *D. serotinus* na podlogama MS i 1/2MS sa razli itim sadržajem še'era

D. pinifolius

Regeneracija izdanaka *D. pinifolius* je na svim podlogama bila relativno visoka, na ve ini podloga prelaze i 90% (tabele 89 i 90). Najnepovoljniji uticaj su imale podloge sa višim koncentracijama fruktoze (50 gL^{-1} i 70 gL^{-1}) gde je procenat pravilno regenerisanih izdanaka bio najmanji (80-85%).

Koncentracija saharoze u podlozi nije imala zna ajnog uticaja na stepen regeneracije izdanaka. Na MS podlogama kod sva tri tipa eksplanata i na 1/2MS podlogama kod terminalnih pupoljaka i vršnih reznica, svi procenti regeneracije bez obzira na koncentraciju saharoze pripadali su jednoj homogenoj grupi, tj. uopšte nije bilo statisti ki zna ajnih razlika (tabele 89 i 90). Logisti ka regresija je potvrdila da koncentracija saharoze (u ispitivanom opsegu) nema statisti ki zna ajan uticaj na regeneraciju pravilno razvijenih izdanaka (tabela 91). Pri promeni koncentracije glukoze i fruktoze javljaju se statisti ki zna ajne razlike, mada ne tako velike i uz preklapanja izme u dve formirane homogene grupe (tabele 89 i 90). Logisti kom regresijom je pokazano da uticaj promene koncentracije glukoze i fruktoze jeste statisti ki zna ajan (tabela 91).

Uticaj koncentracije MS soli na regeneraciju izdanaka je slabo prisutan, gotovo i da ne postoji (grafik 8), što je potvrdila i sprovedena analiza multiple logisti ke regresije (tabela 91). U odnosu na tip eksplanata, regeneracija pravilno razvijenih izdanaka iz nodusnih reznica je nešto manja u odnosu na regeneraciju iz terminalnih pupoljaka i vršnih reznica (grafik 8), a uticaj tipa eksplanta na stepen regeneracije izdanaka jeste statisti ki zna ajan (tabela 91).

Vitrifikacija se javljala retko i u veoma niskom procentu (0 - 5%) (tabele 89 i 90). Na podlogama sa $10 - 50 \text{ gL}^{-1}$ saharoze i glukoze kod terminalnih pupoljaka i vršnih reznica vitrifikacije uopšte nije ni bilo, a na podlogama sa 70 gL^{-1} saharoze i glukoze javljala se u niskom procentu (1,7 - 3,3%). Kod nodusnih reznica se javljala eš e, i na podlogama sa nižim koncentracijama še era, ali procenat vitrifikacije uglavnom nije prelazio 3,3% (tabele 89 i 90).

Tabela 89 Vitalnost izdanaka *D. pinifolius* na MS podlogama sa razli itom koncentracijom še era

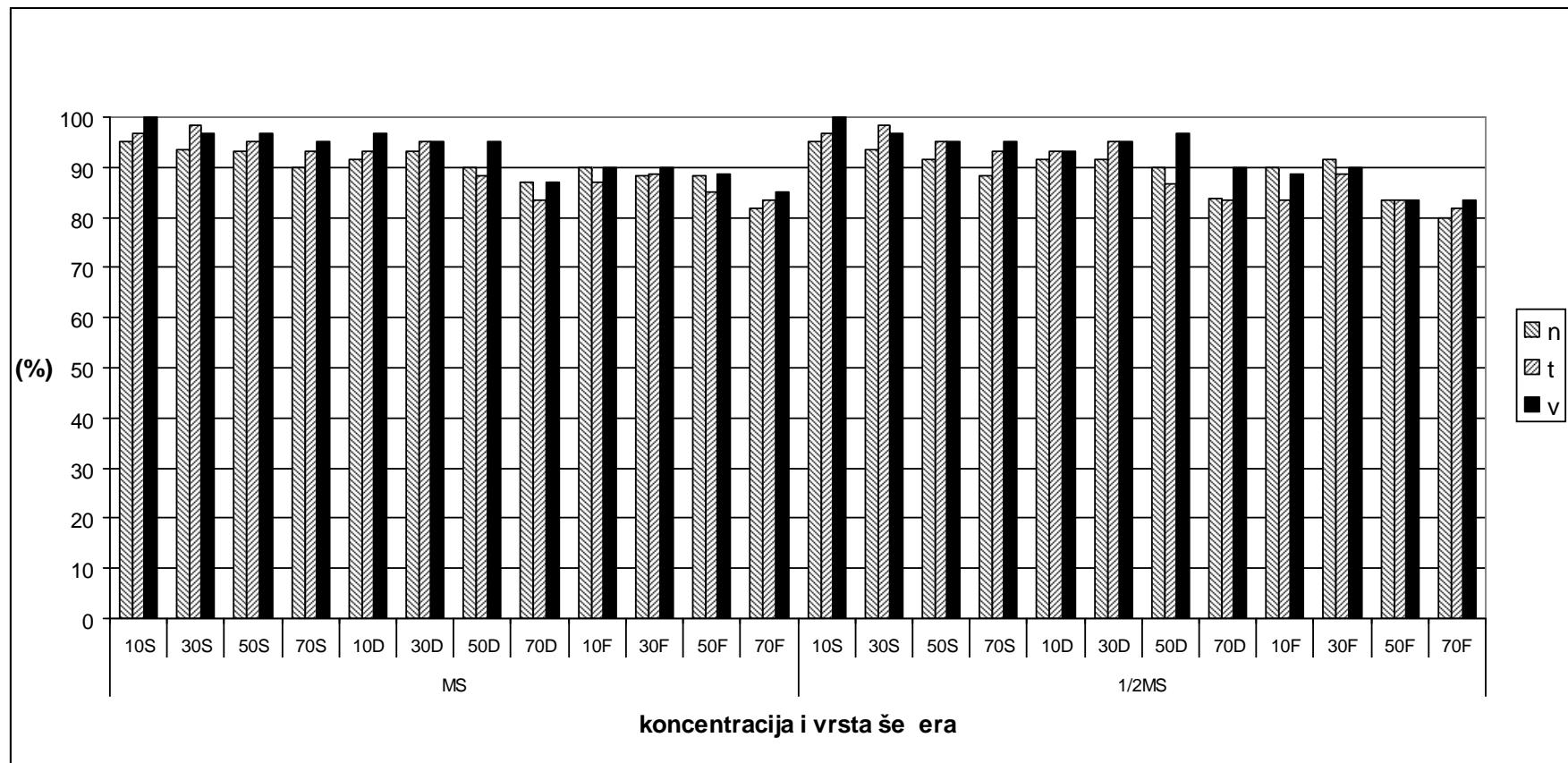
Vrsta še era	Koncentracija	poreklom iz nodusnih reznica			poreklom iz terminalnih pupoljaka			poreklom iz vršnih reznica		
	gL ⁻¹	nekrotirani	pravilno razvijeni	vitriфикovani	nekrotirani	pravilno razvijeni	vitriфикovani	nekrotirani	pravilno razvijeni	vitriфикovani
		%	%	%	%	%	%	%	%	%
saharoza	10	5,0 ^b	95,0 ^a	0,0 ^a	3,3 ^b	96,7 ^a	0,0 ^a	0,0 ^b	100,0^a	0,0 ^a
	30	3,3 ^b	93,4 ^a	3,3 ^a	1,7 ^b	98,3 ^a	0,0 ^a	3,3 ^b	96,7 ^a	0,0 ^a
	50	5,0 ^b	93,3 ^a	1,7 ^a	5,0 ^b	95,0 ^a	0,0 ^a	3,3 ^b	96, ^{7a}	0,0 ^a
	70	6,7 ^b	90,0 ^a	3,3 ^a	5,0 ^b	93,3 ^a	1,7 ^a	5,0 ^b	95,0 ^a	0,0 ^a
glukoza	10	6,7 ^b	91,6 ^a	1,7 ^a	6,7 ^b	93,3 ^a	0,0 ^a	3,3 ^b	96,7 ^a	0,0 ^a
	30	5,0 ^b	93,3 ^a	1,7 ^a	5,0 ^b	95,0 ^a	0,0 ^a	5,0 ^b	95,0 ^a	0,0 ^a
	50	8,3 ^{ab}	90,0 ^a	1,7 ^a	10,0 ^{ab}	88,3 ^a	1,7 ^a	5,0 ^b	95,0 ^a	0,0 ^a
	70	11,3 ^a	87,0 ^{ab}	1,7 ^a	15,0 ^{ab}	83,3 ^{ab}	1,7 ^a	11,3 ^a	87,0 ^{ab}	1,7 ^a
fruktoza	10	8,3 ^{ab}	90,0 ^a	1,7 ^a	11,3 ^{ab}	87,0 ^a	1,7 ^a	10,0 ^{ab}	90,0 ^{ab}	0,0 ^a
	30	8,3 ^{ab}	88,4 ^a	3,3 ^a	11,3 ^{ab}	88,7 ^a	0,0 ^a	10,0 ^{ab}	90,0 ^{ab}	0,0 ^a
	50	10,0 ^a	88,3 ^a	1,7 ^a	15,0 ^a	85,0 ^{ab}	0,0 ^a	11,3 ^a	88,7 ^{ab}	0,0 ^a
	70	13,3 ^a	81,7 ^{ab}	5,0 ^{ab}	15,0 ^a	83,3 ^b	1,7 ^a	13,3 ^a	85,0 ^b	1,7 ^a

Napomena: Vrednosti koje su ozna ene istim slovom se statisti ki zna ajno ne razlikuju ($P < 0,05$).

Tabela 90 Vitalnost izdanaka *D. pinifolius* na 1/2MS podlogama sa različitom koncentracijom šećera

Vrsta šećera	Koncentracija gL ⁻¹	poreklom iz nodusnih reznica			poreklom iz terminalnih pupoljaka			poreklom iz vršnih reznica		
		nekrotirani	pravilno razvijeni	vitriфикovani	nekrotirani	pravilno razvijeni	vitriфикovani	nekrotirani	pravilno razvijeni	vitriфикovani
		%	%	%	%	%	%	%	%	%
saharoza	10	5,0 ^b	95,0 ^a	0,0 ^a	3,3 ^b	96,7 ^a	0,0 ^a	0,0 ^b	100,0^a	0,0 ^a
	30	3,3 ^b	93,4 ^a	3,3 ^a	1,7 ^b	98,3 ^a	0,0 ^a	3,3 ^b	96,7 ^a	0,0 ^a
	50	5,0 ^b	91,7 ^a	3,3 ^a	5,0 ^b	95,0 ^a	0,0 ^a	5,0 ^b	95,0 ^a	0,0 ^a
	70	8,3 ^b	88,4 ^{ab}	3,3 ^a	5,0 ^b	93,3 ^a	1,7 ^a	5,0 ^b	95,0 ^a	0,0 ^a
glukoza	10	6,7 ^b	91,6 ^a	1,7 ^a	6,7 ^b	93,3 ^a	0,0 ^a	6,7 ^b	93,3 ^a	0,0 ^a
	30	6,7 ^b	91,6 ^a	1,7 ^a	5,0 ^b	95,0 ^a	0,0 ^a	5,0 ^b	95,0 ^a	0,0 ^a
	50	8,3 ^b	90,0 ^a	1,7 ^a	13,3 ^{ab}	86,7 ^{ab}	0,0 ^a	3,3 ^b	96,7 ^a	0,0 ^a
	70	11,3 ^{ab}	83,7 ^{ab}	5,0 ^a	13,3 ^{ab}	83,4 ^{ab}	3,3 ^a	8,3 ^b	90,0 ^{ab}	1,7 ^a
fruktoza	10	8,3 ^b	90,0 ^a	1,7 ^a	15,0 ^a	83,3 ^{ab}	1,7 ^a	11,3 ^{ab}	88,7 ^{ab}	0,0 ^a
	30	6,7 ^b	91,6 ^a	1,7 ^a	11,3 ^{ab}	88,7 ^a	0,0 ^a	10,0 ^{ab}	90,0 ^{ab}	0,0 ^a
	50	13,3 ^a	83,4 ^{ab}	3,3 ^a	13,3 ^{ab}	83,4 ^{ab}	3,3 ^a	13,3 ^a	83,4 ^b	3,3 ^a
	70	15,0 ^a	80,0 ^b	5,0 ^a	15,0 ^a	81,7 ^b	3,3 ^a	13,3 ^a	83,4 ^b	3,3 ^a

Napomena: Vrednosti koje su označene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju ($P < 0,05$).



n, v, i - izdanci poreklom iz nodusnih reznica, terminalnih pupoljaka i vršnih reznica na MS i 1/2MS podlogama; 10S, 30S, 50S, 70S, 10D, 30D, 50D, 70D, 10F, 30F, 50F, 70F - sadržaj še era u podlogama, koncentracija (10, 30, 50 ili 70 gL⁻¹) saharoze (S), glukoze (D) i fruktoze (F)

Grafik 8 Procenat pravilno razvijenih izdanaka *D. pinifolius* na podlogama MS i 1/2MS sa razli itim sadržajem še era

Na podlogama sa fruktozom vitrifikacija je bila eša, sa porastom njene koncentracije u medijumu poveavao se i procenat vitrifikovanih izdanaka, da bi najviši procenat vitrifikacije (5%) bio na podlozi sa 70 gL⁻¹ fruktoze (nodusne reznice na MS i 1/2MS podlogama). Logisti ka regresija je pokazala da promena koncentracije šeera u medijumu i tip eksplanta imaju statisti ki zna ajan uticaj na pojavu vitrifikacije kod *D. pinifolius*, dok koncentracija MS soli nema zna ajng uticaja (tabela 92).

Tabela 91 Zna ajnost uticaja razli itih faktora na regeneraciju pravilno razvijenih izdanaka *D. pinifolius* na podlogama sa razli itom koncentracijom šeera

Faktor	Hi- kvadrat	P-vrednost
saharoza	0,0799529	0,7774
glukoza	18,8517	<u>0,0000</u>
fruktoza	54,693	<u>0,0000</u>
tip eksplanta	8,86353	<u>0,0119</u>
koncentracija MS soli	0,838458	0,3598

Tabela 92 Zna ajnost uticaja razli itih faktora na pojavu vitrifikacije kod *D. pinifolius* na podlogama sa razli itom koncentracijom šeera

Faktor	Hi- kvadrat	P-vrednost
saharoza	5,99042	<u>0,0144</u>
glukoza	9,72925	<u>0,0018</u>
fruktoza	20,1906	<u>0,0000</u>
tip eksplanta	23,3326	<u>0,0000</u>
koncentracija MS soli	1,4329	0,2313

D. giganteiformis* ssp. *kladovanus

U prethodnim eksperimentima, prilikom ispitivanja uticaja fitohormona i pH vrednosti na regeneraciju i razvoj izdanaka *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* nisu uo ene zna ajne razlike izme u MS i 1/2MS podloga, zbog ega je uticaj koncentracije i vrste še era na razvoj ovog taksona ispitan samo na 1/2MS podlogama.

Kao i kod prethodna dva ispitivana karanfila, procenat pravilno regenerisanih izdanaka niži je na podlogama koje sadrže fruktozu u odnosu na podloge sa glukozom i saharozom. Me utim, kod *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* uo lživ je i nepovoljan uticaj visoke koncentracije še era na regeneraciju izdanaka, pa je procenat regeneracije na podlogama sa 70 gL⁻¹ glukoze, saharoze ili frukoze niži u odnosu na podloge sa 10, 30 ili 50 gL⁻¹ posmatranog še era (tabela 93). Tako e, sama vrsta še era nema zna ajnog uticaja na regeneraciju eksplanata. Kod istog tipa eksplanta, procenti regeneracije na podlogama sa istom koncentracijom saharoze, glukoze ili frukoze pripadaju istoj homogenoj grupi. Štaviše, sve vrednosti dobijene na podlogama sa nižom koncentracijom še era - 10 gL⁻¹, 30 gL⁻¹ ili 50 gL⁻¹ saharoze i glukoze i 10 gL⁻¹, 30 gL⁻¹ fruktoze, se kre u od 93,3% do 96,7% i statisti ki se uopšte ne razlikuju jer kod svakog tipa eksplanta pripadaju istoj homogenoj grupi (tabela 93). Me utim, više koncentracije še era (70 gL⁻¹) uti u na smanjenje procenta pravilno regenerisanih izdanaka koje je naro ito uo lljivo na podlogama sa fruktozom. Logisti kom regresijom je pokazano da promena koncentracije saharoze, glukoze ili frukoze statisti ki zna ajno uti e na udeo normalno regenerisanih izdanaka *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*.

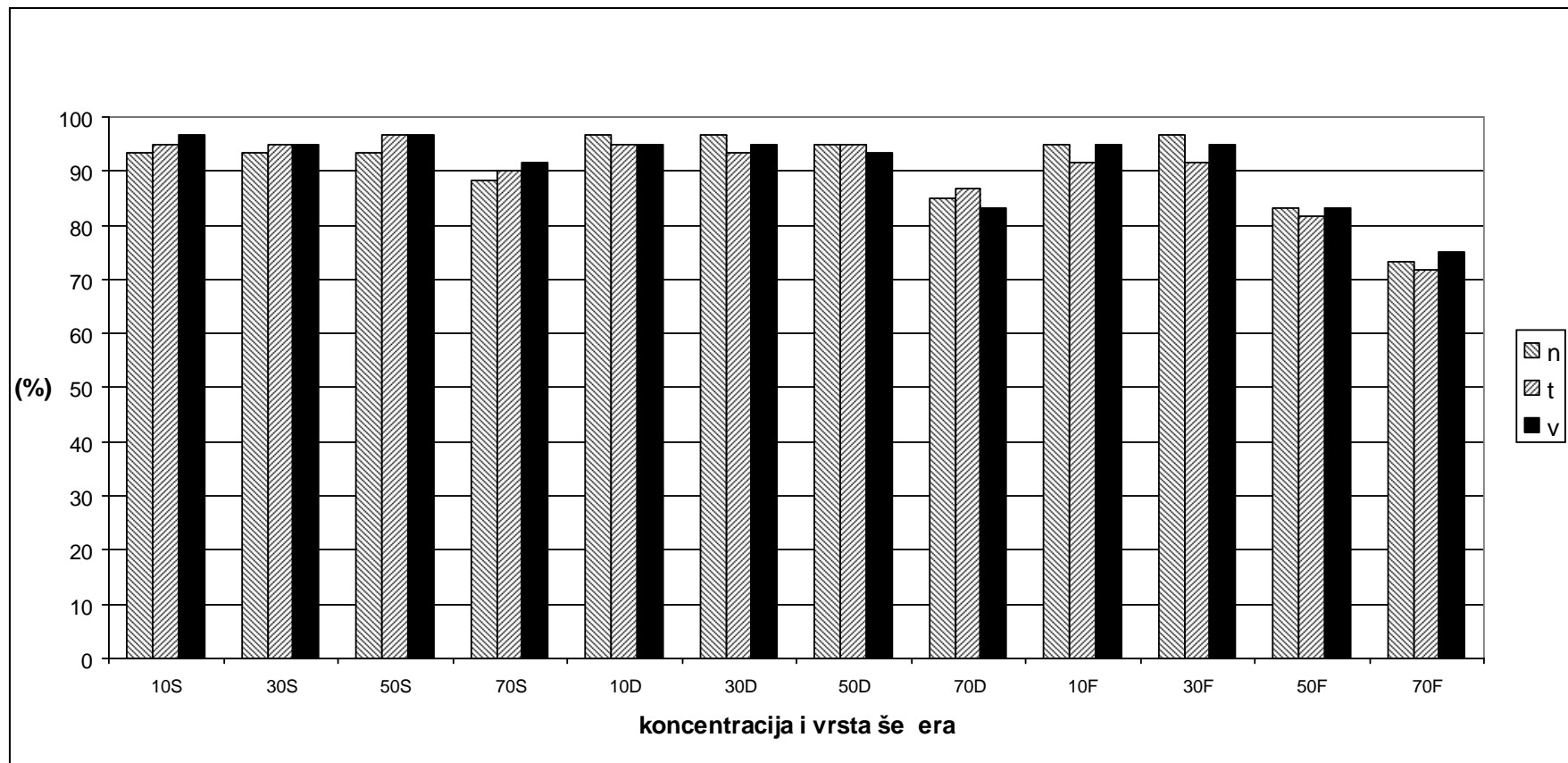
Uticaj tipa eksplanata na stepen regeneracije nije uo lživ, a razlike izme u procenata regegeneracije koriš enih tipova eksplanata na podlogama istog sastava su male (grafik 9). Nakon sprovedene multinominalne logisti ke regresije, pokazano je da na regeneraciju pravilno razvijenih izdanaka *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* tip eksplanta nema uticaj (tabela 94).

Za razliku od prethodno ispitanih taksona, *D. serotinus* i *D. pinifolius*, kod *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* pojava vitrifikacije nije zabeležena ni kod jednog tipa eksplanata, ni na jednoj podlozi, bez obzira na vrstu i koncentraciju še era (tabela 93).

Tabela 93 Vitalnost izdanaka *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* na 1/2MS podlogama sa različitom koncentracijom šećera

Vrsta šećera	Koncentracija gL ⁻¹	poreklom iz nodusnih reznica			poreklom iz terminalnih pupoljaka			poreklom iz vršnih reznica		
		nekrotirani	pravilno razvijeni	vitrifikovani	nekrotirani	pravilno razvijeni	vitrifikovani	nekrotirani	pravilno razvijeni	vitrifikovani
		%	%	%	%	%	%	%	%	%
saharoza	10	6,7 ^{bc}	93,3 ^a	0,0 ^a	5,0 ^{bc}	95,0 ^a	0,0 ^a	3,3 ^c	96,7^a	0,0 ^a
	30	6,7 ^{bc}	93,3 ^a	0,0 ^a	5,0 ^{bc}	95,0 ^a	0,0 ^a	5,0 ^c	95,0 ^a	0,0 ^a
	50	6,7 ^{bc}	93,3 ^a	0,0 ^a	3,3 ^c	96,7^a	0,0 ^a	3,3 ^c	96,7^a	0,0 ^a
	70	11,7 ^b	88,3 ^{ab}	0,0 ^a	10,0 ^{bc}	90,0 ^a	0,0 ^a	8,3 ^{bc}	91,7 ^a	0,0 ^a
glukoza	10	3,3 ^c	96,7^a	0,0 ^a	5,0 ^{bc}	95,0 ^a	0,0 ^a	5,0 ^c	95,0 ^a	0,0 ^a
	30	3,3 ^c	96,7^a	0,0 ^a	6,7 ^{bc}	93,3 ^a	0,0 ^a	5,0 ^c	95,0 ^a	0,0 ^a
	50	5,0 ^{bc}	95,0 ^a	0,0 ^a	5,0 ^{bc}	95,0 ^a	0,0 ^a	6,7 ^c	93,3 ^a	0,0 ^a
	70	15,0 ^{ab}	85,0 ^{ab}	0,0 ^a	13,3 ^b	86,7 ^{ab}	0,0 ^a	16,7 ^{ab}	83,3 ^{ab}	0,0 ^a
fruktoza	10	5,0 ^{bc}	95,0 ^a	0,0 ^a	8,3 ^{bc}	91,7 ^a	0,0 ^a	5,0 ^c	95,0 ^a	0,0 ^a
	30	3,3 ^c	96,7^a	0,0 ^a	8,3 ^{bc}	91,7 ^a	0,0 ^a	5,0 ^c	95,0 ^a	0,0 ^a
	50	16,7 ^{ab}	83,3 ^{ab}	0,0 ^a	18,3 ^{ab}	81,7 ^{ab}	0,0 ^a	16,7 ^{ab}	83,3 ^{ab}	0,0 ^a
	70	26,7 ^a	73,3 ^b	0,0 ^a	28,3 ^a	71,7 ^b	0,0 ^a	25,0 ^a	75,0 ^b	0,0 ^a

Napomena: Vrednosti koje su označene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju ($P < 0,05$).



n, v, i - izdanci poreklom iz nodusnih reznica, terminalnih pupoljaka i vršnih reznica na 1/2MS podlogama; 10S, 30S, 50S, 70S, 10D, 30D, 50D, 70D, 10F, 30F, 50F, 70F - sadržaj še era u podlogama, koncentracija (10, 30, 50 ili 70 gL⁻¹) saharoze (S), glukoze (D) i fruktoze (F)

Grafik 9 Procenat pravilno razvijenih izdanaka *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* na podlogama 1/2MS sa razli itim sadržajem še era

Tabela 94 Značajnost uticaja različitih faktora na regeneraciju izdanaka *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* na podlogama sa različitim koncentracijom šećera

Faktor	Hi- kvadrat	P-vrednost
saharoza	10,3602	<u>0,0013</u>
glukoza	22,4395	<u>0,0000</u>
fruktoza	82,0608	<u>0,0000</u>
tip eksplanata	0,416358	0,8121

4.2.3.2. Broj izdanaka

D. serotinus

Prosečan broj formiranih izdanaka, zavisno od sastava podloge i tipa eksplanata, se kod *D. serotinus* kretao od 1,0 (vršne reznice na MS podlozi sa 70 gL⁻¹ glukoze i terminalni pupoljci na MS podlozi sa 70 gL⁻¹ fruktoze) do maksimalnih 9,5 (vršne reznice na MS podlozi, ali sa 30 gL⁻¹ saharoze) (tabela 95). Kod svake vrste šećera, sa promenom koncentracije menja se i broj nodusa, a te razlike kod svakog posmatranog šećera ponaosob, kod istog tipa eksplanata jesu statistički značajne, mada su prisutna i preklapanja između u homogenih grupa (tabela 95). Maksimalne vrednosti prosečnog broja izdanaka kod svakog šećera posebno dobijene su pri koncentracijama od 30 gL⁻¹ (tabele 95 i 96).

Osim promene koncentracije jednog šećera (saharoze, glukoze ili fruktoze), na prosečan broj nodusa statistički značajno utiče i vrsta šećera koji se dodaje u podlogu (tabela 96), a same razlike naročito uoči ljuve na MS podlogama gde je najpovoljniji efekat imala saharoza, nešto slabiji glukoze, a najslabiji fruktoza (tabela 95). Na 1/2MS

podlogama razlike izme u podloga sa glukozom i fruktozom su slabije izražene, ali je i u ovom slu aju najpovoljnija za razvoj izdanaka bila saharoza.

Dodavanje še ernog alkohola sorbitola u podlogu je uslovno posmatraju i imalo pozitivan efekat jer prose an broj izdanaka na podlogama na kojima je 50% fruktoze zamenjeno sorbitolom se nije zna ajno razlikovao u odnosu na podloge samo sa fruktozom (tabela 95).

Tabela 95 Prose an broj izdanaka *D. serotinus* koji se razvio iz jednog eksplanta na MS i 1/2MS podlogama sa razli itom koncentracijom še era

Tip eksplanta	Konc.	poreklom iz nodusnih reznica		poreklom iz terminalnih pupoljaka		poreklom iz vršnih reznica	
		MS	1/2MS	MS	1/2MS	MS	1/2MS
Vrsta še era	gL ⁻¹						
saharoza	10	3,5 ^{bc}	2,4 ^{bc}	4,4 ^{bc}	3,1 ^b	2,9 ^{bc}	4,2 ^b
	30	6,2 ^a	4,1 ^a	9,1 ^a	6,9 ^a	9,5^a	6,8 ^a
	50	4,8 ^{ab}	1,8 ^{bc}	6,5 ^b	2,5 ^{bc}	6,8 ^{ab}	2,7 ^{bc}
	70	3,3 ^{bc}	1,4 ^{bc}	4,6 ^{bc}	1,5 ^c	4,4 ^b	2,6 ^{bc}
glukoza	10	3,7 ^{bc}	1,3 ^{bc}	2,7 ^{cd}	3,4 ^b	3,1 ^{bc}	3,3 ^{bc}
	30	4,3 ^{ab}	2,5 ^{abc}	5,4 ^b	3,4 ^b	7,6 ^{ab}	4,2 ^b
	50	2,7 ^{bc}	1,8 ^{bc}	3,6 ^{bcd}	2,6 ^{bc}	2,8 ^{bc}	3,0 ^{bc}
	70	1,8 ^c	1,8 ^{bc}	2,1 ^{cd}	2,2 ^{bc}	1,0 ^c	2,2 ^{bc}
fruktoza	10	1,8 ^c	1,9 ^{bc}	2,5 ^{cd}	2,1 ^{bc}	1,8 ^c	4,5 ^b
	30	2,2 ^{bc}	2,9 ^{ab}	3,4 ^{bcd}	2,7 ^{bc}	3,2 ^{bc}	5,3 ^{ab}
	50	1,6 ^c	1,6 ^{bc}	2,2 ^{cd}	1,8 ^c	2,7 ^{bc}	2,1 ^{bc}
	70	-*	1,6 ^{bc}	1,0 ^d	2,2 ^{bc}	1,3 ^c	2,4 ^{bc}
fruktoza-sorbitol	10	1,3 ^c	-	1,1 ^d	-	1,3 ^c	-
	30	3,1 ^{bc}	-	2,9 ^{cd}	-	3,8 ^b	-
	50	1,6 ^c	-	1,7 ^d	-	2,4 ^{bc}	-
	70	1,5 ^c	-	2,3 ^{cd}	-	1,7 ^c	-

*Mali broj izdanaka je bio pravilno razvijen zbog ega nije bilo mogu e izvršiti merenja

Napomena: Vrednosti koje su ozna ene istim slovom se statisti ki zna ajno ne razlikuju ($P < 0,05$).

Interesantno je da je prose an broj izdanaka koji se obrazovao iz terminalnih pupoljaka uglavnom ve i od broja koji se formirao iz nodusnih reznica iako nodusne reznice imaju dva aksilarna pupoljka (tabela 95). U pojedinim slu ajevima (npr. MS podloga sa 10 gL⁻¹ saharoze) je ak prose an broj izdanaka poreklom iz terminalnih pupoljaka viši u odnosu na prose an broj izdanaka poreklom iz vršnih reznica, što je protivno o ekivanjima jer vršne reznice imaju jedan terminalni i dva aksilarna pupoljka (tabela 95).

Analiza varijanse je pokazala da je uticaj tipa eksplanata na prose an broj izdanaka statisti ki zna ajan (tabela 96), ali je metodom najmanje zna ajne razlike utvr eno da terminalni pupoljci i vršne reznice pripadaju istoj homogenoj grupi, odnosno da razlike izme u njih u prose nom broju izdanaka nisu statisti ki zna ajne (tabela 97).

Tabela 96 Analiza varijanse za uticaj vrste še era, tipa eksplanta i koncentracije MS soli na prose an broj izdanaka *D. serotinus*

	Suma kvadrata	F-odnos	P-vrednost
OSNOVNI FAKTORI			
A: vrsta še era	152,682	29,24	<u>0,0000</u>
B: tip eksplanta	19,0753	20,09	<u>0,0000</u>
C: koncentracija MS soli	10,6568	22,45	<u>0,0001</u>
INTERAKCIJE FAKTORA			
AB	11,4114	1,09	0,4187
AC	40,1282	7,68	<u>0,0000</u>
BC	1,95528	2,06	0,1514

Tabela 97 Uticaj tipa eksplanta na broj izdanaka *D. serotinus* - metod najmanje značajne razlike

Tip eksplanta	Homogene grupe
nodusne reznice	X
terminalni pupoljci	X
vršne reznice	X

D. pinifolius

Slično kao i kod vrste *D. serotinus*, najviše vrednosti prosečnog broja izdanaka za svaku vrstu šećera ponaosob, bile su na podlogama sa 30 gL^{-1} u odnosu na druge koncentracije posmatranog šećera, dok su suviše visoke koncentracije (70 gL^{-1}) imale negativan efekat jer je na svim podlogama (sa saharozom, glukozom ili fruktozom) broj izdanaka bio znatno niži u odnosu na podloge sa 10 - 50% ispitivanog šećera (tabela 98).

Zavisno od koncentracije MS soli u podlozi javljaju se razlike u prosečnom broju izdanaka, međutim, same razlike zavise od koncentracije i vrste šećera u podlozi. Tako, pri koncentraciji 10 gL^{-1} ili 30 gL^{-1} saharoze, kod sva tri tipa eksplanata prosečan broj izdanaka je bio veći na 1/2MS podlogama, a pri istim koncentracijama glukoze ili fruktoze broj izdanaka je bio veći na MS podlogama (tabela 98).

Takođe, uopšteno posmatrajući, prosečan broj izdanaka *D. pinifolius* na MS podlogama bio je viši na podlogama sa saharozom i glukozom u odnosu na podloge sa fruktozom, dok je na 1/2MS podlogama najviši na podlogama sa saharozom, a razlike između podloga sa glukozom i fruktozom su male (tabela 98). Navedene razlike se mogu objasniti interakcijom između vrsta šećera i koncentracije MS soli u podlozi koja je statistički značajna (tabela 99).

Tabela 98 Prose an broj izdanaka *D. pinifolius* koji se razvio iz jednog eksplanta nakon 25 dana gajenja na MS i 1/2MS podlogama sa razli itom koncentracijom še era

Tip eksplanta		poreklom iz nodusnih reznica		poreklom iz terminalnih pupoljaka		poreklom iz vršnih reznica	
Vrsta še era	Konc. gL ⁻¹	MS	1/2MS	MS	1/2MS	MS	1/2MS
saharoza	10	2,2 ^b	4,5 ^{ab}	2,5 ^{bc}	5,2 ^{ab}	3,1 ^b	5,7 ^a
	30	4,1 ^a	5,2 ^a	4,8 ^{ab}	6,2^a	4,6 ^{ab}	6,1 ^a
	50	2,4 ^b	2,1 ^b	2,4 ^{bc}	3,0 ^b	5,1 ^a	4,0 ^{ab}
	70	2,5 ^b	1,5 ^{bc}	2,5 ^{bc}	2,5 ^b	3,4 ^b	3,4 ^{ab}
glukoza	10	2,8 ^b	2,3 ^b	3,1 ^b	2,6 ^b	4,3 ^{ab}	2,5 ^{bc}
	30	4,0 ^a	2,4 ^b	6,5 ^a	2,5 ^b	4,6 ^{ab}	2,7 ^{bc}
	50	3,6 ^{ab}	1,9 ^b	4,2 ^{ab}	1,7 ^{bc}	5,1 ^a	2,5 ^{bc}
	70	2,9 ^b	1,5 ^{bc}	2,7 ^{bc}	1,7 ^{bc}	2,4 ^{bc}	2,2 ^{bc}
fruktoza	10	2,5 ^b	2,0 ^b	2,2 ^{bc}	1,8 ^{bc}	2,5 ^{bc}	2,5 ^{bc}
	30	2,6 ^b	2,2 ^b	2,2 ^{bc}	1,7 ^{bc}	2,7 ^{bc}	2,6 ^{bc}
	50	1,5 ^{bc}	1,3 ^{bc}	1,4 ^c	1,4 ^{bc}	1,7 ^c	1,9 ^c
	70	1,3 ^{bc}	1,1 ^c	1,0 ^c	1,1 ^c	1,3 ^c	1,5 ^c

Napomena: Vrednosti koje su ozna ene istim slovom se statisti ki zna ajno ne razlikuju ($P < 0,05$).

Posmatraju i uticaj tipa eksplanta, u ve em broju slu ajeva je prose an broj izdanaka koji se razvio iz nodusnih reznica najmanji, nešto više izdanaka se formiralo iz terminalnih pupoljaka, a najviše iz vršnih reznica (tabela 98).

Me utim, na ve ini podloga sa fruktozom prose an broj izdanaka formiran iz nodusnih reznica je viši u odnosu na broj izdanaka obrazovan iz terminalnih pupoljaka, što je i o ekivano jer nodusne reznice imaju dva aksilarna pupoljka, pa samim tim i ve u mogu nost formiranja izdanaka. Ipak, suprotno o ekivanju, na nekim podlogama (MS podloge sa 30 gL⁻¹ saharoze ili glukoze) najve i broj izdanaka se obrazovao iz terminalnih pupoljaka u odnosu na druga dva tipa eksplanta (tabela 98).

Sam uticaj tipa eksplanta na prose an broj izdanaka *D. pinifolius* na podlogama sa razli itim sadržajem še era je statisti ki zna ajan (tabela 99), pri emu se sva tri posmatrana tipa eksplanta me usobno zna ajno razlikuju što je utvr eno metodom najmanje zna ajne razlike (tabela 100).

Tabela 99 Analiza varijanse za uticaj vrste še era, tipa eksplanta i koncentracije MS soli na prose an broj izdanaka *D. pinifolius*

OSNOVNI FAKTORI	Suma kvadrata	F-odnos	P-vrednost
A: vrsta še era	77,6049	36,98	<u>0,0000</u>
B: tip eksplanta	6,92361	18,14	<u>0,0000</u>
C: koncentracija MS soli	1,90125	9,96	<u>0,0046</u>
INTERAKCIJE FAKTORA			
AB	7,79306	1,86	0,0773
AC	30,4838	14,52	<u>0,0000</u>
BC	0,0325	0,09	0,9187

Tabela 100 Uticaj tipa eksplanta na broj izdanaka *D. pinifolius* - metod najmanje zna ajne razlike

Tip eksplanta	Homogene grupe
nodusne reznice	X
terminalni pupoljci	X
vršne reznice	X

D. giganteiformis ssp. *kladovanus*

Prose an broj izdanaka *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* bio je najviši na plogama sa 30 gL⁻¹ saharoze (2,7 - 4,0) i glukoze (3,1 - 3,6), nešto niži na podlozi sa 30 gL⁻¹ fruktoze (2,1 - 3,1) (tabela 101). Uticaj promene koncentracije še era u podlozi na broj formiranih izdanaka je bio statisti ki zna ajan, a najslabiji rezultati su dobijeni na podlogama sa visokim koncentracijama sva tri ispitivana še era (70 gL⁻¹) (tabela 101).

Tabela 101 Prose an broj izdanaka *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* koji se razvio iz jednog eksplanta na 1/2MS podlogama sa razli itom koncentracijom še era

Tip eksplanta		poreklom iz nodusnih reznica	poreklom iz terminalnih pupoljaka	poreklom iz vršnih reznica
Vrsta še era	Konc. gL ⁻¹	1/2MS	1/2MS	1/2MS
saharoza	10	2,4 ^{ab}	3,1 ^{ab}	4,2 ^a
	30	2,7 ^{ab}	4,0 ^a	3,8 ^{ab}
	50	1,8 ^b	2,6 ^{ab}	2,6 ^{ab}
	70	1,4 ^b	1,5 ^b	2,1 ^b
glukoza	10	2,6 ^{ab}	2,1 ^b	2,7 ^{ab}
	30	3,1 ^a	3,6 ^{ab}	3,4 ^{ab}
	50	2,5 ^{ab}	1,9 ^b	2,0 ^b
	70	1,6 ^b	1,1 ^b	1,5 ^b
fruktoza	10	2,5 ^{ab}	2,3 ^{ab}	2,9 ^{ab}
	30	3,1 ^a	2,5 ^{ab}	2,1 ^b
	50	2,7 ^{ab}	2,1 ^{ab}	2,7 ^{ab}
	70	2,3 ^{ab}	1,4 ^b	1,8 ^b

Napomena: Vrednosti koje su ozna ene istim slovom se statisti ki zna ajno ne razlikuju ($P < 0,05$).

Tip eksplanta nema značajnog uticaja na prosečan broj izdanaka (tabela 102). Na pojedinim podlogama, npr. na podlozi sa 10 gL^{-1} saharoze najveći broj izdanaka formirao se iz vršnih reznica, na nekim podlogama (sa 30 gL^{-1} fruktoze, npr.) je najveći broj izdanaka obrazovan iz nodusnih reznica, a na pojedinim podlogama (sa 30 gL^{-1} glukoze, npr.) je najveći broj izdanaka formiran iz terminalnih pupoljaka (tabela 101).

Tabela 102 Analiza varijanse za uticaj vrste šećera, tipa eksplanta i koncentracije MS soli na prosečan broj izdanaka *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*

	Suma kvadrata	F-odnos	P-vrednost
OSNOVNI FAKTORI			
A: vrsta šećera	14,3831	6,09	<u>0,0002</u>
B: tip eksplanta	0,633889	1,48	0,2505
INTERAKCIJE FAKTORA			
AB	7,39706	1,68	0,0983

4.2.3.3. Dužina izdanaka

D. serotinus

Na osnovu rezultata koji su prikazani u tabelama 103, 104 i 105 uočava se da vrsta šećera u podlozi, kao i njegova koncentracija imaju uticaja na dužinu izdanaka. Najduži izdanci, bez obzira na tip eksplanata iz kojih su se razvili, bili su na podlogama sa saharozom i glukozom. Pri tom je procenat dugih izdanaka visok na podlogama sa 30 i 50 gL^{-1} saharoze i glukoze, dok je na podlogama sa 10 gL^{-1} saharoze i 10 gL^{-1} glukoze prisutan manji broj izdanaka dužih od 20 mm , ali su zato izdanci dužine $10\text{-}20 \text{ mm}$ zastupljeni u velikom broju.

Izdanci formirani na 1/2MS podlogama su kraći u odnosu na izdanke koji su se razvili na MS podlogama (tabele 103, 104 i 105). Međutim, na 1/2MS podlogama, najveći broj zastupljenosti dugih izdanaka je uglavnom na onim sa najmanjom

koncentracijom ispitivanih še era (10 gL^{-1}), a zatim broj kra ih izdanaka raste istovremeno sa pove anjem koncentracije še era u podlozi.

Tabela 103 Dužina izdanaka *D. serotinus* koji su se razvili iz nodusnih reznica nakon 25 dana gajenja na MS i 1/2MS podlogama sa razli itim sadržajem še era

Vrsta še era	Konc.	Podloga					
		MS			1/2MS		
	gL^{-1}	< 10 mm (%)	10 - 20 mm (%)	>20 mm (%)	< 10 mm (%)	10 - 20 mm (%)	>20 mm (%)
saharoza	10	18,3 ^{de}	65,8 ^a	15,9 ^{cd}	44,1 ^c	32,5 ^{bc}	23,4 ^a
	30	14,7 ^e	32,5 ^b	52,8 ^a	48,3 ^c	45,2 ^b	6,5 ^b
	50	11,8 ^e	38,5 ^b	49,7 ^a	68,7 ^b	31,3 ^{bc}	0,0 ^c
	70	13,5 ^e	65,4 ^a	21,1 ^c	70,6 ^b	29,4 ^{bc}	0,0 ^c
glukoza	10	8,9 ^e	81,1 ^a	10,0 ^d	20,8 ^d	55,2 ^a	24,0 ^a
	30	15,8 ^e	47,6 ^b	36,6 ^b	35,6 ^{cd}	54,3 ^a	10,1 ^b
	50	39,4 ^d	38,5 ^b	22,1 ^c	38,7 ^c	61,3 ^a	0,0 ^c
	70	77,2 ^c	20,8 ^c	2,0 ^e	62,3 ^b	37,7 ^b	0,0 ^c
fruktoza	10	24,3 ^{de}	75,7 ^a	0,0 ^e	54,8 ^{bc}	36,1 ^b	9,1 ^b
	30	21,2 ^{de}	78,8 ^a	0,0 ^e	48,9 ^c	42,3 ^b	8,8 ^b
	50	34,8 ^d	65,2 ^a	0,0 ^e	52,9 ^c	43,7 ^b	3,4 ^{bc}
	70	-*	-	-	89,5 ^a	10,5 ^d	0,0 ^c
fruktoza- sorbitol	10	34,8 ^d	65,2 ^a	0,0 ^e	-	-	-
	30	18,9 ^{de}	81,1 ^a	0,0 ^e	-	-	-
	50	90,5 ^b	9,5 ^d	0,0 ^e	-	-	-
	70	100,0 ^a	0,0 ^e	0,0 ^e	-	-	-

*Mali broj izdanaka je bio pravilno razvijen zbog ega nije bilo mogu e izvršiti merenja

Napomena: Vrednosti koje su ozna ene istim slovom se statisti ki zna ajno ne razlikuju ($P < 0,05$).

Ipak, prisutna su odstupanja, pa tako na 1/2MS podlozi sa glukozom, najveće zastupljenost izdanaka dužih od 20 mm (32,2%) bila je na podlozi sa 10 gL⁻¹ glukoze, ali su na istoj podlozi bili i veoma brojni izdanci u kategoriji dužine do 10 mm (56,2%), za razliku od ostalih podloga sa glukozom (30, 50 i 70 gL⁻¹).

Tabela 104 Dužina izdanaka *D. serotinus* koji su se razvili iz terminalnih pupoljaka nakon 25 dana gajenja na MS i 1/2MS podlogama sa različitim sadržajem šećera

Vrsta šećera	Konc.	Podloga					
		MS			1/2MS		
	gL ⁻¹	< 10 mm (%)	10 - 20 mm (%)	>20 mm (%)	< 10 mm (%)	10 - 20 mm (%)	>20 mm (%)
saharoza	10	13,7 ^e	25,2 ^d	61,1 ^a	74,2 ^a	18,6 ^{cd}	7,2 ^b
	30	12,1 ^e	23,2 ^d	64,7 ^a	77,8 ^a	22,2 ^{cd}	0,0 ^c
	50	15,5 ^e	25,2 ^d	59,3 ^a	79,3 ^a	20,7 ^{cd}	0,0 ^c
	70	14,8 ^e	58,9 ^{ab}	26,3 ^b	72,2 ^a	27,8 ^c	0,0 ^c
glukoza	10	12,5 ^e	71,0 ^a	16,5 ^b	65,2 ^{ab}	17,3 ^{cd}	17,5 ^a
	30	10,2 ^e	28,5 ^d	61,3 ^a	51,5 ^{abc}	47,3 ^{ab}	1,2 ^b
	50	15,1 ^e	28,6 ^d	56,3 ^a	46,2 ^{abc}	52,3 ^a	1,5 ^{bc}
	70	68,3 ^c	25,3 ^d	6,4 ^c	71,5 ^a	28,5 ^c	0,0 ^c
fruktoza	10	21,8 ^e	74,7 ^a	3,5 ^{cd}	38,4 ^{bc}	61,6 ^a	0,0 ^c
	30	36,2 ^d	61,2 ^{ab}	2,6 ^{cd}	40,2 ^{bc}	59,8 ^a	0,0 ^c
	50	48,3 ^d	51,7 ^b	0,0 ^d	46,8 ^{abc}	53,2 ^a	0,0 ^c
	70	100,0 ^a	0,0 ^f	0,0 ^d	75,8 ^a	24,2 ^c	0,0 ^c
fruktoza-sorbitol	10	81,4 ^b	12,9 ^{de}	5,7 ^c	-	-	-
	30	53,8 ^{cd}	46,2 ^{bc}	0,0 ^d	-	-	-
	50	84,1 ^b	15,9 ^{de}	0,0 ^d	-	-	-
	70	90,5 ^b	9,5 ^e	0,0 ^d	-	-	-

Napomena: Vrednosti koje su označene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju ($P < 0,05$).

Posmatraju i uticaj tipa eksplanta na dužinu izdanaka, rezultati dobijeni na MS podlogama su o ekivani, odnosno, najduži izdanci su formirani iz vršnih reznica i terminalnih pupoljaka, dok je kod nodusnih reznica udeo izdanaka u dužinskoj kategoriji preko 20 mm приметно manji.

Tabela 105 Dužina izdanaka *D. serotinus* koji su se razvili iz vršnih reznica na MS i 1/2MS podlogama sa razli itom koncentracijom še era

Vrsta še era	Konc.	Podloga					
		MS			1/2MS		
	gL ⁻¹	< 10 mm (%)	10 - 20 mm (%)	>20 mm (%)	< 10 mm (%)	10 - 20 mm (%)	>20 mm (%)
saharoza	10	11,8 ^{bc}	35,4 ^d	52,8 ^b	68,6 ^{ab}	22,9 ^c	8,5 ^{bc}
	30	12,6 ^{bc}	23,5 ^{de}	63,9 ^a	65,2 ^{ab}	34,8 ^{bc}	0,0 ^d
	50	14,3 ^b	24,1 ^{de}	61,6 ^a	21,5 ^{cd}	78,5 ^a	0,0 ^d
	70	10,5 ^{bc}	39,6 ^d	49,9 ^b	28,2 ^c	71,8 ^a	0,0 ^d
glukoza	10	5,7 ^c	90,5 ^a	3,8 ^{de}	56,2 ^b	11,3 ^d	32,5 ^a
	30	4,5 ^c	25,1 ^{de}	70,4 ^a	45,8 ^{bc}	40,5 ^b	13,7 ^b
	50	7,2 ^c	28,6 ^d	64,2 ^a	32,1 ^c	67,9 ^a	0,0 ^d
	70	3,8 ^c	33,1 ^d	63,1 ^a	62,5 ^b	37,5 ^b	0,0 ^d
fruktoza	10	7,6 ^c	18,9 ^c	73,5 ^a	31,7 ^c	53,2 ^{ab}	15,1 ^b
	30	5,8 ^c	25,9 ^d	68,3 ^a	40,5 ^{bc}	42,9 ^b	16,6 ^b
	50	48,3 ^a	51,7 ^c	0,0 ^e	62,1 ^{ab}	37,9 ^b	0,0 ^d
	70	20,5 ^b	79,5 ^b	0,0 ^e	86,6 ^a	13,4 ^d	0,0 ^d
fruktoza- sorbitol	10	5,1 ^c	70,5 ^b	24,4 ^c	-	-	-
	30	14,7 ^b	55,6 ^c	29,7 ^c	-	-	-
	50	18,8 ^b	59,1 ^c	22,1 ^c	-	-	-
	70	15,3 ^b	78,9 ^b	5,8 ^d	-	-	-

Napomena: Vrednosti koje su ozna ene istim slovom se statisti ki zna ajno ne razlikuju ($P < 0,05$).

Na 1/2MS podlogama procenat izdanaka dužih od 20 mm uglavnom je veći kod nodusnih reznica u odnosu na terminalne pupoljke, ali i na ovim podlogama najveći procenat izdanaka dužih od 20 mm bio je formiran kod vršnih reznica (tabele 103, 104 i 105).

Dodavanje sorbitola u podlogu imalo je negativan uticaj na dužinu izdanaka. Ta nije, na podlogama koje su sadržale sorbitol procenat izdanaka kraćih od 10 mm je bio znatno veći u odnosu na procenat izdanaka u istoj kategoriji na podlogama samo sa fruktozom, što je naročito uočljivo kod nodusnih reznica (tabela 103). Takođe, procenat izdanaka dužih od 20 mm je bio znatno manji na podlogama sa sorbitolom u odnosu na njihov procenat na podlogama sa fruktozom bez sorbitola, što se može primetiti kod izdanaka poreklom iz terminalnih pupoljaka i vršnih reznica (tabela 103 i 104) jer se iz nodusnih reznica nisu uopšte formirali izdanci duži od 20 mm ni na podlogama samo sa fruktozom ni sa dodatkom sorbitola (tabela 103).

Izuzetak čine izdanci poreklom iz vršnih reznica na podlozi sa 50 gL^{-1} mešavine fruktoze i sorbitola, gde je procenat izdanaka dužih od 20 mm (22,1%) relativno visok u odnosu na podlogu sa 50 gL^{-1} fruktoze na kojoj nije bilo ni jednog izdanka u toj kategoriji (tabela 105).

Međutim, ako se sorbitol posmatra samo kao osmotikum, a samo fruktoza kao izvor energije, onda je adekvatnije porediti vrednosti sa podloge sa 30 gL^{-1} fruktoze (uzimajući u obzir da 50 gL^{-1} mešavine fruktoze i sorbitola sadrži 25 gL^{-1} fruktoze), a u tom slučaju se vrednosti takođe statistički značajno razlikuju, ali su razlike u korist podloga samo sa fruktozom (68,3% izdanaka dužih od 20 mm), čime se potvrđuje pretpostavka da dodavanje sorbitola ima negativno dejstvo na dužinu izdanaka *D. serotinus*.

D. pinifolius

Dok je kod *D. serotinus* bio prisutan uticaj vrste šećera i koncentracije MS mineralnih soli na dužinu izdanaka, kod *D. pinifolius* se uočava jedino uticaj koncentracije šećera u podlozi na dužinu izdanaka koji je u ovom slučaju pravilnije izražen nego kod *D. serotinus* (tabele 106, 107 i 108).

Dužina izdanaka poreklom iz nodusnih reznica i na 1/2MS podlogama i na MS podlogama se pravilno menja sa porastom koncentracije še era, pri emu je procenat dužih izdanaka najve i na podlogama sa najnižom koncentracijom posmatranog še era - saharoze, glukoze ili fruktoze (10 gL^{-1}), a zatim se sa porastom koncentracije smanjuje procenat izdanaka dužih od 20 mm i raste njihov broj u kategoriji kra ih od 10 mm (tabele 106, 107 i 108).

Tabela 106 Dužina izdanaka *D. pinifolius* koji su se razvili iz nodusnih reznica na MS i 1/2MS podlogama sa razli itom koncentracijom še era

Vrsta še era	Konc.	Podloga					
		MS			1/2MS		
	gL^{-1}	< 10 mm (%)	10 - 20 mm (%)	>20 mm (%)	< 10 mm (%)	10 - 20 mm (%)	>20 mm (%)
saharoza	10	25,8 ^d	29,0 ^{bc}	45,2 ^a	48,3 ^b	27,8 ^c	23,9 ^b
	30	39,9 ^{bc}	26,7 ^c	33,4 ^b	42,6 ^{bc}	49,1 ^a	8,3 ^c
	50	17,4 ^d	43,5 ^{ab}	39,1 ^{ab}	46,7 ^b	50,7 ^a	2,6 ^{cd}
	70	51,1 ^b	33,3 ^b	15,6 ^c	43,7 ^b	56,3 ^a	0,0 ^d
glukoza	10	35,2 ^c	31,1 ^{bc}	33,7 ^b	21,9 ^d	43,7 ^{ab}	34,4 ^a
	30	50,5 ^b	31,0 ^{bc}	18,5 ^c	35,3 ^c	29,4 ^c	35,3 ^a
	50	56,3 ^b	42,8 ^{ab}	0,9 ^d	34,8 ^c	47,8 ^a	17,4 ^b
	70	89,5 ^a	10,5 ^d	0,0 ^d	85,7 ^a	14,3 ^d	0,0 ^d
fruktoza	10	42,5 ^{bc}	38,1 ^b	19,4 ^c	44,6 ^b	37,2 ^b	18,2 ^b
	30	58,1 ^b	39,4 ^b	2,5 ^d	51,6 ^b	43,6 ^{ab}	4,8 ^{cd}
	50	43,1 ^{bc}	52,8 ^a	4,1 ^d	48,9 ^b	50,3 ^a	0,8 ^d
	70	92,6 ^a	7,4 ^d	0,0 ^d	90,1 ^a	9,9 ^d	0,0 ^d

Napomena: Vrednosti koje su ozna ene istim slovom se statisti ki zna ajno ne razlikuju ($P < 0,05$).

Dužina izdanaka poreklom iz terminalnih pupoljaka i vršnih reznica tako e se pravilno menja sa promenom koncentracije še era u podlozi, s tim da je nešto ve i broj izdanaka kra ih od 10 mm na podlogama sa 10 gL⁻¹ še era u odnosu na izdanke poreklom iz nodusnih reznica (tabele 106, 107 i 108).

Tabela 107 Dužina izdanaka *D. pinifolius* koji su se razvili iz terminalnih pupoljaka na MS i 1/2MS podlogama sa razli itom koncentracijom še era

Vrsta še era	Konc.	Podloga					
		MS			1/2MS		
	gL ⁻¹	< 10 mm (%)	10 - 20 mm (%)	>20 mm (%)	< 10 mm (%)	10 - 20 mm (%)	>20 mm (%)
saharoza	10	39,3 ^c	17,9 ^b	42,8 ^a	38,1 ^{bc}	33,9 ^b	28,0 ^b
	30	49,2 ^{bc}	21,5 ^b	29,3 ^b	27,8 ^c	35,9 ^b	36,3 ^{ab}
	50	54,9 ^b	23,5 ^b	21,6 ^b	38,9 ^b	44,4 ^{ab}	16,7 ^{bc}
	70	55,3 ^b	26,3 ^b	18,4 ^{bc}	46,4 ^b	53,6 ^a	0,0 ^e
glukoza	10	43,2 ^c	21,2 ^b	35,6 ^{ab}	19,3 ^d	45,2 ^{ab}	35,5 ^{ab}
	30	48,3 ^{bc}	30,8 ^{ab}	20,9 ^b	13,3 ^d	40,0 ^{ab}	46,7 ^a
	50	51,6 ^b	32,4 ^a	16,0 ^c	41,7 ^b	50,0 ^a	8,3 ^{cd}
	70	58,2 ^b	34,8 ^a	7,0 ^d	80,0 ^a	20,0 ^c	0,0 ^e
fruktoza	10	45,6 ^{bc}	25,3 ^b	29,1 ^b	40,3 ^b	46,2 ^a	13,5 ^c
	30	47,2 ^{bc}	36,2 ^a	16,6 ^c	34,1 ^{bc}	45,2 ^{ab}	20,7 ^b
	50	58,2 ^b	39,1 ^a	2,7 ^{de}	43,3 ^b	51,6 ^a	5,1 ^{de}
	70	78,2 ^a	21,8 ^b	0,0 ^e	84,5 ^a	15,5 ^c	0,0 ^e

Napomena: Vrednosti koje su ozna ene istim slovom se statisti ki zna ajno ne razlikuju ($P < 0,05$).

Uopšteno, na MS podlogama najduži izdanci su formirani pri koncentraciji 10 gL^{-1} posmatranih še era, a zatim se sa porastom koncentracije še era u podlozi pove ava broj izdanaka kra ih od 10 mm (tabele 106, 107 i 108). Na 1/2MS podlogama procenat izdanaka kra ih od 10 mm je najmanji na podlogama sa 30 gL^{-1} ispitivanog še era (glukoze, saharoze ili fruktoze), pa njihov broj postepeno raste sa pove anjem koncentracije še era u podlozi (50 gL^{-1} i 70 gL^{-1}).

Tabela 108 Dužina izdanaka *D. pinifolius* koji su se razvili iz vršnih reznica na MS i 1/2MS podlogama sa razli itom koncentracijom še era

Vrsta še era	Konc.	Podloga					
		MS			1/2MS		
	gL^{-1}	< 10 mm (%)	10 - 20 mm (%)	>20 mm (%)	< 10 mm (%)	10 - 20 mm (%)	>20 mm (%)
saharoza	10	26,9 ^d	21,2 ^b	51,9 ^a	38,7 ^b	32,9 ^c	28,4 ^a
	30	41,5 ^{bc}	23,2 ^b	35,3 ^b	33,2 ^{bc}	35,2 ^c	31,6 ^a
	50	54,9 ^b	23,0 ^b	22,1 ^{bc}	47,1 ^b	41,1 ^c	11,8 ^b
	70	39,7 ^c	41,2 ^a	19,1 ^c	48,3 ^b	41,4 ^c	10,3 ^b
glukoza	10	40,3 ^{bc}	26,5 ^{ab}	33,2 ^b	43,5 ^b	37,6 ^c	18,9 ^b
	30	48,7 ^{bc}	34,2 ^a	17,1 ^c	25,2 ^c	44,4 ^c	30,4 ^a
	50	51,6 ^b	36,7 ^a	11,7 ^c	35,4 ^{bc}	46,2 ^c	18,4 ^b
	70	65,9 ^{ab}	30,8 ^{ab}	3,3 ^d	62,5 ^a	37,5 ^c	0,0 ^c
fruktoza	10	32,8 ^{cd}	35,3 ^a	31,9 ^b	41,4 ^b	42,5 ^c	16,1 ^b
	30	44,1 ^{bc}	27,9 ^{ab}	28,0 ^b	38,6 ^b	41,5 ^c	19,9 ^b
	50	58,3 ^b	39,2 ^a	2,5 ^d	28,7 ^c	62,3 ^b	9,0 ^{bc}
	70	79,8 ^a	20,2 ^b	0,0 ^d	15,7 ^d	84,3 ^a	0,0 ^c

Napomena: Vrednosti koje su ozna ene istim slovom se statisti ki zna ajno ne razlikuju ($P < 0,05$).

Treba naglasiti da su razlike izme u podloga sa istom koncentracijom razli itih še era u pogledu zastupljenosti izdanaka u odgovaraju oj dužinskoj kategoriji uglavnom male (tabele 106, 107 i 108). Ipak, najviše kratkih izdanaka je formirano na podlogama sa 70 gL⁻¹ fruktoze, gde u nekim slu ajevima i nema izdanaka dužih od 20 mm (tabele 106, 107 i 108).

D. giganteiformis ssp. kladovanus

Može se uo iti da su izdanci kod *D. giganteiformis ssp. kladovanus* u celini posmatrano kra i od izdanaka druge dve vrste karanfila, odnosno da mnogo manji procenat izdanaka pripada kategoriji dužine preko 20 mm.

Tabela 109 Dužina izdanaka *D. giganteiformis ssp. kladovanus* koji su se razvili iz nodusnih reznica na 1/2MS podlogama sa razli itom koncentracijom še era

Vrsta še era	Koncentracija gL ⁻¹	Podloga		
		1/2MS		
		< 10 mm (%)	10 - 20 mm (%)	>20 mm (%)
saharoza	10	41,0 ^{bc}	38,5 ^{bc}	20,5 ^b
	30	51,2 ^b	34,8 ^c	14,0 ^c
	50	45,8 ^b	54,2 ^{ab}	0,0 ^d
	70	42,1 ^b	57,9 ^a	0,0 ^d
glukoza	10	36,2 ^c	29,8 ^c	34,0 ^a
	30	59,1 ^a	15,9 ^d	25,0 ^b
	50	53,3 ^{ab}	36,7 ^c	10,0 ^c
	70	54,5 ^{ab}	45,5 ^b	0,0 ^d
fruktoza	10	47,3 ^b	36,4 ^c	16,3 ^{bc}
	30	46,4 ^b	46,4 ^b	7,2 ^c
	50	37,5 ^c	62,5 ^a	0,0 ^d
	70	65,7 ^a	34,3 ^c	0,0 ^d

Napomena: Vrednosti koje su ozna ene istim slovom se statisti ki zna ajno ne razlikuju ($P < 0,05$)

Pravilnost koja se uoava kod vrste *D. pinifolius* u pogledu zavisnosti dužine izdanaka od koncentracije šeera u podlozi, prisutna je i kod *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* (tabele 109, 110 i 111). Drugim reima, sa porastom koncentracije šeera u podlozi poveava se i broj kratkih izdanaka (dužine do 10 mm), a smanjuje procenat izdanaka u kategoriji dužih od 20 mm.

Tabela 110 Dužina izdanaka *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* koji su se razvili iz terminalnih pupoljaka 1/2MS podlogama sa različitom koncentracijom šeera

Vrsta šeera	Koncentracija	Podloga		
		1/2MS		
	gL ⁻¹	< 10 mm (%)	10 - 20 mm (%)	>20 mm (%)
saharoza	10	38,2 ^c	43,5 ^{ab}	18,3 ^c
	30	56,0 ^b	34,5 ^b	9,5 ^d
	50	81,0 ^a	19,0 ^c	0,0 ^e
	70	83,3 ^a	16,7 ^c	0,0 ^e
glukoza	10	20,0 ^d	26,7 ^{bc}	53,3 ^a
	30	27,8 ^{cd}	41,7 ^{ab}	30,5 ^b
	50	26,3 ^{cd}	52,6 ^a	21,1 ^{bc}
	70	45,4 ^{bc}	54,6 ^a	0,0 ^e
fruktoza	10	34,9 ^c	51,5 ^a	13,6 ^c
	30	53,0 ^b	30,1 ^b	16,9 ^c
	50	48,5 ^b	42,4 ^{ab}	9,1 ^d
	70	52,9 ^b	47,1 ^a	0,0 ^e

Napomena: Vrednosti koje su označene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju ($P < 0,05$)

Posmatraju i uticaj vrste še era, najduži izdanci su formirani na podlogama sa glukozom i te razlike su uglavnom statistički značajne (tabele 109, 110 i 111). Tako, procenti izdanaka u svakoj dužinskoj kategoriji koji su se razvili iz nodusnih reznica na podlogama sa 30 gL⁻¹ saharoze i fruktoze pripadaju istim homogenim grupama, za razliku od izdanaka razvijenih na podlozi sa 30 gL⁻¹ glukoze (tabela 109). Slike razlike se javljaju i kod izdanaka poreklom iz terminalnih pupoljka i vršnih reznica, kao i na podlogama sa drugim koncentracijama ispitivanih še era, ali su slabije uočljive uz preklapanja između u homogenih grupa (tabele 109, 110 i 111).

Tabela 111 Dužina izdanaka *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* koji su se razvili iz vršnih reznica na 1/2MS podlogama sa različitim koncentracijom še era

Vrsta še era	Koncentracija	Podloga		
		1/2MS		
	gL ⁻¹	< 10 mm (%)	10 - 20 mm (%)	>20 mm (%)
saharoza	10	44,7 ^c	42,1 ^{ab}	13,2 ^d
	30	47,2 ^c	30,5 ^c	22,3 ^c
	50	83,3 ^a	16,7 ^d	0,0 ^e
	70	46,1 ^c	53,9 ^a	0,0 ^e
glukoza	10	13,5 ^e	27,9 ^c	58,6 ^a
	30	18,4 ^{de}	26,7 ^c	54,9 ^a
	50	22,5 ^d	31,8 ^c	45,7 ^b
	70	28,6 ^d	47,6 ^a	23,8 ^c
fruktoza	10	26,9 ^d	49,6 ^a	23,5 ^c
	30	25,7 ^d	16,7 ^d	57,6 ^a
	50	50,5 ^c	41,7 ^{ab}	7,8 ^d
	70	68,0 ^b	32,0 ^c	0,0 ^e

Napomena: Vrednosti koje su označene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju ($P < 0,05$)

Može se uoiti da su izdanci kod *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* u celini posmatrano kra i od izdanaka druge dve vrste karanfila, odnosno da mnogo manji procenat izdanaka pripada kategoriji dužine preko 20 mm.

4.2.3.4. Broj nodusa

D. serotinus

Najve i prose an broj nodusa formiran je na podlogama sa saharozom (tabela 112). Na podlogama sa glukozom je broj nodusa viši u odnosu na podloge sa fruktozom, ali zbog preklapanja izme u homogenih grupa dobijene razlike, iako postoje, nisu zna ajne (tabela 112).

Posmatraju i samu koncentraciju še era u podlogama, najpovoljniji rezultati, za svaku vrstu še era dobijeni su uglavnom na podlogama sa 30 gL⁻¹ odogovaraju eg še era - saharoze, glukoze ili fruktoze, dok je na podlogama sa 10 gL⁻¹ ili 50 gL⁻¹ iste vrste še era broj nodusa bio nešto manji. Najnepovoljnije su podloge sa suviše visokom koncentracijom še era (70 gL⁻¹), bez obzira koji je še er u pitanju (tabele 112 i 113).

Ve se prilikom ispitivanja uticaja balansa citokinina i auksina pokazalo da je razvoj izdanaka intenzivniji na MS podlogama, na kojima je ujedno i prose an broj nodusa po eksplantu ve i nego na 1/2MS podlogama sa istim koncentracijama hormona, kod sva tri tipa eksplanata. Takve razlike su prisutne i tokom ovih ogleda, gde se maksimalna vrednost prose nog broja nodusa kre e od 9,3 do 10,5, na MS podlogama sa 30 gL⁻¹ saharoze, zavisno od tipa eksplanta, dok maksimalna vrednost na 1/2MS podlogama, tako e sa 30 gL⁻¹ saharoze iznosi 8,4 (terminalni pupoljci) (tabela 112).

U tabelama 112 i 113 se može uoiti da tip eksplanta nema ve eg uticaja na broj nodusa koji e se formirati, odnosno uprkos prisutnim manjim razlikama prose an broj nodusa se menja kod sva tri tipa eksplanta zavisno od sadržaja i vrste še era u podlozi, tako da je na pojedinim podlogama maksimalan broj nodusa formiran kod izdanaka koji

su se razvili iz nodusnih reznica, na pojedinim podlogama kod izdanaka poreklom iz terminalnih pupoljaka, a na nekim podlogama se maksimalan broj nodusa formirao iz vršnih reznica.

Tabela 112 Prosečan broj nodusa *D. serotinus* koji se razvio iz jednog eksplanta na MS i 1/2MS podlogama sa različitim koncentracijom šećera

Tip eksplanta	Konc.	poreklom iz nodusnih reznica		poreklom iz terminalnih pupoljaka		poreklom iz vršnih reznica	
		MS	1/2MS	MS	1/2MS	MS	1/2MS
Vrsta šećera	gL ⁻¹						
saharoza	10	5,3 ^{ab}	5,1 ^a	6,8 ^{ab}	4,2 ^b	3,8 ^{bc}	5,5 ^{ab}
	30	9,8 ^a	6,4 ^a	10,5^a	8,4 ^a	9,3 ^a	7,1 ^a
	50	8,7 ^a	3,7 ^{ab}	6,3 ^{ab}	3,8 ^b	6,5 ^b	3,2 ^b
	70	4,5 ^{ab}	2,1 ^{bc}	4,7 ^b	2,7 ^{bc}	4,2 ^b	1,4 ^c
glukoza	10	4,9 ^{ab}	2,1 ^{bc}	6,7 ^{ab}	2,4 ^{bc}	5,1 ^b	3,8 ^b
	30	3,0 ^{bc}	1,7 ^c	5,1 ^{ab}	2,6 ^{bc}	6,7 ^b	3,2 ^b
	50	5,6 ^{ab}	1,2 ^c	6,2 ^{ab}	1,8 ^c	5,0 ^b	2,4 ^{bc}
	70	2,9 ^{bc}	1,0 ^c	3,6 ^{bc}	1,2 ^c	3,7 ^{bc}	1,1 ^c
fruktoza	10	1,2 ^c	1,2 ^c	1,5 ^c	1,3 ^c	1,8 ^c	1,5 ^c
	30	2,4 ^{bc}	1,3 ^c	3,0 ^{bc}	1,5 ^c	2,8 ^{bc}	2,1 ^{bc}
	50	1,9 ^c	1,1 ^c	3,8 ^{bc}	1,0 ^c	2,2 ^{bc}	1,3 ^c
	70	-*	0,0 ^d	0,7 ^c	0,3 ^c	1,0 ^c	0,8 ^c
fruktoza-sorbitol	10	1,3 ^c	-	1,5 ^c	-	1,7 ^c	-
	30	4,5 ^{ab}	-	3,9 ^{bc}	-	4,2 ^b	-
	50	3,3 ^{bc}	-	2,5 ^{bc}	-	2,7 ^{bc}	-
	70	2,3 ^{bc}	-	2,1 ^{bc}	-	1,8 ^c	-

Napomena: Vrednosti koje su označene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju ($P < 0,05$)

Interesantno je primetiti da je dodavanje sorbitola u podlogu imalo pozitivan efekat na povećanje broja nodusa u odnosu na podloge koje sadrže samo fruktozu (tabela 112), što se nije odrazilo s obzirom da je ispoljio negativan uticaj na dužinu izdanaka ove vrste. Međutim, iako su zabeležene više vrednosti na podlogama sa sorbitolom, zbog preklapanja izmeđ u homogenih grupa, razlike u odnosu na podloge samo sa fruktozom uglavnom nisu statistički značajne (tabela 112).

D. pinifolius

Kod *D. pinifolius* povoljan efekat na broj nodusa imale su podloge sa saharozom i glukozom, u nekim slučajevima su više vrednosti zabeležene na podlogama sa glukozom (tabela 113). Prosečne vrednosti broja nodusa na podlogama sa saharozom i podlogama sa istim koncentracijama glukoze se uglavnom statistički značajno ne razlikuju, izuzev 1/2MS podloge sa 10 gL⁻¹ saharoze na kojoj su kod sva tri tipa eksplanata zabeležene znatno više vrednosti u odnosu na ostale 1/2MS i MS podloge (tabela 113).

Vrednosti prosečnog broja nodusa na podlogama sa fruktozom su nešto manje, ali za sva tri tipa šećera (saharozu, glukozu ili fruktozu) maksimalan prosečan broj nodusa je uglavnom na podlogama sa 30 gL⁻¹ odgovarajućeg šećera, izuzev 1/2MS podloge sa 10 gL⁻¹ saharoze (tabele 113 i 114).

Posmatrajući i tip eksplanata, uočava se da postoje razlike u broju nodusa, ali ne postoji pravilnost koja ide u prilog određenom tipu reznica (tabela 113). Na primer, na MS podlogama sa saharozom, prosečan broj nodusa je najveći kada su kao eksplanti korišćene vršne reznice, na nekim podlogama (50 gL⁻¹ saharoze) gotovo dva puta veći nego kada su eksplanti bili vršne ili nodusne reznice (tabela 113). Međutim, na MS podlogama sa glukozom razlika u broju nodusa koji su formirani gajenjem vršnih reznica i terminalnih pupoljaka gotovo je zanemarljiva, ali su u oba slučajeva dobijene vrednosti znatno veće od prosečnog broja nodusa formiranog kod nodusnih reznica.

Na podlogama sa fruktozom, razlika između tipova eksplanata gotovo da nema.

Tabela 113 Prose an broj nodusa *D. pinifolius* koji se razvio iz jednog eksplanta na MS i 1/2MS podlogama sa razli itom koncentracijom še era

Tip eksplanta	Konc.	poreklom iz nodusnih reznica		poreklom iz terminalnih pupoljaka		poreklom iz vršnih reznica	
		MS	1/2MS	MS	1/2MS	MS	1/2MS
Vrsta še era	gL ⁻¹	MS	1/2MS	MS	1/2MS	MS	1/2MS
saharoza	10	4,0 ^{ab}	5,3 ^a	3,3 ^b	7,6 ^a	4,5 ^{ab}	8,5^a
	30	4,9 ^a	1,4 ^c	4,2 ^{ab}	2,4 ^{bc}	6,7 ^a	3,0 ^b
	50	3,4 ^{ab}	1,2 ^c	2,7 ^{bc}	1,8 ^c	5,2 ^{ab}	2,5 ^{bc}
	70	2,4 ^{bc}	1,0 ^c	2,5 ^{bc}	1,4 ^c	4,3 ^{ab}	2,1 ^{bc}
glukoza	10	3,2 ^{ab}	2,4 ^{bc}	4,9 ^{ab}	2,9 ^b	4,5 ^{ab}	4,0 ^b
	30	4,5 ^{ab}	3,0 ^{bc}	5,6 ^a	3,7 ^b	6,4 ^a	3,1 ^b
	50	3,8 ^{ab}	2,6 ^{bc}	5,1 ^a	1,6 ^c	4,7 ^{ab}	3,8 ^b
	70	2,4 ^{bc}	1,1 ^c	2,8 ^{bc}	1,0 ^c	2,5 ^{bc}	1,4 ^c
fruktoza	10	2,9 ^b	2,7 ^{bc}	3,7 ^b	3,4 ^b	3,3 ^b	3,0 ^b
	30	4,4 ^{ab}	3,8 ^{ab}	3,6 ^b	2,7 ^{bc}	4,1 ^b	3,2 ^b
	50	2,2 ^{bc}	2,0 ^{bc}	2,4 ^{bc}	1,6 ^c	3,0 ^b	2,1 ^{bc}
	70	1,6 ^c	1,2 ^c	1,8 ^c	1,1 ^c	2,4 ^{bc}	1,5 ^c

Napomena: Vrednosti koje su ozna ene istim slovom se statisti ki zna ajno ne razlikuju ($P < 0,05$)

Sli ne pravilnosti postoje i na 1/2MS podlogama, ali ima i razlika. Pre svega, broj nodusa na 1/2MS podlogama je niži nego na MS podlogama. Vrednosti prose nog broja nodusa na MS podlogama su se uglavnom kretale u intervalu između 3 i 7 (tabela 113), dok na 1/2MS podlogama ne prelaze 4, sa izuzetkom podloge sa 10 gL⁻¹ saharoze (tabela 113). U tom smislu se uo ava da se uticaj same koncentracije še era u 1/2MS podlogama nešto razlikuje od uticaja na MS podlogama. Pre svega, uo ljiivo je odstupanje na podlozi sa 10 gL⁻¹ saharoze gde su vrednosti prose nog broja nodusa ne samo 2-5 puta više nego na ostalim 1/2MS podlogama, ve su zna ajno više i u odnosu na vrednosti dobijene na MS podlogama.

Posmatraju i 1/2MS podloge sa glukozom i fruktozom, prime uje se uticaj koncentracije še era na prose an broj nodusa kod istog tipa eksplanta koji je slabo izražen, odnosno vrednosti prose nog broja nodusa na podlogama sa razli itom koncentracijom še era (10 gL⁻¹, 30 gL⁻¹ i 50 gL⁻¹) se manje me usobno razlikuju nego što je to bio slu aj na MS podlogama (tabela 113).

Uticaj tipa eksplanta na podlogama sa saharozom je ostao nepromenjen u odnosu na MS podloge, odnosno, najve i broj nodusa se formirao gajenjem vršnih reznica, manji gajenjem terminalnih pupoljaka dok je kod nodusnih reznica prose an broj nodusa bio najmanji (tabela 113). Razlike na podlogama sa glukozom i fruktozom, posmatrano u odnosu na tip eksplanta nisu izražene ni na 1/2MS podlogama.

D. giganteiformis ssp. kladovanus

Na podlogama sa glukozom i fruktozom prose an broj nodusa se kretao u rasponu izme u 1 i 3, na podlogama sa saharozom nije bio niži od 2, a najpovoljniji efekat je imala podloga sa 30 gL⁻¹ saharoze, na kojoj je prose an broj nodusa bio najviši, gde se gajenjem vršnih reznica formiralo prose no 8,7 nodusa, gajenjem terminalnih pupoljaka 4,0 nodusa, a nodusnih reznica 5,1, što zna ajno premašuje vrednosti dobijene na ostalim podlogama (tabela 114).

Ipak, posmatraju i podloge sa drugim koncentracijama saharoze (10 gL⁻¹, 50 gL⁻¹ i 70 gL⁻¹), sa glukozom ili sa 10 gL⁻¹ fruktoze ne mogu se uo iti zna ajnije razlike u broju nodusa zavisno od vrste i koncentracije še era (tabela 114), što potvr uju i preklapanja izme u homogenih grupa (tabela 114). Me utim, na podlogama sa glukozom i fruktozom prime uje se postepeno opadanje prose nog broja nodusa sa pove anjem koncentracije še era u podlozi (tabela 114).

Uticaj tipa eksplanata u lživ je jedino na podlogama sa saharozom, pri emu je najviši prose an broj nodusa formiran kod vršnih reznica, zatim kod nodusnih, a najmanji gajenjem terminalnih pupoljaka, pri svim ispitivanim koncentracijama saharoze (tabela 114). Na podlogama sa glukozom i fruktozom razlike u broju nodusa

su slabo izražene i ne postoji pravilna razlika između tipova eksplanata, već su u nekim slučajevima maksimalni rezultati dobijeni kod vršnih reznica, u pojedinim slučajevima kod nodusnih, a npr. na podlozi sa 70 gL^{-1} fruktoze maksimalan broj nodusa se formirao iz terminalnih pupoljaka (tabela 114).

Tabela 114 Prosečan broj nodusa *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* koji se razvio iz jednog eksplanata na 1/2MS podlogama sa različitim koncentracijom šećera

Tip eksplanata	Konc.	poreklom iz nodusnih reznica	poreklom iz terminalnih pupoljaka	poreklom iz vršnih reznica
Vrsta šećera	gL^{-1}	1/2MS	1/2MS	1/2MS
saharoza	10	3,8 ^{ab}	3,2 ^{ab}	4,0 ^b
	30	5,1 ^a	4,0 ^a	8,7^a
	50	2,7 ^{ab}	2,0 ^{abc}	4,3 ^b
	70	2,2 ^{bc}	2,1 ^{abc}	3,0 ^{bc}
glukoza	10	2,7 ^{ab}	3,3 ^{ab}	3,2 ^{bc}
	30	1,6 ^{bc}	2,7 ^{ab}	3,1 ^{bc}
	50	1,4 ^{bc}	2,2 ^{abc}	2,5 ^{bc}
	70	1,4 ^{bc}	1,3 ^{bc}	2,0 ^{bc}
fruktoza	10	2,1 ^{bc}	3,3 ^{ab}	4,1 ^b
	30	1,8 ^{bc}	1,8 ^{bc}	1,9 ^{bc}
	50	1,1 ^{bc}	1,3 ^{bc}	1,6 ^{bc}
	70	0,5 ^c	1,5 ^{bc}	1,0 ^c

Napomena: Vrednosti koje su označene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju ($P < 0,05$)

4.2.3.5. Promena pH vrednosti podloge nakon autoklaviranja i gajenja kulture

Kao što se prema navodima Thorpe et al. (2008) moglo očekivati, autoklaviranjem se snižava pH vrednost podloge, koja se kasnije naknadno menja selektivnim usvajanjem različitih jona iz podloge od strane biljke koja se gaji *in vitro*, što su potvrdila i naša istraživanja (tabela 115).

Na opadanje pH vrednosti podloge uticali su i tip šeera i njegova koncentracija. Podloge sa fruktozom, odnosno mešavinom fruktoze i sorbitola su nakon autoklaviranja bile kiselije od podloga koje su sadržale saharozu ili glukozu. Meutim, dodavanje sorbitola nije samo imalo uticaja na smanjenje kiselosti podloge nakon autoklaviranja, veje uticalo i na usvajanje jona iz podloge kojim se naknadno tokom gajenja kulture menja pH vrednost medijuma. Prvo, uo ljiivo je da sa poveanjem koncentracije fruktoze u podlozi opada njena pH vrednost nakon autoklaviranja, a zatim nakon 25 dana gajenja kultura pH vrednost neznatno raste (tabela 115).

Dodavanjem mešavine sorbitola i fruktoze pH vrednost opada, ali je viša u odnosu na podloge samo sa fruktozom, da bi se nakon 25 dana gajenja *in vitro* kulture dodatno smanjila, ali ne spuštaju i se ispod 4,2 (tabela 115). To vodi ka pretpostavci da je prisustvo sorbitola uticalo na selektivno usvajanje jona iz podloge na druga lji na in nego kada je u podlogu bila dodata samo fruktoza.

S obzirom na to da je poznato da dodavanje fruktoze u medijum (Owen et al., 1991) zna ajno snižava njegovu pH vrednost nakon autoklaviranja, i da je evidentna pravilnost opadanja pH vrednosti sa poveanjem koncentracije fruktoze (tabela 115) može se pretpostaviti da je i kod podloga sa mešavinom sorbitola i fruktoze prisustvo same fruktoze uticalno na isti na in na smanjenje pH vrednosti. Meutim, u tom sluaju je dodavanje sorbitola imalo uticaja na poveanje pH, jer npr. podloga sa 30 gL⁻¹ mešavine sorbitola i fruktoze koja sadrži oko 15 gL⁻¹ fruktoze ima višu pH vrednost nakon autoklaviranja (4,8) nego podloga koja sadrži samo fruktozu u koncentraciji 10 gL⁻¹ (4,2).

Posmatraju i ostale ispitivane šeere, saharozu i glukozu, dobijeni su o ekivani rezultati, odnosno što je vea koncentracija šeera bila u podlozi, to je pH vrednost više opala nakon autoklaviranja. Podloge sa saharozom su imale pH vrednost od 5,0 do 5,6, a sa glukozom od 4,4 do 5,4 (tabela 115). Ovakvi rezultati otvaraju novi ugao sagledavanja podataka dobijenih tokom analize uticaja vrste i koncentracije šeera na razvoj kultura ispitanih taksona, jer dobijene razlike mogu biti posledica reakcije biljne kulture na razliitu, odnosno nisku pH vrednost podloge.

Za razliku od podloga sa fruktozom, nakon 25 dana gajenja kulture, pH vrednost podloga sa saharozom i glukozom je dodatno opala (tabela 115).

Tabela 115 Promena pH vrednosti MS podloge nakon autoklaviranja i nakon 25 dana gajenja eksplanata vrste *D. serotinus*

Vrsta še era	Koncentracija gL ⁻¹	pH pre autoklaviranja	pH nakon autoklaviranja	pH nakon 25 dana gajenja kulture
saharoza	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
glukoza	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	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	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

Napomena: Vrednosti koje su označene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju ($P < 0,05$)

U tom smislu, precizan uticaj vrste i koncentracije šeera na razvoj izdanaka u fazi multiplikacije bi se dobio ukoliko je pH vrednost podloga nakon autoklaviranja jednaka, ali u praktičnom smislu takvi podaci nisu previše značajni. To znači da bi eventualno povoljniji razvoj izdanaka možda bio na podlogama sa fruktozom ukoliko bi pH vrednost pre autoklaviranja bila podešena na 7,0, na primer umesto na 6,3, ali kako su više nego zadovoljavaju i rezultati postignuti na podlogama sa saharozom i glukozom, takava istraživanja bi bila suvišna.

4.3. FAZA OŽILJAVANJA ISPITANIH TAKSONA

Kao što je navedeno u poglavlju "Materijal i metod rada" ožiljavanje je obavljeno u uslovima *in vitro*, na hranljivim podlogama 1/2 MS i MS, sa NAA u koncentraciji 0,27 - 2,68 μM i bez hormona (slika 17) kao i na podlogama bez agara sa peskom (slika 18) i perlitom (slika 19) kao potpornim komponentama.



Slika 17 Ožiljavanje vršnih reznica sa 1-3 nodusa (levo) i nodusnih reznica (desno) *D. serotinus* na medijumu sa agarom



Slika 18 Ožiljavanje vršnih reznica sa 4-6 nodusa *D. serotinus* na podlozi sa peskom



Slika 19 Ožiljavanje vršnih reznica sa 4-6 nodusa *D. serotinus* na podlozi sa perlitom

4.3.1. OŽILJAVANJE NA PODLOGAMA SA AGAROM

4.3.1.1. Procenat ožiljavanja

D. serotinus

Ožiljavanje eksplanata *D. serotinus* je bilo relativno slabo, u velikom broju sluajeva procenat ožiljenih eksplanata bio je niži od 50% (tabela 116). Uo lživ je znatan uticaj tipa eksplanta na ožiljavanje, pri emu su se u ve em procentu, na nekim podlogama i dvostruko ve em, ožiljavale nodusne reznice i terminalni pupoljci nego vršne reznice (tabela 116). Zna ajnost uticaja tipa eksplanta na procenat ožiljavanja potvr ena je i multinominalnom logisti kom regresijom (tabela 117). Tokom ožiljavanja iz aksilarnih pupoljaka nodusnih reznica i iz terminalnih pupoljaka razvili su se izdanci dužine 2-5cm.

Tabela 116 Procenat ožiljavanja eksplanata *D. serotinus* na podlogama sa razli itim sadržajem NAA

Tip eksplanata	Osnovna podloga	nodusne reznice	terminalni pupoljci	vršne reznice sa 1 - 3 nodusa	vršne reznice sa 4 - 6 nodusa
NAA (μ M)		%	%	%	%
0,0	MS	46,7 ^c	45,0 ^c	28,3 ^{cd}	25,0 ^d
0,27	MS	40,0 ^c	41,7 ^c	23,3 ^d	26,8 ^d
0,54	MS	53,4 ^{bc}	51,7 ^{bc}	38,3 ^c	35,0 ^{cd}
2,68	MS	81,7 ^a	80,0 ^a	68,3 ^{ab}	65,0 ^{ab}
0,0	1/2MS	56,7 ^{bc}	55,0 ^{bc}	35,0 ^c	26,7 ^d
0,27	1/2MS	51,7 ^{bc}	55,0 ^{bc}	36,7 ^c	33,4 ^{cd}
0,54	1/2MS	68,3 ^b	67,0 ^b	48,4 ^{bc}	41,7 ^c
2,68	1/2MS	85,0 ^a	86,7^a	76,7 ^a	75,0 ^a

Napomena: Vrednosti koje su ozna ene istim slovom se statisti ki zna ajno ne razlikuju ($P < 0,05$)

Pored tipa eksplanta, na ožiljavanje je zna ajno uticalo i prisustvo NAA u medijumu (tabela 117), a procenat ožiljenih izdanaka se pove avao sa pove anjem koncentracije NAA u podlozi, da bi najve u vrednost dostigao na podlogama sa 2,68 μ M NAA, od 65% do 85% zavisno od tipa eksplanta i koncentracije MS soli u podlozi (tabela 116).

Tabela 117 Zna ajnost uticaja razli itih faktora na ožiljavanje eksplanata *D. serotinus* na podlogama sa razli itim sadržajem NAA

Faktor	Hi- kvadrat	P-vrednost
NAA	7,77335	<u>0,0053</u>
koncentracija MS soli	1,68273	<u>0,0387</u>
tip eksplanta	34,9502	<u>0,0000</u>
NAA \times koncentracija MS soli	0,020922	0,8850
NAA \times tip eksplanta	0,299383	0,9601
tip eksplanta \times koncentracija MS soli	0,692205	0,8750

U tabeli 116 mogu se uoiti razlike u procentu ožiljavanja na podlogama sa razli itom koncentracijom MS soli, ali su prisutna preklapanja izme u homogenih grupa. Me utim, pri istoj koncentraciji NAA, kod istog tipa eksplanata, procenat ožiljavanja je uvek viši na 1/2MS podlogama nego na MS podlogama (tabela 116), i nakon sprovedene logisti ke regresije utvr eno je da uticaj koncentracije MS soli u podlozi jeste statisti ki zna ajan (tabela 117).

D. pinifolius

Za razliku od *D. serotinus*, ožiljavanje eksplanata *D. pinifolius* je bilo uspešnije i procenat ožiljavanja na svim podlogama se kretao u granicama od 75,0% do 96,7% (tabela 118).

Tabela 118 Procenat ožiljavanja eksplanata *D. pinifolius* na podlogama sa razli itim sadržajem NAA

Tip eksplanata	Osnovna podloga	nodusne reznice	terminalni pupoljci	vršne reznice sa 1 - 3 nodusa	vršne reznice sa 4 - 6 nodusa
NAA (μ M)		%	%	%	%
0,0	MS	83,3 ^{ab}	86,7 ^{ab}	88,3 ^{ab}	88,3 ^{ab}
0,27	MS	88,3 ^a	85,0 ^{ab}	86,7 ^{ab}	91,7 ^a
0,54	MS	90,0 ^a	91,7 ^a	95,0 ^a	95,0 ^a
2,68	MS	95,0 ^a	96,7^a	96,7^a	95,0 ^a
0,0	1/2MS	76,7 ^b	75,0 ^b	78,4 ^b	76,7 ^b
0,27	1/2MS	78,4 ^b	76,7 ^b	78,4 ^b	78,4 ^b
0,54	1/2MS	81,7 ^{ab}	76,7 ^b	83,4 ^b	85,0 ^{ab}
2,68	1/2MS	80,0 ^{ab}	81,7 ^b	85,0 ^{ab}	86,7 ^{ab}

Napomena: Vrednosti koje su ozna ene istim slovom se statisti ki zna ajno ne razlikuju ($P < 0,05$)

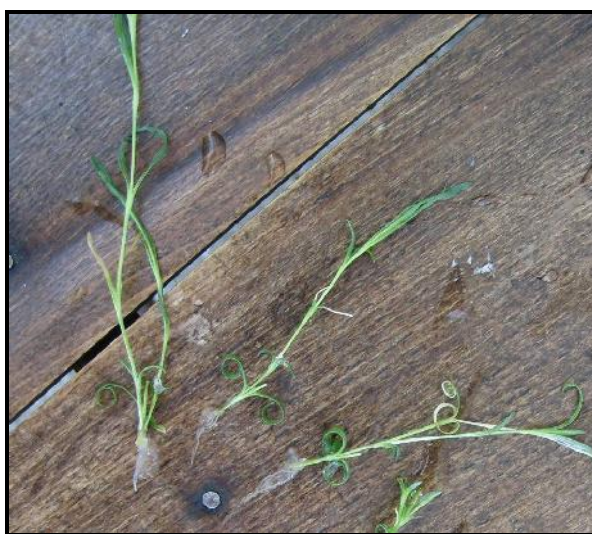
Uticaj koncentracije MS soli u podlozi je uo lživ, ali kod *D. pinifolius* povoljnije su bile podloge sa MS koncentracijom soli, gde je procenat ožiljavanja bio primetno viši (88,3 - 96,7%) na MS podlogama, nego na podlogama sa upola manjom koncentracijom MS soli (75,0-86,7%) (tabela 118).

Zna ajnost uticaja koncentracije soli u podlozi na ožiljavanje eksplanata *D. pinifolius* potvrdila je i sprovedena logisti ka regresija (tabela 119).

U tabeli 118 se može uo iti blago pove anje procenta ožiljenih eksplantata sa pove anjem koncentracije NAA u podlozi. Me utim, postoje e razlike su uglavnom male i kod istog tipa eksplanta, pri istoj koncentraciji MS soli, dobijene vrednosti esto pripadaju istoj homogenoj grupi zbog ega možemo smatrati da je uticaj koncentracije NAA na procenat ožiljavanja eksplanata *D. pinifolius* mali, a logisti kom regresijom je pokazano da nije ni statisti ki zna ajan (tabela 119).

Uspešnost ožiljavanja nije zavisila ni od tipa eksplanta kao što je to bio slu aj kod *D. serotinus*, jer su razlike na istoj hranljivoj podlozi u procentu ožiljavanja izme u nodusnih reznica, terminalnih pupoljaka i izdanaka sa razli itim brojem nodusa male (tabela 118) i nisu statisti ki zna ajne (tabela 119).

Sli no kao i kod *D. serotinus*, tokom ožiljavanja nodusnih reznica iz aksilarnih pupoljaka su se razvili izdanci, tako da su ožiljene bilj ice imale jedan ili dva izdanka dužine obi no u rasponu 5 - 8 cm (slika 20).



Slika 20 Ožiljene nodusne reznice *D. pinifolius*

Tabela 119 Značajnost uticaja različitih faktora na ožiljavanje eksplanata *D. pinifolius* na podlogama sa različitim sadržajem NAA

Faktor	Hi- kvadrat	P-vrednost
NAA	3,46287	0,0628
koncentracija MS soli	7,28956	<u>0,0069</u>
tip eksplanta	1,12243	0,7717
NAA × koncentracija MS soli	4,45835	<u>0,0347</u>
NAA × tip eksplanta	0,40061	0,9401
tip eksplanta × koncentracija MS soli	0,571037	0,9030

D. giganteiformis ssp. kladovanus

Eksplanti *D. giganteiformis ssp. kladovanus* su se ožilili u visokom procentu, a procenat ožiljavanja se kretao od 70,0% do 96,7% (tabela 120). U tabeli 120 uočljive su razlike između 1/2MS i MS podloga i te razlike su statistički značajne (tabela 121).

Procenat ožiljavanja je bio viši na 1/2MS podlogama od 73,4% do 96,7% dok na MS podlogama nije prelazio 77% (tabela 120). Međutim, koncentracija NAA u podlogama nije imala uticaja na ožiljavanje (tabela 121). Razlike u procentu ožiljavanja posmatrano kod istog tipa eksplanta su male i nisu statistički značajne (tabela 120).

Uticaj tipa eksplanta je izražen, pa tako procenat ožiljavanja nodusnih reznica na 1/2MS podlogama bio je od 75,0% do 76,7%, terminalnih pupoljaka 85,0 - 88,3%, vršnih reznica sa 1 - 3 nodusa 91,7 - 95,0%, a vršnih reznica sa 4 - 6 nodusa je najviši i iznosio je 93,4 - 96,7% (tabela 120). Zbog toga, bilo je i očekivano da multipla

logisti ka regresija potvrdi statisti ku zna ajnost uticaja tipa eksplanta na procenat ožiljavanja *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* (tabela 121).

Tabela 120 Procenat ožiljavanja eksplanata *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* na podlogama sa razli itim sadržajem NAA

Tip eksplanata	Osnovna podloga	nodusne reznice	terminalni pupoljci	vršne reznice sa 1 - 3 nodusa	vršne reznice sa 4 - 6 nodusa
NAA (μM)		%	%	%	%
0,0	MS	70,0 ^a	71,7 ^b	73,4 ^b	71,7 ^b
0,27	MS	71,7 ^a	70,0 ^b	73,4 ^b	75,0 ^b
0,54	MS	71,7 ^a	73,4 ^{ab}	75,0 ^b	71,7 ^b
2,68	MS	73,4 ^a	73,4 ^{ab}	76,7 ^b	73,4 ^b
0,0	1/2MS	75,0 ^a	86,7 ^a	93,4 ^a	95,0 ^a
0,27	1/2MS	73,4 ^a	85,0 ^a	91,7 ^a	96,7^a
0,54	1/2MS	75,0 ^a	86,7 ^a	91,7 ^a	96,7^a
2,68	1/2MS	76,7 ^a	88,3 ^a	95,0 ^a	93,4 ^a

Tabela 121 Zna ajnost uticaja razli itih faktora na ožiljavanje eksplanata *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* na podlogama sa razli itim sadržajem NAA

Faktor	Hi- kvadrat	P-vrednost
NAA	0,0008206	0,9998
koncentracija MS soli	43,3181	0,0000
tip eksplanta	44,6267	0,0000
NAA × koncentracija MS soli	0,00320855	0,9548
NAA × tip eksplanta	0,511812	0,9163
tip eksplanta × koncentracija MS soli	30,3936	0,0000

4.3.1.2. Broj korenova

D. serotinus

Prose an broj korenova koji se formirao po ožiljenoj biljici *D. serotinus* bio je od 4,0 do 21,1, zavisno od koncentracije MS soli u podlozi, koncentracije NAA i tipa eksplanata (tabela 122).

Me utim, u pogledu razlika koje se javljaju izme u tipova eksplanata nema pravilnosti, pa tako na MS podlozi sa 2,68 μ M NAA najve i prose an broj korenova se formirao ožiljavanjem vršnih reznica sa 1-3 nodusa (21,1), a najmanji ožiljavanjem nodusnih reznica (15,3); dok na 1/2 MS podlozi sa istom koncentracijom NAA (2,68 μ M) dobijeni su suprotni rezultati, odnosno najve i prose an broj korenova formiran je kod nodusnih reznica (12,6), a najmanji kod vršnih reznica sa 1-3 nodusa (10,5) (tabela 122). Samim tim, što je i o ekivano i višefaktorska analiza varijanse je pokazala da tip eksplanata zna ajno ne uti e na prose an broj korenova *D. serotinus* (tabela 123).

Tabela 122 Prose an broj korenova *D. serotinus* koji se razvio iz jednog eksplanata

NAA (μ M)	Osnovna podloga	Tip eksplanata			
		nodusne reznice	terminalni pupoljci	vršne reznice sa 1 - 3 nodusa	vršne reznice sa 4 - 6 nodusa
0,0	MS	5,5 ^b	6,3 ^{bc}	6,7 ^{bc}	6,1 ^{bc}
0,27	MS	5,8 ^b	6,0 ^{bc}	7,2 ^{bc}	6,5 ^{bc}
0,54	MS	9,4 ^{ab}	12,1 ^{ab}	13,0 ^b	10,8 ^b
2,68	MS	15,3 ^a	18,6 ^a	21,1^a	19,2 ^a
0,0	1/2MS	3,8 ^c	4,1 ^c	5,6 ^c	4,7 ^c
0,27	1/2MS	4,5 ^{bc}	4,0 ^c	5,8 ^c	5,6 ^c
0,54	1/2MS	4,7 ^{bc}	4,3 ^{bc}	6,3 ^{bc}	5,5 ^c
2,68	1/2MS	12,6 ^a	11,8 ^{ab}	10,5 ^b	13,4 ^b

Napomena: Vrednosti koje su ozna ene istim slovom se statisti ki zna ajno ne razlikuju ($P < 0,05$)

Koncentracija NAA u podlozi je značajno uticala na broj korenova, pored toga što se javljaju mala preklapanja izmeđ u homogenih grupa, razlike u prosečnom broju korenova, kod istog tipa eksplanta su statistički značajne (tabela 122).

Pored koncentracije NAA u podlozi, može se uočiti da i koncentracija MS soli ima uticaja na broj korenova, jer na podlogama sa istom koncentracijom NAA, broj korenova je uvek veći na MS podlogama nego na 1/2MS podlogama (tabela 122).

Takođe, može se primetiti da su razlike izmeđ u prosečnog broja korenova na MS podlogama primetne i zavise od koncentracije NAA, dok na 1/2MS podlogama gotovo da nema značajnih razlika izmeđ u podloga bez NAA i podloga sa 0,27 µM NAA i 0,54 µM NAA, a uočljivije razlike se javljaju tek pri koncentraciji 2,68 µM NAA (tabela 122). Zbog različitog efekta NAA na podlogama sa MS i sa 1/2MS koncentracijom soli, može se pretpostaviti da postoji interakcija izmeđ u navedena dva faktora, a analiza varijanse je pokazala da ta interakcija jeste statistički značajna (tabela 123).

Tabela 123 Analiza varijanse za uticaj sastava medijuma i tipa eksplanta na prosečan broj korenova *D. serotinus*

	Suma kvadrata	F-odnos	P-vrednost
OSNOVNI FAKTORI			
A: NAA	514,238	128,48	<u>0,0000</u>
B: tip eksplanta	14,69	3,67	0,0564
C: koncentracija MS soli	121,68	91,20	<u>0,0000</u>
INTERAKCIJE FAKTORA			
AB	3,7125	0,31	0,9524
AC	46,2425	11,55	<u>0,0019</u>
BC	7,47	1,87	0,2057

D. pinifolius

Prose an broj korenova koji se formirao ožiljavanjem razli itih eksplanata *D. pinifolius* bio je relativno visok i iznosio je od 9,3 (nodusne reznice na 1/2MS podlozi sa 0,27 μ M NAA) do 17,1 (vršne reznice sa 4 - 6 nodusa na MS podlozi sa 2,68 μ M NAA) (tabela 124).

Tabela 124 Prose an broj korenova *D. pinifolius* koji se razvio iz jednog eksplanta

NAA μ M	Osnovna podloga	Tip eksplanata			
		nodusne reznice	terminalni pupoljci	vršne reznice sa 1 - 3 nodusa	vršne reznice sa 4 - 6 nodusa
0,0	MS	15,4 ^a	16,2 ^a	14,3 ^a	13,5 ^a
0,27	MS	17,8^a	16,8 ^a	15,6 ^a	16,2 ^a
0,54	MS	15,6 ^a	15,0 ^a	15,1 ^a	16,5 ^a
2,68	MS	15,9 ^a	14,7 ^a	16,8 ^a	17,1 ^a
0,0	1/2MS	10,1 ^b	9,4 ^b	10,3 ^{ab}	9,6 ^b
0,27	1/2MS	9,3 ^b	10,1 ^b	9,8 ^{ab}	11,2 ^{ab}
0,54	1/2MS	12,4 ^{ab}	11,5 ^{ab}	11,8 ^{ab}	10,5 ^{ab}
2,68	1/2MS	11,8 ^{ab}	12,0 ^{ab}	12,5 ^a	11,5 ^{ab}

Napomena: Vrednosti koje su ozna ene istim slovom se statisti ki zna ajno ne razlikuju ($P < 0,05$)

Interesantno je primetiti da dodavanje NAA u podlogu uopšte nije imalo uticaja na broj korenova, štaviše na MS podlogama sve vrednosti, bez obzira na tip eksplanta pripadaju jednoj homogenoj grupi, odnosno uopšte ne postoje statisti ki zna ajne razlike izme u podloga sa razli itim sadržajem NAA (tabela 124).

Tako e, može se uo iti da broj korenova koji se formira u fazi *in vitro* ožiljavanja *D. pinifolius* ne zavisi ni od tipa eksplanta koji se koristi. Razlike izme u koriš enih eksplanata su male i nema pravilnosti pa su na nekim podlogama najviše vrednosti dobijene kod nodusnih reznica (npr. MS podloga bez NAA), na nekim kod terminalnih pupoljaka (npr. MS podloga sa 0,27 μ M NAA), ili kod vršnih reznica sa 2 -

3 ili 4 - 6 nodusa (tabela 124). Zbog toga je bilo ekvivalentno da višefaktorska analiza varijanse potvrdi da ni tip eksplanta ni koncentracija NAA u podlozi statistički značajno ne utiče na broj korenova koji će se formirati (tabela 125).

Međutim, u tabeli 124 može se jasno uočiti razlika između podloga sa MS i 1/2MS koncentracijom soli, na svim MS podlogama dobijene su više vrednosti nego na 1/2MS podlogama, a te razlike jesu statistički značajne (tabela 125).

Tabela 125 Analiza varijanse za uticaj sastava medijuma i tipa eksplanta na prosečan broj korenova *D. pinifolius*

	Suma kvadrata	F-odnos	P-vrednost
OSNOVNI FAKTORI			
A: NAA	12,0759	3,63	0,0578
B: tip eksplanta	0,513437	0,15	0,9242
C: koncentracija MS soli	193,553	174,58	<u>0,0000</u>
INTERAKCIJE FAKTORA			
AB	5,20031	0,52	0,8271
AC	7,80844	2,35	0,1407
BC	0,985937	0,30	0,8272

D. giganteiformis* ssp. *kladovanus

Kod *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* prosečan broj korenova je bio приметно niži nego kod *D. serotinus* i *D. pinifolius* i iznosio je na MS podlogama od minimalnih 2,9 (terminalni pupoljci na podlozi bez hormona) do 4,6 (vršne reznice sa 1-3 nodusa na podlozi sa 2,68 μ M NAA) (tabela 126). Na 1/2MS podlogama broj korenova je bio skoro dvostruko veći i bio je od 5,0 do 10,5 (tabela 126).

Tabela 126 Prose an broj korenova *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* koji se razvio iz jednog eksplanta

NAA μM	Osnovna podloga	Tip eksplanata			
		nodusne reznice	terminalni pupoljci	vršne reznice sa 1 - 3 nodusa	vršne reznice sa 4 - 6 nodusa
0,0	MS	3,1 ^b	2,9 ^c	3,2 ^b	3,1 ^b
0,27	MS	2,8 ^{bc}	3,2 ^c	3,1 ^b	3,5 ^b
0,54	MS	3,5 ^b	3,5 ^c	3,8 ^b	3,4 ^b
2,68	MS	3,8 ^b	3,3 ^c	4,6 ^b	4,2 ^b
0,0	1/2MS	5,2 ^a	5,0 ^{ab}	8,9 ^a	8,8 ^a
0,27	1/2MS	5,0 ^a	5,5 ^a	9,1 ^a	9,3 ^a
0,54	1/2MS	5,5 ^a	5,7 ^a	9,6 ^a	9,7 ^a
2,68	1/2MS	6,3 ^a	6,6 ^a	10,2 ^a	10,5^a

Napomena: Vrednosti koje su označene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju ($P < 0,05$)



Slika 21 Ožiljeni izdanci *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*

Uticaj koncentracije NAA na broj korenova koji su se formirali kod *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* je prisutan, uprkos preklapanjima izme u homogenih grupa i broj korenova se pove ava sa pove anjem koncentracije ovog hormona (tabela 126). Sprovedena analiza varijanse je potvrdila da koncentracija NAA u podlozi statis ki zna ajno uti e na broj korenova koji se formira tokom ožiljavanja ovog taksona (tabela 127).

Pored uticaja koncentracije NAA, primetne su i razlike izme u MS i 1/2MS podloga, pri emu su povoljniji rezultati dobijeni na podlogama sa nižom koncentracijom MS soli (tabela 126). Tako e, može se uo iti da broj formiranih korenova zavisi i od tipa eksplanta, ali zna ajne razlike postoje samo na 1/2MS podlogama, gde se nakon ožiljavanja vršnih reznica (slika 21) formiralo gotovo dvostruko više korenova nego kod nodusnih reznica i terminalnih pupoljaka (tabela 126).

Tabela 127 Analiza varijanse za uticaj sastava medijuma i tipa eksplanta na prose an broj korenova *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*

	Suma kvadrata	F-odnos	P-vrednost
OSNOVNI FAKTORI			
A: NAA	6,42844	43,80	<u>0,0000</u>
B: tip eksplanta	36,3534	247,69	<u>0,0000</u>
C: koncentracija MS soli	135,713	2773,97	<u>0,0000</u>
INTERAKCIJE FAKTORA			
AB	0,562813	1,28	0,3603
AC	0,290938	1,98	0,1873
BC	25,5209	173,88	<u>0,0000</u>

Višefaktorska analiza varijanse je pokazala da i koncentracija MS soli i tip eksplanta imaju statisti ki zna ajan uticaj na broj formiranih korenova, ali i da postoji interakcija izme u navedenih faktora ime se mogu objasniti razlike izme u eksplanata

koje se kao takve javljaju samo na 1/2MS podlogama (tabela 127). Pri tom, treba napomenuti da se zna ajne razlike izme u razli itih tipova eksplanata javljaju samo izme u nodusnih reznica i terminalnih pupoljaka s jedne strane i vršnih reznica (oba tipa) s druge strane (tabela 128).

Tabela 128 Uticaj tipa eksplanta na broj korenova *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* - metod najmanje zna ajne razlike

Tip eksplanta	Homogene grupe
nodusne reznice	X
terminalni pupoljci	X
vršne reznice sa 1 - 3 nodusa	X
vršne reznice sa 4 - 6 nodusa	X

4.3.1.3. Dužina najdužeg korena

D. serotinus

Dužina najdužeg korena ožiljenih bilj ica *D. serotinus* se kretala od 11,3 mm do 17,2 mm (tabela 129). Pri tom, na prose nu dužinu korena nije uticala ni sadržaj NAA u podlozi, niti koncentracija MS soli jer posmatraja i isti tip eksplanta nema statisti ki zna ajnih razlika izme u dužine korenova formiranih na podlogama razli itog sastava, štaviše, uglavnom je formirana samo jedna homogena grupa (tabela 129).

Ako se posmatra prose na dužina najdužeg korena na istoj hranljivoj podlozi, kod razli itih tipova eksplanata, može se uo iti da su razlike vrlo male, a razlika izme u najniže i najviše vrednosti gotovo da nigde ne prelazi 2 mm, kao i da nema pravilnosti u pogledu promene dužine zavisno od tipa eksplanta. Zbog toga se može zaklju iti da ni tip eksplanta nema uticaja na dužinu korenova koji se formiraju u fazi ožiljavanja *in vitro D. serotinus*.

Tabela 129 Dužina najdužeg korena ožiljenih *in vitro* biljaka *D. serotinus*

NAA μM	Osnovna podloga	Tip eksplanata			
		nodusne reznice (mm)	terminalni pupoljci (mm)	vršne reznice sa 1 - 3 nodusa (mm)	vršne reznice sa 4 - 6 nodusa (mm)
0,0	MS	17,2^a	16,5 ^a	16,8 ^a	15,7 ^a
0,27	MS	15,3 ^a	16,1 ^a	17,1 ^a	15,2 ^a
0,54	MS	14,1 ^a	15,2 ^a	14,8 ^a	16,2 ^a
2,68	MS	13,8 ^a	14,2 ^a	14,5 ^a	14,0 ^a
0,0	1/2MS	16,3 ^a	15,1 ^a	15,5 ^a	14,2 ^a
0,27	1/2MS	15,2 ^a	15,4 ^a	16,2 ^a	15,9 ^a
0,54	1/2MS	15,5 ^a	13,2 ^a	11,3 ^{ab}	15,2 ^a
2,68	1/2MS	12,8 ^a	13,8 ^a	12,8 ^{ab}	13,6 ^{ab}

Napomena: Vrednosti koje su označene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju ($P < 0,05$)

D. pinifolius

Kod *D. pinifolius* prose na dužina najdužeg korena bila je gotovo dvostruko veća nego kod *D. serotinus* i vrednosti su iznosile od 20,8 mm do 38,2 mm, zavisno od tipa eksplanata i sastava podloge (tabela 130).

Utjecaji posmatranih faktora na dužinu najdužeg korena se različito ispoljavaju. Tako, kod nodusnih reznica ni koncentracija MS soli u podlozi niti sadržaj NAA nisu imali uticaja na prosečnu dužinu najdužeg korena (20,8 - 25,1 mm), sve vrednosti su pripadale istoj homogenoj grupi (tabela 130).

Međutim, kod ostala tri tipa eksplanata statistički značajne razlike ne postoje na MS podlogama, gde se kod svakog tipa eksplanata formira jedna homogena grupa, bez obzira na prisustvo NAA, dok su na 1/2MS podlogama dobijene nešto niže vrednosti, s tim da su minimalne dužine na podlogama bez NAA, pa se zatim sa povećanjem koncentracije NAA neznatno povećava i dužina korenova, ali bez statistički značajnih

razlika (tabela 130). Zbog toga se može pretpostaviti da koncentracija MS soli u podlozi ima uticaja na dužinu korenova kod *D. pinifolius*, dok je uticaj NAA zanemarljiv.

Tabela 130 Dužina najdužeg korena ožiljenih *in vitro* biljaka *D. pinifolius*

NAA μM	Osnovna podloga	Tip eksplanata			
		nodusne reznice (mm)	terminalni pupoljci (mm)	vršne reznice sa 1 - 3 nodusa (mm)	vršne reznice sa 4 - 6 nodusa (mm)
0,0	MS	25,1 ^a	30,5 ^a	38,2 ^a	37,6 ^a
0,27	MS	20,8 ^a	28,4 ^a	36,2 ^a	37,1 ^a
0,54	MS	22,5 ^a	32,4 ^a	31,5 ^a	35,2 ^a
2,68	MS	23,5 ^a	29,6 ^a	33,5 ^a	36,8^a
0,0	1/2MS	23,5 ^a	24,5 ^{ab}	22,1 ^b	24,1 ^b
0,27	1/2MS	24,5 ^a	23,6 ^{ab}	26,4 ^{ab}	25,6 ^{ab}
0,54	1/2MS	21,8 ^a	24,1 ^{ab}	28,8 ^{ab}	26,8 ^{ab}
2,68	1/2MS	24,3 ^a	23,6 ^{ab}	27,0 ^{ab}	25,6 ^{ab}

Napomena: Vrednosti koje su označene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju ($P < 0,05$)

D. giganteiformis ssp. kladovanus

U dosada sprovedenim eksperimentima pokazano je da podloge sa nižom koncentracijom MS soli pogoduju razvoju kulture *in vitro* *D. giganteiformis ssp. kladovanus*, pa tako je i tokom ožiljavanja prose na dužina najdužeg korena bila uglavnom veća na 1/2MS podlogama nego na MS podlogama. Međutim, te razlike uglavnom nisu statistički značajne, štaviše kod nodusnih reznica i vršnih reznica sa 4 - 6 nodusa formirana je samo jedna homogena grupa, a kod terminalnih pupoljaka i vršnih reznica sa 1 - 3 nodusa formirale su se dve homogene grupe, ali se javljaju preklapanja između njih (tabela 131).

Tabela 131 Dužina najdužeg korena ožiljenih *in vitro* biljaka *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*

NAA μM	Osnovna podloga	Tip eksplanata			
		nodusne reznice (mm)	terminalni pupoljci (mm)	vršne reznice sa 1 - 3 nodusa (mm)	vršne reznice sa 4 - 6 nodusa (mm)
0,0	MS	12,1 ^a	9,5 ^{ab}	17,5 ^{ab}	19,6 ^a
0,27	MS	11,5 ^a	9,3 ^{ab}	16,2 ^{ab}	19,3 ^a
0,54	MS	10,3 ^a	8,1 ^{ab}	15,1 ^{ab}	20,5 ^a
2,68	MS	11,8 ^a	10,5 ^a	18,4 ^a	21,2 ^a
0,0	1/2MS	14,5 ^a	15,2 ^a	22,5^a	22,3 ^a
0,27	1/2MS	13,2 ^a	14,3 ^a	18,5 ^a	21,1 ^a
0,54	1/2MS	14,1 ^a	14,7 ^a	17,4 ^{ab}	18,2 ^a
2,68	1/2MS	12,8 ^a	13,1 ^a	19,0 ^a	18,8 ^a

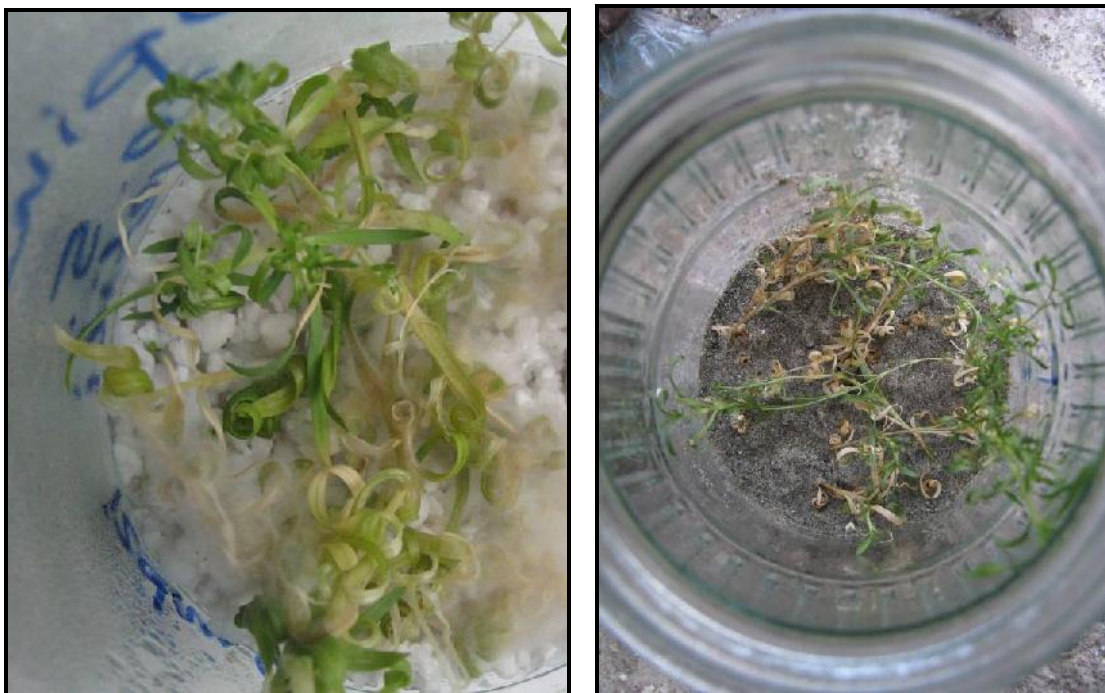
Napomena: Vrednosti koje su označene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju ($P < 0,05$)

Ipak, prilikom ožiljavanja *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*, za razliku od preostala dva ispitivana taksona, može se primetiti da tip eksplanata ima uticaja na dužinu korenova. Naime, na svim podlogama dužina korenova vršnih reznica, bez obzira na broj nodusa, veća je nego dužina korenova formiranih ožiljavanjem nodusnih reznica i terminalnih pupoljaka. Međutim, između nodusnih reznica i terminalnih pupoljaka nema značajnih razlika u dužini korenova, slično kao što se i posmatrana dva tipa vršnih reznica međusobno značajno ne razlikuju (tabela 131).

4.3.2. OŽILJAVANJE NA PODLOGAMA BEZ AGARA

Ožiljavanje na podlogama bez agara je dalo slabe rezultate i gotovo da se može tvrditi da je bilo bezuspešno. Kod sva tri karanfila zabeležen je visok procenat nekroza (slika 22) koji se javio kod više od polovine postavljenih eksplanata (od 100% do

55,6%), što nije bio slučaj prilikom ožiljavanja na podlogama sa agarom, kada pojave nekroze uopšte nije bilo, zbog čega je procenat nekrotiranih biljaka evidentiran i prikazan kao posebna kategorija (tabele 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142 i 143).



Slika 22 Eksplanti *D. pinifolius* ožiljavani u perlitu (levo) i eksplanti *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* ožiljavani u pesku (desno)

D. serotinus

Rezultati dobijeni tokom ožiljavanja na podlogama bez agara kod *D. serotinus* su bili nepovoljni. Procenat nekrotiranih nodusnih reznica i terminalnih pupoljaka, bez obzira na sastav hranljive podloge je prelazio 90% (tabele 132 i 133), dok je kod vršnih reznica sa različitim brojem nodusa procenat nekroza bio niži, ali se ipak nije spuštao ispod 65% (tabele 134 i 135).

Pored visokog procenta nekroza, jedan broj eksplanata je ostao nepromenjen, ali procenat takvih eksplanata je bio nizak, kod nodusnih reznica nije prelazio 4,4%, kod

terminalnih pupoljaka i kod vršnih reznica sa 1 - 3 nodusa na podlogama sa perlitom je bio niži od 7%, dok u ostalim slučajevima (vršne reznice sa 1 - 3 nodusa na podlogama sa peskom i vršne reznice sa 4 - 6 nodusa na svim podlogama) je bio nešto viši, ali ne prelaze i 20% (tabele 132, 133, 134 i 135).

Tabela 132 Procenat ožiljavanja nodusnih reznica *D. serotinus* na različitim podlogama

NAA μM	*Osnovna podloga	perlit			pesak		
		nekrotirane	bez promene	ožiljene	nekrotirane	bez promene	ožiljene
		%	%	%	%	%	%
0,0	MS	100,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	96,7 ^a	3,3 ^a	0,0 ^a
0,27	MS	98,9 ^a	1,1 ^a	0,0 ^a	96,7 ^a	3,3 ^a	0,0 ^a
0,54	MS	100,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	93,4 ^a	4,4 ^{ab}	2,2 ^a
2,68	MS	96,7 ^a	2,2 ^a	1,1 ^a	96,7 ^a	2,2 ^a	1,1 ^a
0,0	1/2MS	97,8 ^a	2,2 ^a	0,0 ^a	97,8 ^a	2,2 ^a	0,0 ^a
0,27	1/2MS	96,7 ^a	3,3 ^a	0,0 ^a	97,8 ^a	2,2 ^a	0,0 ^a
0,54	1/2MS	95,6 ^a	4,4 ^{ab}	0,0 ^a	96,7 ^a	3,3 ^a	0,0 ^a
2,68	1/2MS	96,7 ^a	3,3 ^a	0,0 ^a	98,9 ^a	1,1 ^a	0,0 ^a

*U podlogama MS i 1/2MS je tokom ovog eksperimenta izostavljen agar

Napomena: Vrednosti koje su označene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju ($P < 0,05$)

Procenat ožiljavanja nodusnih reznica na podlogama sa peskom ili perlitom je bio zanemarljiv (1-2%), a reznice su se ožilile jedino na supstratima sa MS koncentracijom soli i sa nešto višom koncentracijom NAA (0,54 μM ili 2,68 μM) (tabela 132). Prilikom ožiljavanja terminalnih pupoljaka, rezultati su bili još slabiji, od ukupno 720 terminalnih pupoljaka (30 pupoljaka × 3 ponavljanja × 8 tretmana) koren se formirao samo kod jednog (na MS podlozi bez agara sa peskom i sa 2,68 μM NAA) (tabela 133).

Tabela 133 Procenat ožiljavanja terminalnih pupoljaka *D. serotinus* na razli itim podlogama

NAA μM	*Osnovna podloga	perlit			pesak		
		nekrotirane	bez promene	ožiljene	nekrotirane	bez promene	ožiljene
		%	%	%	%	%	%
0,0	MS	98,9 ^a	1,1 ^a	0,0 ^a	96,7 ^a	3,3 ^a	0,0 ^a
0,27	MS	98,9 ^a	1,1 ^a	0,0 ^a	96,7 ^a	3,3 ^a	0,0 ^a
0,54	MS	97,8 ^a	2,2 ^a	0,0 ^a	95,6 ^a	4,4 ^a	0,0 ^a
2,68	MS	98,9 ^a	1,1 ^a	0,0 ^a	92,2 ^a	6,7 ^a	1,1^a
0,0	1/2MS	96,7 ^a	3,3 ^a	0,0 ^a	93,3 ^a	6,7 ^a	0,0 ^a
0,27	1/2MS	96,7 ^a	3,3 ^a	0,0 ^a	93,3 ^a	6,7 ^a	0,0 ^a
0,54	1/2MS	95,6 ^a	4,4 ^a	0,0 ^a	94,5 ^a	5,5 ^a	0,0 ^a
2,68	1/2MS	96,7 ^a	3,3 ^a	0,0 ^a	95,6 ^a	4,4 ^a	0,0 ^a

*U podlogama MS i 1/2MS je tokom ovog eksperimenta izostavljen agar

Napomena: Vrednosti koje su označene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju ($P < 0,05$)

Oba tipa vršnih reznica ožilila su se u većem procentu nego nodusne reznice i terminalni pupoljci, ali je ipak procenat veoma nizak, ispod 20% (tabele 134 i 135). Može se uočiti da je izostavljanje NAA u podlozi ili njegovo dodavanje u niskoj koncentraciji imalo nepovoljan efekat na ožiljavanje, gotovo da nije bilo ožiljenih reznica, dok vrednosti dobijene pri koncentracijama 0,54 i 2,68 μM NAA uglavnom pripadaju istoj homogenoj grupi. Maksimalan procenat ožiljavanja vršnih reznica sa 1 - 3 nodusa je iznosio 13,3% na podlogama i sa perlitom i sa peskom, sa MS koncentracijom soli i dodatkom 2,68 μM NAA (tabela 134).

Uticaj koncentracije MS soli na ožiljavanje nije izražen, pri istoj koncentraciji NAA, na podlogama sa istom potpornom komponentom, nema značajnijih razlika u procentu ožiljavanja. Procenat ožiljavanja vršnih reznica sa 4 - 6 nodusa je nešto viši u odnosu na vrednosti dobijene kod vršnih reznica sa 1 - 3 nodusa, dostižu i 23,3% na

podlozi sa perlitom i MS mineralnim rastvorom soli uz dodatak 2,68 μM NAA. Sam uticaj NAA na procenat ožiljavanja je prisutan, s tim da u ovom slu aju postoje statisti ki zna ajne razlike izme u podloga sa 2,68 μM i 0,54 μM NAA, ali samo na pri MS koncentraciji soli, dok na podlogama sa 1/2MS koncentracijom soli vrednosti dobijene pri navedenim koncentracijama NAA pripadaju istoj homogenoj grupi (tabela 135).

Tabela 134 Procenat ožiljavanja vršnih reznica sa 1 - 3 nodusa *D. serotinus* na razli itim podlogama

NAA μM	*Osnovna podloga	perlit			pesak		
		nekrotirane	bez promene	ožiljene	nekrotirane	bez promene	ožiljene
		%	%	%	%	%	%
0,0	MS	95,6 ^a	4,4 ^a	0,0 ^b	83,4 ^a	15,5 ^a	1,1 ^b
0,27	MS	95,6 ^a	4,4 ^a	0,0 ^b	85,6 ^a	13,3 ^a	1,1 ^b
0,54	MS	93,4 ^a	5,5 ^a	1,1 ^b	74,5 ^{ab}	13,3 ^a	12,2 ^a
2,68	MS	80,0 ^b	6,7 ^a	13,3^a	70,0 ^b	16,7 ^a	13,3^a
0,0	1/2MS	91,1 ^a	6,7 ^a	2,2 ^b	85,5 ^a	14,5 ^a	0,0 ^b
0,27	1/2MS	85,6 ^{ab}	5,5 ^a	8,9 ^a	88,9 ^a	11,1 ^a	0,0 ^b
0,54	1/2MS	82,3 ^{ab}	4,4 ^a	13,3^a	77,8 ^{ab}	13,3 ^a	8,9 ^a
2,68	1/2MS	82,3 ^{ab}	5,5 ^a	12,2 ^a	78,9 ^{ab}	14,4 ^a	6,7 ^a

*U podlogama MS i 1/2MS je tokom ovog eksperimenta izostavljen agar

Napomena: Vrednosti koje su ozna ene istim slovom se statisti ki zna ajno ne razlikuju ($P < 0,05$)

Uticaj potporne komponente na procenat ožiljavanja se ne može uo iti jer su razlike izme u procenta ožiljavanja na podlogama sa peskom i na podlogama sa perlitom esto male, u nekim slu ajevima procenat ožiljavanja je viši na podlogama sa perlitom, u nekim drugim, na podlogama sa peskom.

Tabela 135 Procenat ožiljavanja vršnih reznica sa 4 - 6 nodusa *D. serotinus* na razli itim podlogama

NAA μM	*Osnovna podloga	perlit			pesak		
		nekrotirane	bez promene	ožiljene	nekrotirane	bez promene	ožiljene
		%	%	%	%	%	%
0,0	MS	91,1 ^a	8,9 ^a	0,0 ^c	81,1 ^a	16,7 ^a	2,2 ^b
0,27	MS	90,0 ^a	10,0 ^a	0,0 ^c	80,0 ^a	18,9 ^a	1,1 ^b
0,54	MS	93,4 ^a	5,5 ^a	1,1 ^c	78,9 ^a	16,7 ^a	4,4 ^b
2,68	MS	65,6 ^b	11,1 ^a	23,3^a	66,6 ^{ab}	16,7 ^a	16,7 ^a
0,0	1/2MS	88,9 ^a	8,9 ^a	2,2 ^c	85,5 ^a	14,5 ^a	0,0 ^b
0,27	1/2MS	88,9 ^a	6,7 ^a	4,4 ^c	86,7 ^a	13,3 ^a	0,0 ^b
0,54	1/2MS	80,0 ^a	6,7 ^a	13,3 ^{ab}	72,3 ^{ab}	14,4 ^a	13,3 ^a
2,68	1/2MS	72,2 ^{ab}	10,0 ^a	17,8 ^a	66,7 ^{ab}	14,4 ^a	18,9 ^a

*U podlogama MS i 1/2MS je tokom ovog eksperimenta izostavljen agar

Napomena: Vrednosti koje su ozna ene istim slovom se statisti ki zna ajno ne razlikuju ($P < 0,05$)

D. pinifolius

Kod *D. pinifolius*, sli no kao i kod *D. serotinus*, procenat ožiljavanja na podlogama bez agara je bio nizak, naro ito kod nodusnih reznica i kod terminalnih pupoljaka i zavisio je od koncentracije NAA u podlozi (tabele 136 i 137). Ipak, u pore enju sa *D. serotinus*, procenat ožiljavanja kod *D. pinifolius* je bio nešto viši. Kod nodusnih reznica na MS podlozi sa peskom uz dodatak 2,68 μM NAA iznosio je 6,7%, dok na 1/2MS podlogama nije bilo ni jedne ožiljene reznice (tabela 136).

Tabela 136 Procenat ožiljavanja nodusnih reznica *D. pinifolius* na razli itim podlogama

NAA μM	*Osnovna podloga	perlit			pesak		
		nekrotirane	bez promene	ožiljene	nekrotirane	bez promene	ožiljene
		%	%	%	%	%	%
0,0	MS	96,7 ^a	3,3 ^a	0,0 ^a	96,7 ^a	3,3 ^b	0,0 ^b
0,27	MS	96,7 ^a	3,3 ^a	0,0 ^a	86,7 ^a	13,3 ^a	0,0 ^b
0,54	MS	92,3 ^a	4,4 ^a	3,3 ^a	86,6 ^a	6,7 ^{ab}	6,7^a
2,68	MS	87,8 ^a	6,7 ^a	5,5 ^{ab}	81,1 ^{ab}	12,2 ^a	6,7^a
0,0	1/2MS	97,8 ^a	2,2 ^a	0,0 ^a	93,3 ^a	6,7 ^{ab}	0,0 ^b
0,27	1/2MS	97,8 ^a	2,2 ^a	0,0 ^a	91,1 ^a	8,9 ^{ab}	0,0 ^b
0,54	1/2MS	96,7 ^a	3,3 ^a	0,0 ^a	93,3 ^a	6,7 ^{ab}	0,0 ^b
2,68	1/2MS	98,9 ^a	1,1 ^a	0,0 ^a	85,6 ^a	14,4 ^a	0,0 ^b

*U podlogama MS i 1/2MS je tokom ovog eksperimenta izostavljen agar

Napomena: Vrednosti koje su označene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju ($P < 0,05$)

Slika 23, prilikom ožiljavanja terminalnih pupoljaka, maksimalna vrednost (12,2%) je postignuta na MS podlozi sa 2,68 μM NAA, uz dodatak perlita kao potporne komponente, dok se na 1/2MS podlogama ožilio samo jedan terminalni pupoljak od postavljenih 360 (30 pupoljaka × 3 ponavljanja × 4 tretmana) (tabela 137).

U odnosu na nodusne reznice i terminalne pupoljke, ožiljavanje vršnih reznica je bilo uspešnije (slika 23). Međutim, za razliku od *D. serotinus*, ožiljavanje vršnih reznica sa 4 - 6 nodusa bilo je uspešnije, ožiljenih je bilo na svim podlogama, dok su se vršne reznice sa 1 - 3 nodusa ožilile samo na podlogama sa 2,68 μM i 0,54 μM NAA (tabela 138). Maksimalan procenat ožiljavanja vršnih reznica sa 1 - 3 nodusa postignut je pri koncentraciji NAA od 2,68 μM, bio je jednak na podlogama sa perlitom i sa peskom, i iznosio je 21,1% na MS podlogama i 12,2% na 1/2MS podlogama. Vršne reznice su se ožilile u većem procentu, na 1/2MS podlogama maksimalna vrednost je dobijena pri 2,68 μM NAA i iznosila je 21,1% (jednako na pesku i perlitu), a na MS podlogama pri istoj koncentraciji NAA, ožililo se 28,9% na perlitu i 25,5% na pesku (tabela 139).

Tabela 137 Procenat ožiljavanja terminalnih pupoljaka *D. pinifolius* na razli itim podlogama

NAA μM	*Osnovna podloga	perlit			pesak		
		nekrotirane	bez promene	ožiljene	nekrotirane	bez promene	ožiljene
		%	%				%
0,0	MS	86,7 ^a	13,3 ^a	0,0 ^b	86,7 ^a	13,3 ^a	0,0 ^b
0,27	MS	86,7 ^a	13,3 ^a	0,0 ^b	84,4 ^a	15,6 ^a	0,0 ^b
0,54	MS	82,3 ^a	14,4 ^a	3,3 ^b	83,3 ^a	10,0 ^a	6,7 ^a
2,68	MS	77,8 ^{ab}	10,0 ^a	12,2^a	80,0 ^{ab}	13,3 ^a	6,7 ^a
0,0	1/2MS	87,8 ^a	12,2 ^a	0,0 ^b	83,3 ^a	16,7 ^a	0,0 ^b
0,27	1/2MS	87,8 ^a	12,2 ^a	0,0 ^b	81,1 ^a	18,9 ^a	0,0 ^b
0,54	1/2MS	93,3 ^a	6,7 ^{ab}	0,0 ^b	93,3 ^a	6,7 ^{ab}	0,0 ^b
2,68	1/2MS	87,8 ^a	11,1 ^a	1,1 ^b	85,6 ^a	14,4 ^a	0,0 ^b

*U podlogama MS i 1/2MS je tokom ovog eksperimenta izostavljen agar

Napomena: Vrednosti koje su označene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju ($P < 0,05$)

**Slika 23** Vršne reznice ožiljene u pesku, *D. pinifolius* (levo) i *D. serotinus* (desno)

Tabela 138 Procenat ožiljavanja vršnih reznica sa 1 - 3 nodusa *D. pinifolius* na razli itim podlogama

NAA μM	Osnovna podloga	perlit			pesak		
		nekrotirane	bez promene	ožiljene	nekrotirane	bez promene	ožiljene
		%	%	%	%	%	%
0,0	MS	86,7 ^a	13,3 ^{ab}	0,0 ^b	85,6 ^a	14,4 ^{ab}	0,0 ^b
0,27	MS	86,7 ^a	13,3 ^{ab}	0,0 ^b	83,3 ^b	16,7 ^{ab}	0,0 ^b
0,54	MS	62,3 ^b	24,4 ^a	13,3 ^a	62,3 ^b	24,4 ^a	13,3 ^a
2,68	MS	60,0 ^b	18,9 ^a	21,1^a	61,7 ^b	17,2 ^{ab}	21,1^a
0,0	1/2MS	84,5 ^a	15,5 ^{ab}	0,0 ^b	84,5 ^a	15,5 ^{ab}	0,0 ^b
0,27	1/2MS	87,8 ^a	12,2 ^{ab}	0,0 ^b	87,8 ^a	12,2 ^{ab}	0,0 ^b
0,54	1/2MS	90,0 ^a	6,7 ^b	3,3 ^b	91,7 ^a	5,0 ^b	3,3 ^b
2,68	1/2MS	76,7 ^{ab}	11,1 ^{ab}	12,2 ^a	75,0 ^{ab}	12,8 ^{ab}	12,2 ^a

*U podlogama MS i 1/2MS je tokom ovog eksperimenta izostavljen agar

Napomena: Vrednosti koje su ozna ene istim slovom se statisti ki zna ajno ne razlikuju ($P < 0,05$)

Na osnovu dobijenih rezultata, možemo da zaklju imo da potporna komponenta (pesak ili perlit) nije imala uticaja na ožiljavanje eksplanata *D. pinifolius*. Uticaj koncentracije MS soli je uo lživ, ali je slabo izražen, jer iako su više vrednosti dobijane na MS podlogama, te razlike esto nisu bile statisti ki zna ajne.

Najuo lživiji je uticaj koncentracije NAA, gde je uspešnost ožiljavanja direktno zavisila od sadržaja NAA u podlogama, a najpovoljnije vrednosti su dobijene pri najvišoj koncentraciji koja je testirana (2,68 μM).

Tabela 139 Procenat ožiljavanja vršnih reznica sa 4 - 6 nodusa *D. pinifolius* na razli itim podlogama

NAA μM	*Osnovna podloga	perlit			pesak		
		nekrotirane	bez promene	ožiljene	nekrotirane	bez promene	ožiljene
		%	%	%	%	%	%
0,0	MS	78,9 ^a	18,9 ^a	2,2 ^{bc}	66,7 ^{ab}	27,8 ^a	5,5 ^{bc}
0,27	MS	62,3 ^{ab}	22,2 ^a	3,3 ^{bc}	70,0 ^{ab}	21,1 ^a	8,9 ^b
0,54	MS	46,7 ^b	24,4 ^a	15,5 ^{ab}	65,6 ^{ab}	18,9 ^{ab}	15,5 ^{ab}
2,68	MS	80,0 ^a	16,7 ^a	28,9^a	55,6 ^b	18,9 ^{ab}	25,5 ^a
0,0	1/2MS	80,1 ^a	14,4 ^{ab}	5,5 ^b	80,0 ^a	16,7 ^{ab}	3,3 ^{bc}
0,27	1/2MS	82,2 ^a	8,9 ^b	8,9 ^b	77,8 ^a	12,2 ^b	10,0 ^b
0,54	1/2MS	74,5 ^a	11,1 ^b	14,4 ^{ab}	72,3 ^{ab}	12,2 ^b	15,5 ^{ab}
2,68	1/2MS	52,2 ^b	26,7 ^a	21,1 ^a	53,4 ^b	25,5 ^a	21,1 ^a

*U podlogama MS i 1/2MS je tokom ovog eksperimenta izostavljen agar

Napomena: Vrednosti koje su ozna ene istim slovom se statisti ki zna ajno ne razlikuju ($P < 0,05$)

D. giganteiformis ssp. *kladovanus*

Sli no kao i kod prethodno ispitanih taksona, i kod *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* nodusne reznice i terminalni pupoljci su nekrotirali u visokom procentu koji je na ve ini podloga prelazio 85%, dok procenat ožiljavanja nije prešao 10% ni na jednoj podlozi (tabele 140 i 141).

Vršne reznice su se ožilile u nešto ve em procentu, dostižu i 15,5% (reznice sa 1 - 3 nodusa) i 23,3% (reznice sa 4 - 6 nodusa) (tabele 142 i 143). Ipak, i pored razlika u procentu ožiljavanja, koncentracija MS soli je imala uticaja na ožiljavanje, pri emu su bolji rezultati dobijeni na podlogama sa 1/2MS koncentracijom soli.

Tabela 140 Procenat ožiljavanja nodusnih reznica *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* na razli itim podlogama

NAA μM	*Osnovna podloga	perlit			pesak		
		nekrotirane	bez promene	ožiljene	nekrotirane	bez promene	ožiljene
		%	%	%	%	%	%
0,0	MS	97,8 ^a	2,2 ^b	0,0 ^b	94,5 ^a	5,5 ^{ab}	0,0 ^b
0,27	MS	94,5 ^a	5,5 ^{ab}	0,0 ^b	98,9 ^a	1,1 ^b	0,0 ^b
0,54	MS	95,6 ^a	4,4 ^b	0,0 ^b	95,6 ^a	3,3 ^b	1,1 ^b
2,68	MS	87,8 ^a	6,7 ^{ab}	5,5 ^{ab}	93,4 ^a	3,3 ^b	3,3 ^b
0,0	1/2MS	84,4 ^{ab}	8,9 ^a	6,7 ^a	85,6 ^{ab}	8,9 ^a	5,5 ^{ab}
0,27	1/2MS	81,1 ^{ab}	10,0 ^a	8,9 ^a	85,6 ^{ab}	8,9 ^a	5,5 ^{ab}
0,54	1/2MS	81,1 ^{ab}	10,0 ^a	8,9 ^a	82,2 ^{ab}	11,1 ^a	6,7 ^a
2,68	1/2MS	78,9 ^b	11,1 ^a	10,0^a	81,1 ^b	10,0 ^a	8,9 ^a

*U podlogama MS i 1/2MS je tokom ovog eksperimenta izostavljen agar

Napomena: Vrednosti koje su označene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju ($P < 0,05$)

Kod sva 4 ispitivana tipa eksplanata na MS podlogama bez NAA ili sa niskom koncentracijom NAA (0,27 μM) nije bilo ni jednog ožiljenog eksplanta, dok pri višoj koncentraciji NAA procenat ožiljavanja nije prešao 4,4% (tabele 140, 141, 142 i 143).

S druge strane, na svim podlogama sa 1/2MS koncentracijom soli bilo je ožiljenih eksplantata, s tim da se njihov broj uglavnom povećavao sa povećanjem koncentracije NAA. Međutim, iako su razlike između u 1/2MS podlogama sa i bez NAA uočljive, javljaju se preklapanja između u homogenih grupa, pa tako kod nodusnih reznica nema statistički značajnih razlika između u podlogama sa različitim sadržajem NAA, mada su maksimalne vrednosti dobijene na podlogama sa najvećom koncentracijom NAA (tabela 140).

Tabela 141 Procenat ožiljavanja terminalnih pupoljaka *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* na različitim podlogama

NAA μM	*Osnovna podloga	perlit			pesak		
		nekrotirane	bez promene	ožiljene	nekrotirane	bez promene	ožiljene
		%	%				%
0,0	MS	95,6 ^a	4,4 ^b	0,0 ^b	96,7 ^a	3,3 ^b	0,0 ^b
0,27	MS	96,7 ^a	3,3 ^b	0,0 ^b	97,8 ^a	2,2 ^b	0,0 ^b
0,54	MS	94,5 ^a	5,5 ^{ab}	0,0 ^b	95,6 ^a	3,3 ^b	1,1 ^b
2,68	MS	91,2 ^a	4,4 ^b	4,4 ^b	90,0 ^a	6,7 ^{ab}	3,3 ^{ab}
0,0	1/2MS	93,4 ^a	4,4 ^b	2,2 ^b	92,3 ^a	5,5 ^b	2,2 ^b
0,27	1/2MS	87,8 ^a	8,9 ^a	3,3 ^b	84,5 ^{ab}	11,1 ^a	4,4 ^{ab}
0,54	1/2MS	84,4 ^{ab}	8,9 ^a	6,7 ^{ab}	83,4 ^{ab}	13,3 ^a	3,3 ^{ab}
2,68	1/2MS	77,8 ^b	13,3 ^a	8,9^a	77,8 ^b	15,5 ^a	6,7 ^a

*U podlogama MS i 1/2MS je tokom ovog eksperimenta izostavljen agar

Napomena: Vrednosti koje su označene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju ($P < 0,05$)

Kod terminalnih pupoljaka i vršnih reznica sa 1 - 3 nodusa statistički značajne razlike se javljaju jedino između podloga bez NAA i podloga sa maksimalnom koncentracijom NAA (2,68 μM) (tabele 141 i 142), a kod vršnih reznica sa 4 - 6 nodusa ne samo da vrednosti dobijene na podlogama sa različitim koncentracijama NAA pripadaju istoj homogenoj grupi, nego je na podlogama sa peskom (slike 24 i 25) najveći i procenat ožiljenih reznica dobijen pri nižoj koncentraciji NAA (0,54 μM) (tabela 143).

Uticaj potporne komponente u podlogama za ožiljavanje (pesak ili perlit) ni kod *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* nije bio izražen, a razlike u procentu ožiljavanja, posmatrano kod istog tipa eksplanta, pri istoj koncentraciji MS soli i NAA su neznatne.

Tabela 142 Procenat ožiljavanja vršnih reznica sa 1 - 3 nodusa *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* na različitim podlogama

NAA μM	*Osnovna podloga	perlit			pesak		
		nekrotirane	bez promene	ožiljene	nekrotirane	bez promene	ožiljene
		%	%	%	%	%	%
0,0	MS	90,0 ^a	10,0 ^b	0,0 ^b	90,0 ^a	10,0 ^{ab}	0,0 ^b
0,27	MS	84,4 ^a	15,6 ^{ab}	0,0 ^b	87,8 ^a	12,2 ^{ab}	0,0 ^b
0,54	MS	83,3 ^a	16,7 ^{ab}	0,0 ^b	85,6 ^a	13,3 ^{ab}	1,1 ^b
2,68	MS	80,0 ^{ab}	15,6 ^{ab}	4,4 ^b	90,0 ^a	6,7 ^b	3,3 ^b
0,0	1/2MS	76,6 ^{ab}	16,7 ^{ab}	6,7 ^{ab}	81,1 ^{ab}	12,2 ^{ab}	6,7 ^{ab}
0,27	1/2MS	71,1 ^{ab}	20,0 ^a	8,9 ^{ab}	73,3 ^{ab}	20,0 ^a	6,7 ^{ab}
0,54	1/2MS	71,1 ^{ab}	22,2 ^a	6,7 ^{ab}	73,4 ^{ab}	13,3 ^{ab}	13,3 ^a
2,68	1/2MS	63,4 ^b	24,4 ^a	12,2 ^a	65,6 ^b	18,9 ^a	15,5^a

*U podlogama MS i 1/2MS je tokom ovog eksperimenta izostavljen agar

Napomena: Vrednosti koje su označene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju ($P < 0,05$)



Slika 24 Ožiljavanje izdanaka *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* u pesku



Slika 25 Izdanci *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* ožiljavani u pesku

Tabela 143 Procenat ožiljavanja vršnih reznica sa 4 - 6 nodusa *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* na razli itim podlogama

NAA μM	*Osnovna podloga	perlit			pesak		
		nekrotirane	bez promene	ožiljene	nekrotirane	bez promene	ožiljene
		%	%	%	%	%	%
0,0	MS	81,1 ^a	18,9 ^a	0,0 ^b	80,0 ^a	20,0 ^a	0,0 ^b
0,27	MS	84,4 ^a	15,6 ^{ab}	0,0 ^b	87,8 ^a	12,2 ^{ab}	0,0 ^b
0,54	MS	87,8 ^a	12,2 ^{ab}	0,0 ^b	85,6 ^a	13,3 ^{ab}	1,1 ^b
2,68	MS	76,7 ^{ab}	18,9 ^a	4,4 ^b	80,0 ^a	17,8 ^a	2,2 ^b
0,0	1/2MS	71,1 ^{ab}	18,9 ^a	10,0 ^{ab}	68,9 ^b	22,2 ^a	8,9 ^{ab}
0,27	1/2MS	61,1 ^b	20,0 ^a	18,9 ^a	63,3 ^b	20,0 ^a	16,7 ^a
0,54	1/2MS	62,2 ^b	21,1 ^a	16,7 ^a	63,4 ^b	13,3 ^{ab}	23,3^a
2,68	1/2MS	55,6 ^b	25,5 ^a	18,9 ^a	63,4 ^b	21,1 ^a	15,5 ^a

*U podlogama MS i 1/2MS je tokom ovog eksperimenta izostavljen agar

Napomena: Vrednosti koje su označene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju ($P < 0,05$)

4.4. FAZA AKLIMATIZACIJE BILJAKA DOBIJENIH *IN VITRO*

D. serotinus

Vode i se rezultatima ogleda vezanog za ožiljavanje *in vitro* za aklimatizaciju su odabrane samo biljice koje su ožiljene na MS podlozi sa 2,68 μ M NAA. To je urađeno u cilju eliminacije mogućeg uticaja sastava podloge za ožiljavanje na aklimatizaciju. Visok procenat ožiljavanja kod ove vrste je bio zabeležen i na 1/2MS podlozi sa istom koncentracijom NAA, međutim na MS podlozi se formirao znatno veći broj korenova.

Tabela 144 Procenat aklimatizacije ožiljenih biljaka *D. serotinus* na različitim supstratima

Supstrat	Ožiljene biljke poreklom od:			
	nodusnih reznica	terminalnih pupoljaka	vršnih reznica sa 1-3 nodusa	vršnih reznica sa 4-6 nodusa
treset : pesak - 1 : 1	77,7 ^b	78,8 ^{ab}	82,2 ^{ab}	83,3 ^{ab}
treset : pesak - 4 : 1	86,7 ^a	83,3 ^a	88,9^a	86,7 ^a
treset : pesak : baštenska zemlja : pregoreli stajnjak - 2 : 2 : 2 : 1	80,0 ^{ab}	77,7 ^{ab}	80,0 ^{ab}	82,2 ^{ab}

Napomena: Vrednosti koje su označene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju ($P < 0,05$)

Procenat aklimatizacije ožiljenih *in vitro* biljaka *D. serotinus* je relativno visok i kreće se od 77,7% do 88,9% (tabela 144) (slika 26). Na procenat aklimatizacije je uticao sastav supstrata, ali se prilikom primene metode najmanje značajne razlike i analize višestrukih opsega javljaju preklapanja između homogenih grupa zbog čega su dobijene razlike manjeg značaja (tabela 144). Međutim, multinominalna logistička regresija je potvrdila da uticaj sastava supstrata na aklimatizaciju jeste statistički značajan (tabela

145). U tabeli 144 može se uo iti da je najpovoljniji supstrat za aklimatizaciju ožiljenih bilj ica ove vrste sastavljen iz treseta i peska u odnosu 4 : 1, gde su kod svih tipova ožiljenih biljaka dobijene najviše vrednosti procenta aklimatizacije, dok je na mešavini treseta i peska u odnosu 1 : 1 i na mešavini treseta, peska, baštenske zemlje i pregorelog stajnjaka (2 : 2 : 2 : 1) aklimatizacija bila nešto slabija.

Tabela 145 Zna ajnost uticaja razli itih faktora na aklimatizaciju ožiljenih bilj ica *D. serotinus* na razli itim supstratima

Faktor	Hi- kvadrat	P-vrednost
supstrat	6,52774	<u>0,0382</u>
tip eksplanta	2,1093	0,5500
supstrat × tip eksplanta	0,907292	0,9889



Slika 26 Aklimatizovane bilj ice *D. serotinus*

Tako e, iako ima razlika u procentu aklimatizacije biljaka poreklom od vršnih reznica sa različitim brojem nodusa i biljaka poreklom od nodusnih reznica ili terminalnih pupoljaka (tabela 144), one su male i zanemarljive, zbog čega se može smatrati da tip eksplanta iz kog se razvila ožiljena *in vitro* biljka ne utiče na aklimatizaciju vrste *D. serotinus* što je potvrdila i sprovedena multinominalna logistička regresija (tabela 145).

D. pinifolius

Kod *D. pinifolius*, tako e su za aklimatizaciju iskorišćene biljke poreklom sa MS podloge koja je sadržala 2,68 μ M NAA (slika 27). Na toj podlozi je bio najveći i procenat ožiljavanja, a i prosečan broj korenova je bio visok.



Slika 27 Aklimatizovane biljke *D. pinifolius*

Tabela 146 Procenat aklimatizacije ožiljenih biljaka *D. pinifolius*

Supstrat	Ožiljene biljke poreklom od:			
	nodusnih reznica	terminalnih pupoljaka	vršnih reznica sa 1-3 nodusa	vršnih reznica sa 4-6 nodusa
treset : pesak - 1 : 1	87,8 ^{ab}	86,7 ^{ab}	88,9 ^{ab}	88,9 ^{ab}
treset : pesak - 4 : 1	91,1 ^a	90,0 ^a	94,4 ^a	95,5^a
treset : pesak : baštenska zemlja : pregoreli stajnjak - 2 : 2 : 2 : 1	86,7 ^{ab}	85,5 ^{ab}	88,9 ^{ab}	90,0 ^{ab}

Napomena: Vrednosti koje su označene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju ($P < 0,05$)

Slično kao i kod *D. serotinus* najpovoljnija mešavina supstrata se sastojala iz treseta i peska u odnosu 4 : 1, gde se aklimatizovalo preko 90% ožiljenih *in vitro* biljaka *D. pinifolius* (tabela 146). Posmatrajući razlike u aklimatizaciji prisutne su preklapanja između u homogenih grupa, ali ipak uticaj sastava supstrata na stepen aklimatizacije jeste statistički značajan (tabela 147).

Tip eksplanta iz kog se razvila ožiljena biljka je imao uticaja na aklimatizaciju i procenat aklimatizacije izdanaka sa različitim brojem nodusa je nešto viši nego kod ožiljenih biljaka poreklom iz nodusnih reznica i terminalnih pupoljaka na sve tri mešavine supstrata (tabela 146). Međutim, te razlike su male i uticaj tipa eksplanta na aklimatizaciju nije statistički značajan (tabela 147).

Tabela 147 Značajnost uticaja različitih faktora na aklimatizaciju ožiljenih biljaka *D. pinifolius* na različitim supstratima

Faktor	Hi- kvadrat	P-vrednost
supstrat	6,34008	<u>0,0420</u>
tip eksplanta	3,10892	0,3751
supstrat × tip eksplanta	1,03619	0,9842

D. giganteiformis ssp. *kladovanus*

Za razliku od *D. serotinus* i *D. pinifolius*, za aklimatizaciju ožiljenih biljica *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* iskorišene su one poreklom sa 1/2MS podloge sa dodatkom 2,68 μ M NAA, jer je na toj podlozi bio najviši procenat ožiljavanja, kao i najviši prosečan broj korenova koji se formirao po postavljenom eksplantu.

Aklimatizacija je bila uspešna (slika 28), a najpovoljniji rezultati su kao i kod prethodno ispitanih taksona dobijeni na mešavini supstrata koja se sastojala iz treseta i peska u odnosu 4 : 1 (85,5-90,0%) (tabela 148), a sam uticaj supstrata na aklimatizaciju je statistički značajan (tabela 149).

Posmatrajući i poreklo ožiljenih *in vitro* biljaka, najslabije su se aklimatizovale biljice koje su se razvile iz nodusnih reznica, neznatno više one poreklom iz terminalnih pupoljaka, a najviše biljke poreklom iz vršnih reznica sa različitim brojem nodusa (tabela 148). Međutim, dobijene razlike su male i nemaju značaja (tabela 149).

Tabela 148 Procenat aklimatizacije ožiljenih biljaka *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*

Supstrat	Ožiljene biljke poreklom od:			
	nodusnih reznica	terminalnih pupoljaka	vršnih reznica sa 1-3 nodusa	vršnih reznica sa 4-6 nodusa
treset : pesak - 1 : 1	78,9 ^{ab}	80,0 ^{ab}	83,3 ^{ab}	82,2 ^{ab}
treset : pesak - 4 : 1	85,5 ^a	85,5 ^a	88,9 ^a	90,0^a
treset : pesak : baštenska zemlja : pregoreli stajnjak - 2 : 2 : 2 : 1	77,8 ^{ab}	81,1 ^{ab}	82,2 ^{ab}	84,4 ^{ab}

Napomena: Vrednosti koje su označene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju ($P < 0,05$)



Slika 28 Aklimatizovane bilj ice *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*

Tabela 149 Zna ajnost uticaja razli itih faktora na aklimatizaciju ožiljenih bilj ica *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* na razli itim supstratima

Faktor	Hi- kvadrat	P-vrednost
supstrat	7,01855	<u>0,0299</u>
tip eksplanta	2,93202	0,4022
supstrat × tip eksplanta	0,462229	0,9983

Nakon aklimatizacije, dobijene biljke su presa ene na stalno mesto gde su prezimele i naredne godine (2010.) cvetale (slike 29, 30, 31, 32 i 33). Biljke dobijene u sprovedenim istraživanjima, nakon aklimatizacije, posa ene su u peripanonskom pojasu, u podnožju planine Kosmaj, na južnoj ekspoziciji, u istoj klimatskoj zoni (6) kao i lokaliteti sa kojih je sakupljeno seme. Prvenstveni cilj sadnje i daljeg pra enja razvoja posa enih biljaka je bio da se utvrdi vitalnost (klijavost) semena koje produkuju ove biljke dobijene *in vitro*.



Slika 29 *D. serotinus* (april, 2010.)



Slika 30 *D. pinifolius* (april, 2010.)

Posa ene biljke su cvetale, plodonosile, a klijavost semena u prvoj godini, neposredno nakon sakupljanja je iznosila 94,3% za *D. serotinus*, 72% za *D. pinifolius* i 68% za *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*. Dobijene vrednosti su pokazatelji vitalnosti biljaka dobijenih mikropropagacijom, me utim, ne treba zaboraviti da se za potrebe reintrodukcije moraju sprovesti istraživanja na lokalitetima koja bi utvrdila stepen

plodonošenja i klijavost *in situ*, kao i zabeležiti prisustvo šteto ina semena i njihov uticaj na obnavljanje posmatranih populacija.



Slika 31 *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* (april, 2010.)



Slika 32 *D. pinifolius* u cvetu (jun, 2010.)



Slika 33 *D. serotinus* i *D. pinifolius* (avgust, 2010.)

5. DISKUSIJA

5.1. Uspostavljanje sterilne kulture

Sterilna kultura *in vitro* je uspješno uspostavljena kod sva tri karanfila, a klijavost semena u *in vitro* uslovima je bila visoka, od 88% (*D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*), 92% (*D. pinifolius*) do 96% (*D. serotinus*). Dobijeni rezultati su delom bili o ekivani jer tokom preliminarnih istraživanja mogu nosti mikropropagacije *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* (Markovi et al., 2006) i *D. serotinus* (Markovi et al., 2007) inicijalna kultura je bila uspostavljena iz semena i dobijene su sli ne vrednosti klijavosti, a na in sterilizacije je bio identi an kao i tokom ovih istraživanja.

Kod *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* klijavost je bila identi na (88%), ali se razlikuje procenat kontaminacija jer je u radu Markovi et al. (2006) kontaminiralo 8,3%, a tokom ovih istraživanja 5% od ukupnog broja postavljenih semena. Klijavost vrste *D. serotinus* (96%) je neznatno niža u odnosu na rezultate koje su dobili Markovi et al. (2007) - 97%. U pore enju sa navedena dva taksona, o ekivala se i visoka klijavost semena *D. pinifolius* što i jeste bio slu aj (92%). Me utim, treba ista i da kod nekih vrsta karanfila klijavost semena u uslovima *in vitro* može biti znatno niža. Tako je kod vrste *D. deltoides* klijavost iznosila svega 58% (Markovi , 2008), što se objašnjava injenicom da je u navedenom radu postupak sterilizacije bio nešto druga iji. Naime, sterilizacija *D. deltoides* izvršena je 2% rastvorom NaOCl tokom 10 minuta, dok je tokom ovih istraživanja sterilizacija vršena 4% NaOCl tokom 20 minuta. S obzirom da je poznato da kod nekih vrsta oksidanti, me u kojima je i NaOCl, prekidaju i dormantnost ili ubrzavaju i klijanje kod nedormantnog semena, pove avaju procenat klijavosti (Bewley i Black, 1994, Neškovi et al., 2003), mogu e je da je

ve i procenat klijavosti posledica pove anja koncentracije NaOCl i produženja trajanja sterilizacije. Tome u prilog ide i podatak da je klijavost semena vrste *D. zeyheri* Sond. ssp. *natalensis* S. S. Hooper prilikom sterilizacije u 3.5% rastvoru NaOCl u trajanju od 15 minuta bila ve a nego kod *D. deltoides*, a niža nego kod vrsta karanfila koji su bili predmet ovog rada (Crouch i van Staden, 1993). Naravno, tuma enje prikazanih rezultata se može okvirno prihvatiti jer su u pitanju razli ite vrste karanfila i klijavost zavisi pre svega od same posmatrane vrste kao i od godine uroda. Tako, na primer, klijavost vrste *D. ciliatus* ssp. *dalmaticus* je iznosila 70%, a *D. giganteus* ssp. *croaticus* svega 42% (Radojevi et al., 2010).

Konkretan uticaj NaOCl na klijanje semena je istraživan, ali ne kod *Dianthus* spp., a dobijeni rezultati se razlikuju pre svega zavisno od ispitivane vrste, zatim od koncentracije rastvora, kao i od dužine tretiranja semena. Na primer, kod ispitivanja klijavosti 11 meseci starog semena *Sorghastrum nutans* (L.) Nash. prilikom potapanja semena u 5,25% NaOCl tokom 20 minuta klijavost je iznosila 53%, potapanjem tokom 60 minuta smanjila se na 51%, dok je bez tretmana sa NaOCl iznosila 47% (Watkinson i Pill, 1998). Tako e, dodavanje giberelinske kiseline (GA₃) je pozitivno uticalo na klijavost *S. nutans* (67%), ali je najefikasnija bila kombinacija tretmana 20 minuta NaOCl i zatim GA₃ (71%). Kod vrste *Capsicum annuum* L. potapanje semena u rastvor 1% ili 3% NaOCl tokom 5 ili 40 minuta nije pokazalo zna ajan uticaj na klijanje tek sakupljenog semena u pore enju sa kontrolom (bez NaOCl) (Khah i Passam, 1992), ak nisu bile prisutne razlike zavisno od koncentracije ili dužine tretiranja, izuzev kod potapanja semena 40 minuta u 3% rastvor gde je klijavost znatno opala. Me utim, nakon skladištenja semena *C. annuum* na sobnoj temperaturi tokom 10 meseci, potapanje semena u 3% rastvor NaOCl je inhibitorno delovao na klijanje i sa pove anjem vremena potapanja (5, 10, 20 minuta) procenat klijavosti je zna ajno opadao (Khah i Passam, 1992). Uopšteno posmatraju i, pozitivan efekat NaOCl se ogleda u prekidanju dormantnosti semena rastvaranjem i oksidacijom inhibitora klijanja (Frank i Larson, 1970, Miyoshi i Mii, 1995, 1998), ali i u delimi noj degradaciji semenja e ime se podsti e klijanje kod vrsta sa egzogenom dormantnoš u vezanom za nepropustljivu semenja u (Lee et al., 2007). Me utim, ne treba zaboraviti da NaOCl može imati i toksi no dejstvo na biljno tkivo. Tako je Abdul-Baki (1974) pokazao da NaOCl koji je zaostao na

površini semena nakon ispiranja utiče na ugrađivanje aminokiselina u proteine, pri čemu efekat NaOCl zavisi od intenziteta ispiranja semena nakon sterilizacije, s tim da je njegovo prisustvo detektovano čak i kada je seme 8 puta isprano sterilnom destilovanom vodom.

5.2. Faza multiplikacije

5.2.1. Uticaj balansa hormona na razvoj izdanaka

Regeneracija izdanaka u fazi multiplikacije je bila relativno uspešna, ali su se dobijeni rezultati značajno razlikovali zavisno od tipa eksplanata, sastava podloge i vrste karanfila.

Kod *D. serotinus* regeneracija na MS podlogama je bila najuspešnija uz prisustvo 0,44 μM BAP i 0,54 μM NAA (od 65% kod nodusnih reznica do 83% kod vršnih reznica), na 1/2MS podlogama je procenat regeneracije bio veći (od 87% kod nodusnih reznica do 100% kod vršnih reznica), tako i na podlogama sa 0,44 μM BAP i 0,54 μM NAA (tabele 6 i 7).

Regeneracija izdanaka kod *D. pinifolius* i *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* je tako i bila najuspešnija na podlogama sa najnižom koncentracijom fitohormona (0,44 μM BAP i 0,54 μM NAA). Na tim podlogama, kod *D. pinifolius* iz svih postavljenih eksplanata (100%) su se regenerisali pravilno razvijeni izdanci, bez obzira na tip eksplanata i koncentraciju mineralnih soli (1/2MS ili MS) (grafik 2), a kod *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* procenat regeneracije se kretao od 98% (nodusne reznice) do 100% (terminalni pupoljci i vršne reznice) na 1/2MS i MS podlogama (tabele 16 i 17).

Uticaj ispitivanih faktora na regeneraciju pravilno razvijениh izdanaka se različitom manifestovao kod ispitanih taksona. Multinomialna logistička regresija je pokazala da su na procenat pravilno razvijениh izdanaka kod *D. pinifolius* statistički značajan uticaj imale koncentracije i BAP i NAA, dok je kod *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* značajan uticaj imao samo BAP, ali i tip eksplanata. Međutim, regeneracija pravilno razvijениh izdanaka *D. serotinus* je znatno složenija, pri čemu su, osim koncentracije BAP, značajan uticaj imali i koncentracija MS soli u podlogama, tip

eksplanta, ali i interakcija izme u koncentracije MS soli i tipa eksplanta, kao i interakcija izme u balansa dodatih hormona i koncentracije MS soli (tabele 10, 11, 14 i 15).

Vitrifikacija je bila prisutna jedino kod *D. serotinus*, a procenat vitrifikovanih eksplanata je bio relativno visok, prelaze i u pojedinim slu ajevima 20%. To je ujedno i jedan od razloga nižeg procenta pravilno regenerisanih eksplanta kod *D. serotinus* u odnosu na *D. pinifolius* i *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*. Mnogi autori (Vinterhalter i Vinterhalter, 1996, Benson et al., 2000, Jain et al., 2001, Fraga et al., 2004, van Staden et al., 2008) navode da citokinini (BAP) izazivaju pojavu vitrifikovanih eksplanta, naro ito pri višim koncentracijama, što se kod *D. serotinus* i pokazalo jer se visok procenat vitrifikovanih eksplanta eš e javljao na podlogama sa višim koncentracijama BAP, sli no kao i prilikom mikropropagacije vrste *D. deltoides* (Markovi , 2008) gde je procenat vitrifikacije prelazio 40%. Me utim, uticaj odnosa koncentracija BAP i NAA nije prisutan, za razliku od rezultata koje je dobila Markovi (2008) kod *D. deltoides* gde je pri istoj koncentraciji BAP vitrifikacija bila ve a na nižoj koncentraciji NAA, ak sam uticaj koncentracije NAA na vitrifikaciju izdanaka *D. serotinus* nije statisti ki zna ajan. Tako e, treba imati u vidu da pojava vitrifikacije zavisi i od vrste citokinina koji se dodaje u podlogu za multiplikaciju izdanaka. Tako Radojevi et al. (1997) rade i sa *D. petraeus* ssp. *noeanus* navode da je vitrifikovanih eksplanta bilo na podlozi sa BAP, a ne i sa kinetinom, ali je BAP efikasnije uticao na multiplikaciju izdanaka. Sli ne rezultate dobili su i Miši et al. (2005a) prilikom mikropropagacije vrste *Nepeta rtanjensis* gde se BAP tako e pokazao efikasnijim od kinetina u fazi multiplikacije, s tim da su ve e koncentracije oba citokinina prouzrokovale pojavu vitrifikovanih biljaka.

Na procenat vitrifikacije *D. serotinus* statisti ki zna ajno je uticao i tip eksplanta (tabela 10), a vitrifikacija se naj eš e javljala kod nodusnih reznica (16,5-21,7% na MS podlogama), a najre e kod vršnih reznica (1,7 - 8,0% na MS podlogama; 0,0-1,7% na 1/2MS podlogama). Uticaj tipa eksplanta na vitrifikaciju prime en je i prilikom mikropropagacije drugih karanfila, *D. deltoides* i *D. gratianopolitanus* (Fraga et al., 2004, Markovi , 2008, Popovi et al., 2008) ali je kod pomenutih vrsta procenat vitrifikacije bio znatno viši prilikom gajenja terminalnih pupoljaka nego nodusnih reznica, za razliku od *D. serotinus*. Me utim, istraživanja Popovi et al. (2008) su

pokazala da se odgovaraju im izborom tipa eksplanta vitrifikacija zna ajno može redukovati, pa se koriš enjem vršnih reznica umesto terminalnih pupoljaka i nodusnih reznica vitrifikacija može smanjiti sa 40-50% na ak manje od 4%.

Pored uticaja tipa eksplanta, uo lživ je uticaj koncentracije MS soli na vitrifikaciju (tabela 10), gde je na MS podlogama bilo gotovo dvostruko više vitrifikovanih izdanaka nego na podlogama sa 1/2MS koncentracijom soli, pri istoj koncentraciji fitohormona, posmatraju i isti tip eksplanta (tabele 8 i 9). U literaturi se pominje da prisustvo i koncentracija jona odre enih makroelemenata može uticati na pojavu vitrifikacije kod vrste *D. caryophyllus* (Dantas et al., 2001, Kevers et al., 2004, Saher et al., 2004). Na primer, George i de Klerk (2008) navode da se vitrifikacija može pojaviti kao posledica suviše visokih koncentracija amonijum jona (NH_4^+) u medijumu, ali se u tom slu aju negativan efekat može "popraviti" prebacivanjem izdanaka na medijum samo sa nitratnim jonima (NO_3^-) tokom odre enog perioda. Sli no, Yada v et al. (2003) su modifikovali sastav podloge tako što su menjali koncentracije Mg^{2+} i Fe^{2+} jona i na taj na in zna ajno smanjili broj vitrifikovanih eksplanata *D. caryophyllus*, ali se optimalna koncentracija jona razlikovala zavisno od kultivara koji je ispitivan.

Na ovaj na in se dobijene razlike u procentu vitrifikacije izme u 1/2MS i MS podloga mogu objasniti, ali s obzirom da su sasvim zadovoljavaju i rezultati postignuti na 1/2MS podlogama gde je vitrifikacija iznosila 0,0 - 3,4% suviše je sprovesti analizu uticaja pojedinih jona sadržanih u MS kompleksu soli na vitrifikaciju *D. serotinus*.

Prose an broj izdanaka po eksplantu se kretao kod *D. serotinus* od 3,6 - 10,1 (MS podloge), 3,6 - 7,2 (1/2MS podloge), kod *D. pinifolius* od 3,1 - 15,4 (MS podloge), 2,5 - 10,3 (1/2MS podloge) i kod *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* od 1,7 do 4,6 (MS podloge) i od 1,7 do 4,4 (1/2MS podloge) (tabele 20, 22, 25).

Broj izdanaka kod sva tri ispitivana taksona je bio varijabilan, zbog ega javlja preklapanje izme u homogenih grupa i dobijene razlike na razli itim hranljivim podlogama esto nisu statisti ki zna ajne. Jedan od uzroka varijabilnosti broja izdanaka je neravnomeran razvoj aksilarnih pupoljaka jer nodusne reznice i izdanci sa jednim nodusom sadrže aksilarne pupoljke ijom proliferacijom se formiraju novi izdanci, a

dosadašnja istraživanja su pokazala da aksilarni pupoljci karanfila mogu biti različitog stepena razvijenosti (van Altvorst et al., 1995, Marković, 2008).

Varijabilan broj izdanaka po eksplantu je bio i prilikom mikropropagacije *D. deltoides* (Marković, 2008), sa velikim preklapanjima između u homogenih grupa i bez uočljive pravilnosti u pogledu uticaja sastava medijuma na broj izdanaka, izuzev uticaja visoke koncentracije BAP, 13,32 μM i u manjoj meri 8,88 μM , na smanjenje multiplikacije izdanaka, što su i drugi autori zabeležili (Vinterhalter i Vinterhalter, 1996, Prevalek-Kozlina et al., 1997, Evenor i Reuveni, 2004). Međutim, iz nodusnih reznica vrste *D. serotinus* na MS podlozi sa 8,88 μM BAP i 5,37 μM NAA formirao se veći broj izdanaka (8,8) nego na MS podlogama sa nižim koncentracijama hormona (4,2 - 8,3 izdanaka) što kod terminalnih pupoljaka i vršnih reznica nije bio slučaj. S druge strane, poznato je da dodavanje citokinina u medijum, u ovom slučaju BAP, stimuliše razvoj oba tipa pupoljaka i sa povećanjem njegove koncentracije trebalo bi da se poveća broj izdanaka po eksplantu. Na primer, prilikom mikropropagacije *D. gratianopolitanus* (Fraga et al., 2004) uticaj citokinina na povećanje broja izdanaka po eksplantu bio je izražen i to pri nivou značajnosti od $p < 0,001$, a uticaj interakcije koncentracija citokinina i auksina pri $p < 0,01$.

Međutim, rezultati dobijeni tokom ovih istraživanja pokazuju da uticaj različitih faktora na broj formiranih izdanaka se znatno razlikuje zavisno od posmatranog taksona. Tako na osnovu rezultata dobijenih višefaktorskom analizom varijanse, pokazano je da ni jedan od ispitivanih faktora nema statistički značajan uticaj na broj izdanaka kod *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*, dok kod *D. pinifolius* ne samo da su svi posmatrani faktori - tip eksplanta, koncentracija MS soli i tip hormona značajno uticali na povećanje broja izdanaka, već je i interakcija između u balansa fitohormona i tipa eksplanta bila statistički značajna. S druge strane, kod *D. serotinus* broj izdanaka se nije značajno razlikovao zavisno od tipa eksplanata, ali je zato postojala statistički značajna interakcija između u tipa eksplanta i koncentracije MS soli u podlozi. Kod *D. deltoides* takođe nije bilo značajne razlike u broju izdanaka između u vršnih i nodusnih reznica (Marković, 2008), ali prilikom razmnožavanja vrste *D. gratianopolitanus* jeste (Fraga et al., 2004).

Rezultati dobijeni kod sva tri ispitivana taksona: *D. serotinus*, *D. pinifolius* i *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*, slični su kao i rezultati mikropropagacije *D. deltoides*

(Markovi , 2008) pokazuju da nema pravilnosti u pogledu uticaja promene koncentracije BAP pri konstantnoj koncentraciji NAA i obrnuto, kao i uticaja odnosa BAP i NAA (1 : 1; 2 : 1, itd.) na broj formiranih izdanaka.

Posmataraju i dužinu izdanaka, na svim hranljivim podlogama, kod sva tri karanfila, dominiraju izdanci kra i od 10 mm (tabele 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 i 35). Izuzetak jedino predstavljaju podloge sa niskom koncentracijom fitohormona, 0,44 μ M BAP i 0,54 μ M NAA, gde je uglavnom manje od 50% izdanaka bilo kra e od 10 mm. Takav rezultat je i o ekivan jer više koncentracije citokinina (BAP) uti u na smanjenje dužine izdanaka, dok dodavanje auksina (NAA) uti e na izduživanje izdanaka (Vinterhalter i Vinterhalter, 1996, Grbi , 2004, Machakova et al., 2008, van Staden et al., 2008). Tako e, procenat izdanaka koji pripadaju kategoriji dužine ve e od 20 mm bio je ve i kod terminalnih pupoljaka nego kod nodusnih reznica, što je bio slu aj i prilikom mikropropagacije *D. deltoides* (Markovi , 2008).

Uticaj koncentracije mineralnih soli u podlozi uo lživ je jedino kod vrste *D. serotinus*, gde su izdanci koji su se razvili na 1/2MS podlogama bili kra i od izdanaka na podlogama MS.

Prose an broj nodusa se kod *D. serotinus* kretao od 2,6 do 15,3, kod *D. pinifolius* je bio nešto niži, od 1,0 do 9,7, a kod *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* od 2,7 do 12,5 (tabele 36, 39 i 41). Uprkos tome što je kod sva tri ispitivana taksona prose an broj nodusa prili no varijabilan, uglavnom nema univerzalne pravilnosti u pogledu uticaja razli itih faktora na broj nodusa, ve se uticaj sastava podloge i tipa eksplanta manifestvuje razli ito. Tako, kod *D. serotinus*, na prose an broj nodusa zna ajno je uticao balans BAP i NAA, ali i tip eksplanta, kod *D. pinifolius* sadržaj fitohormona u podlozi nije imao statisti ki zna ajan uticaj na prose an broj nodusa, ali koncentracija MS soli u podlozi jeste, dok kod *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* ni jedan od ispitivanih faktora nije zna ajno uticao na prose an broj nodusa.

Sli no, kod *D. deltoides* nije bio izražen uticaj balansa hormona u podlozi na broj nodusa jer se javljalo veliko preklapanje izme u homogenih grupa (Markovi , 2008), a ni prilikom mikropropagacije vrste *Nepeta rtanjensis* prose an broj aksilarnih pupoljaka (= nodusa) nije se zna ajno menjao sa pove anjem koncentracije BAP od 0,2 μ M do 4,44 μ M (Miši , 2004, Miši et al., 2005a).

Me utim, treba ista i injenicu da je tokom ovih istraživanja dobijen ve i broj nodusa po eksplantu *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* nego što je to bio slu aj tokom preliminarnih istraživanja mikropropagacije ove vrste (Markovi et al., 2006), gde se broj nodusa kretao od 3,5 do 7,6. To je posledica ispitivanja uticaja ve eg broja hranljivih podloga na razvoj i multiplikaciju izdanaka kod *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* jer su najpovoljniji rezultati upravo dobijeni na podlogama koje nisu bile koriš ene u istraživanjima Markovi et al. (2006). Broj nodusa kod *D. serotinus* se nije zna ajno razlikovao u odnosu na preliminarna istraživanja (Markovi et al., 2007), odnosno dobijeni rezultati su potvrdili rezultate preliminarnih istraživanja, a na novim podlogama koje su testirane nisu dobijeni zna ajno bolji rezultati.

Prose na dužina internodija se kretala od 1,7 do 4,2 mm kod sva tri ispitivana karanfila (tabele 43, 46 i 48), a uticaj koncentracije MS soli i tipa eksplanta nije bio izražen (tabele 44, 47 i 49). Prose na dužina internodija je prvenstveno zavisila od koncentracija BAP i NAA i najkra e su bile na podlogama sa visokom koncentracijom BAP (8,88 μM), ili na podlogama sa niskom koncentracijom NAA (0,54 μM) i višom koncentracijom BAP (2,22 μM i 4,44 μM). Na podlogama sa višim koncentracijama NAA (2,68 μM) ili sa niskom koncentracijom oba hormona (0,44 μM BAP i 0,54 μM NAA) internodije su bile duže. Shodno tome, sasvim je bilo o ekivano da uticaj balansa hormona bude statisti ki zna ajan što je i potvr eno na osnovu višefaktorske analize varijanse kod sva tri ispitivana taksona. Pored toga, kod *D. serotinus* i *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* na dužinu internodija zna ajno je uticao i tip eksplanta. Prilikom mikropropagacije *D. gratianopolitanus* statisti ki zna ajan uticaj je imala samo koncentracija citokinina u podlogama, dok se dejstvo auksina na izduživanje internodija nije ispoljilo (Fraga et al., 2004).

5.2.2. Uticaj pH vrednosti hranljive podloge na razvoj izdanaka

Stepen regeneracije eksplanta kod *D. serotinus* kretao se od 65% do 99%, a najpovoljnijim su se pokazale 1/2MS podloge ija je pH vrednost iznosila 5,8 i 6,8 (tabela 51). Me utim, na podlogama sa pH vrednoš u 6,8 je procenat vitrifikacije bio viši u odnosu na podloge ija je pH iznosila 7,8, ali je zato na tim podlogama nekrotiralo više od polovine postavljenih eksplanta. Dejstvo razli itih faktora na

regeneraciju i pojavu vitrifikacije kod *D. serotinus* je prilično kompleksno, jer je uticaj svih ispitivanih faktora (tip eksplanta, pH vrednost podloge, koncentracija MS soli) statistički značajan, a prisutna je i značajna interakcija između njih (tabela 52).

Vitrifikacija se javila u veoma malom procentu i kod *D. pinifolius* (do 8,3%) i *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* (do 3,3%), ali samo na podlogama sa višom pH vrednošću (6,8 i 7,4) gde je uticaj pH vrednosti bio statistički značajan kod oba taksona (tabele 54, 56, 57 i 59) što ukazuje da na pojavu vitrifikacije može da utiče i povećana pH vrednost podloge, što navode i George i de Klerk (2008). Pored toga, George i de Klerk (2008) takođe navode da nedostatak Ca^{2+} u podlozi izaziva u nekim slučajevima apikalnu nekrozu koja se često javlja sa vitrifikacijom, ali ovde apikalna nekroza nije zabeležena.

Značaj pH vrednosti medijuma za razvoj biljaka u kulturi *in vitro* je već poznat (Leifert et al., 1992; Harbage, Stimart, 1996, Todorovic et al., 2006). Kod *Maranta leuconeura* 'Kerchoviana' različita pH vrednost medijuma nije značajno uticala na razvoj kultura, uglavnom nije bilo statistički značajnih razlika u procentu ožiljavanja, prosečnom broju listova po izdanku ili dužini izdanaka, jedino su uočljive razlike u broju izdanaka po eksplantu (Ebrahim, Ibrahim, 2000). Međutim, Bhatia i Ashwath (2005) su pokazali da promena pH vrednost medijuma značajno ne utiče na broj formiranih izdanaka po eksplantu *Solanum lycopersicum* 'Red Coat', ali utiče na njihovu dužinu. Takođe, Ostrolucka et al. (2004) su pokazali da acidofilnoj *Vaccinium corymbosum* 'Duke' znatno više pogoduje niža pH vrednost 5.0 nego 5.5, dok su istraživanja uticaja pH vrednosti na proliferaciju brojnih izdanaka kod *Vaccinium vitis-idaea* L. pokazala da se optimalna pH vrednost kreće u rasponu od 4.0 do 5.5 zavisno od kultivara (Ostrolucka et al., 2010). S druge strane, istraživanja Mišić et al. (2005a) su pokazala da kalcifilnoj vrsti *Nepeta rtanensis* najviše odgovara visoka pH vrednost 7.0 - 7.2 za proliferaciju brojnih pupoljaka i ožiljavanje izdanaka. Međutim, uprkos otkivanjima, naša istraživanja pokazuju da vrsti *D. serotinus* najviše odgovara pH vrednost u rasponu 5,8 - 6,8, dok pri višoj pH vrednosti, razvoj izdanaka u kulturi *in vitro* znatno opada.

Kod vrste *D. pinifolius* najveći procenat regeneracije eksplanta (100%) bio je na podlogama čija je pH vrednost iznosila 5,8 (tabela 54), što je bilo i otkivano s obzirom da je u pitanju vrsta koja na svom prirodnom staništu raste na zemljištu čija je reakcija

slabo kisela do neutralna jer je u pitanju silikatna geološka podloga (Tomović et al., 2003, Blaženi et al., 2005, Milosavljević et al., 2005).

D. giganteiformis ssp. *kladovanus* na svom prirodnom staništu raste na pesku neutralne do alkalne reakcije (Blaženi et al., 2005, Diklić et al., 1999) zbog čega je otkrivano povoljno dejstvo više pH vrednosti podloge. Međutim, najpovoljnijim su se pokazale podloge sa relativno nižom pH vrednošću - 5,8 i 6,3, gde gotovo da nije bilo razlike u procentu regeneracije (96%).

Posmatrajući ostale parametre kojima se definiše uspešnost multiplikacije izdanaka (broj izdanaka, broj nodusa, dužina izdanaka), može se uočiti da su kod vrste *D. serotinus* najpovoljnije bile podloge sa pH vrednošću 5,8 i 6,8, s tim da su prisutna preklapanja između u homogenih grupa i da su samo na pojedinim podlogama, kod pojedinih tipova eksplanta dobijeni bolji rezultati na podlogama pH vrednosti 6,8 u odnosu na 5,8 (tabela 51). Slično, i kod *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* najpovoljnije su bile podloge sa pH vrednošću 5,8 i 6,3, pri čemu su neznatno bolji rezultati postignuti na podlogama sa pH 6,3 (tabela 57). Kod *D. pinifolius* najbolji razvoj izdanaka je bio na podlogama čija je pH iznosila 5,8, što je i bilo otkrivano (tabela 53). Statistički značajan uticaj pH vrednosti na broj izdanaka, kao i na broj nodusa, nije bio zabeležen kod *D. serotinus*, već samo kod *D. pinifolius* i *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*. Pored toga, uočljiv je bio uticaj više pH vrednosti na smanjenje dužine izdanaka. Međutim, nije bilo u pitanju samo skraćivanje internodija već je sam razvoj i porast izdanaka bio slabiji, što se manifestovalo većim udelom izdanaka dužine do 10 mm, i smanjenjem procenta izdanaka dužine preko 20 mm. Ova pojava je bila naročito izražena kod *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*, taksona koji se uspešno može gajiti na podlogama čija je pH vrednost 6,3, ali se sasvim zadovoljavajuć i rezultati mogu postići i na podlozi pH vrednosti 5,8, koja se smatra standardnom za veliki broj vrsta (Pierik, 1987, Thorpe et al., 2008).

Kada je u pitanju *D. serotinus*, uzimajući u obzir dobijene rezultate može se zaključiti da je najpovoljnija pH vrednost podloge iznosi 5,8, iako je bilo otkrivano da veća pH vrednost medijuma bude povoljnija, jer zemljišta na prirodnom staništu ove vrste imaju pH 7,00 - 8,10 (Božić, 1999). Kod vrste *Nepeta rtanjensis* optimalna pH vrednost medijuma iznosi 7,00, ali je ipak u pitanju izrazito kalcifilna vrsta (Mišić, 2004). Inače u literaturi se navodi da za većinu biljnih vrsta najpovoljnija pH vrednost

se kreće u opsegu od 5,0 - 6,5, dok pH niži od 4,5 i viši od 7,0 uglavnom zaustavljaju rast i razvoj biljaka *in vitro* (Pierik, 1987, Thorpe et al., 2008), što se prilikom razmnožavanja *D. serotinus*, uprkos otkivanjima i pokazalo.

Osnovni cilj sprovedenih eksperimenata bio je da se izvrši optimizacija pH vrednosti podloge kako bi razmnožavanje ispitanih taksona bilo što efikasnije, što je i izvršeno. Međutim, diskusija mehanizma uticaja pH vrednosti podloge na razvoj izdanaka u kulturi *in vitro*, i time bi se mogli objasniti i rezultati dobijeni sa vrstom *D. serotinus*, je vrlo složena. Samo dejstvo pH vrednosti je veoma kompleksno, između ostalog kiselost podloge utiče na selektivno usvajanje jona. Na primer, usvajanje NH_4^+ jona je intenzivnije u alkalnoj i slabo kiseloj sredini, pri čemu dolazi do zakiseljavanja podloge, dok se NO_3^- intenzivnije usvajaju u kiseloj sredini, pri čemu hranljiva podloga postaje alkalnija (Thorpe et al., 2008). Na taj način intenzivnije usvajanje jednog od dva navedena jona menja pH vrednost medijuma u pravcu koji više odgovara drugom jonu. Pored navedenog dejstva, pH vrednost podloge utiče i na dostupnost i intenzitet usvajanja drugih jona u podlozi (Thorpe et al., 2008). Takođe, pH vrednost podloge ima uticaja na organogenezu i embriogenezu kod pojedinih vrsta. Tako, na primer prilikom gajenja kulture so nih listova lukovica ljiljana *Lilium auratum* Lindl. i *L. speciosum* Thunb. pH vrednost podloge je značajno uticala i na formiranje malih, adventivnih lukovica, ali i na formiranje korenova u fazi ožiljavanja (Takayama i Misawa, 1979).

5.2.3. Uticaj koncentracije i vrste šećera na razvoj izdanaka

Posmatrajući i regeneraciju izdanaka iz postavljenih eksplanta *D. serotinus* uočavamo da regeneracija eksplanta na MS podlogama zavisi pre svega od vrste šećera u podlozi, a mnogo manje od njegove koncentracije (tabele 85 i 86). Jedini izuzetak su podloge sa fruktozom gde su više koncentracije imale nepovoljno dejstvo na regeneraciju izdanaka *D. serotinus*. Pri tom, podloge sa saharozom su imale značajno veći i procenat regeneracije izdanaka od podloga sa drugim vrstama šećera.

Međutim, uočljivo je da dejstvo šećera u podlozi zavisi od koncentracije mineralnih soli jer na MS podlogama razlike između podloga sa saharozom, glukozom i

sa nižim koncentracijama glukoze su veoma male, a na 1/2MS podlogama su te razlike mnogo izraženije (grafik 7).

Na osnovu multinominalne logisti ke regresije može se zaključiti da je promena koncentracije svakog ispitivanog šeera imala značajnog uticaja na procenat regeneracije pravilno razvijenih izdanaka sa izuzetkom saharoze kod *D. pinifolius*, gde se procenat regeneracije nije značajno menjao sa promenom koncentracije u podlozi (95-100%). Razlike u regeneraciji eksplanta u odnosu na koncentraciju mineralnih soli su slabo prisutne kod *D. pinifolius*, gotovo da ne postoje, ali je značajan uticaj vrste šeera na regeneraciju izdanaka, a u manjoj meri se uočava i uticaj koncentracije šeera (tabele 89, 90 i 91). Nepovoljan uticaj su imale podloge sa višim koncentracijama fruktoze (50 gL⁻¹ i 70 gL⁻¹) gde je procenat pravilno regenerisanih eksplanta bio najmanji. Takođe, visoka koncentracija fruktoze nije pogodovala ni regeneraciji i razvoju eksplanta *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*, ali su kod ovog taksona nepovoljne bile i podloge sa višom koncentracijom drugih šeera (saharoze i glukoze).

Posmatrajući pojavu vitrifikacije, ona je pre svega zavisila od posmatranog taksona. Kod *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* vitrifikacije nije bilo ni na jednoj podlozi, kod *D. serotinus* se javljala na podlogama sa fruktozom, ali nije bilo statistički značajnih razlika zavisno od koncentracije fruktoze u podlozi, dok je kod *D. pinifolius* koncentracija šeera imala uticaja na pojavu vitrifikacije. Međutim, za razliku od *D. pinifolius* gde sa povećanjem koncentracije fruktoze povećao broj vitrifikovanih eksplanata, kod nekih vrsta, kao što su badem (*Prunus dulcis* (Mill.) D. A. Webb.) ili maslina (*Olea europaea* L.) dodavanjem fruktoze u medijum se značajno smanjio procenat vitrifikacije (Rugini et al., 1987).

Prilikom ispitivanja uticaja koncentracije i vrste šeera na razvoj i organogenezu u kulturi *in vitro* vrste *Rindera umbellata* (Waldst. et Kit.) Bunge najveći i stepen formiranja adventivnih pupoljaka na segmentima stabljika postignut je na podlozi sa 0,06M saharoze (20 gL⁻¹), ali najviše vrednosti sveže i suve mase bile su na podlogama sa 0,1M (34 gL⁻¹) saharoze (Perić et al., 2012). Nasuprot tome, glukoza je imala najpovoljniji uticaj na rast i morfogenezu izdanaka vrste *Nepeta rtanjensis* u odnosu na saharozu i fruktozu (Mišić et al., 2005a). U fazi umnožavanja izdanaka *Fagus sylvatica* L. i *F. orientalis* Lipsky na podlogama sa glukozom (3-4%) broj izdanaka po eksplantu je bio veći nego na podlogama sa saharozom ili fruktozom,

ali se zato uticaj vrste še era na dužinu izdanaka razlikovao zavisno od klona koji je gajen (Cuenca, Vieitez 2000). Sli no, prilikom mikropropagacije razli itih kultivara i klonova *Vaccinium vitis-idaea* razlikovalo se i dejstvo vrste i koncentracije dodatih še era (Debnath, 2005). Prisustvo ugljenih hidrata u medijumu, saharoze, glukoze ili fruktoze je povoljno uticalo i na klijanje zigotskih embriona *Pinus heldreichii* H. Christ., gde je procenat klijanja pri koncentraciji 10 - 30 gL⁻¹ odgovaraju eg še era bio viši u odnosu na podloge bez ugljenih hidrata, me utim, više koncentracije še era su imale inhibitorni efekat i klijavost je bila niža u odnosu na kontrolu (Stoji i et al., 2008). Tako e, dodavanje maltoze u podlogu je imalo negativan efekat na klijavost embriona *P. heldreichii*.

Generalno, saharoza i glukoza su jednako povoljne za regeneraciju izdanaka kod sva tri karanfila, izuzev na MS podlogama kod *D. serotinus*.

Posmatraju i broj izdanaka koji se formira iz postavljenog eksplanta uo ljiivo je da zna ajan uticaj imaju i vrsta i koncentracija še era, što je naro ito izraženo kod *D. serotinus* (tabela 95). Me utim, najpovoljnije vrednosti kod sva tri karanfila su dobijene na podlogama koje sadrže saharozu (30 gL⁻¹) i glukozu (30 gL⁻¹), a kod *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* zadovoljavju i rezultati su dobijeni i na podlogama sa 30 gL⁻¹ fruktoze.

Sli no, na podlogama sa saharozom i glukozom su se formirali i najduži izdanci, a najpovoljniji uticaj na izduživanje izdanaka kod sva tri karanfila su imale koncentracije 30 gL⁻¹, s tim da je visok procenat izdanaka dužih od 20 mm kod *D. serotinus* bio i na podlogama sa 50 gL⁻¹ saharoze i glukoze, a kod *D. pinifolius* i *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* na podlogama sa 10 gL⁻¹ pomenutih še era. Me utim, prilikom mikropropagacije *N. rtanjensis* dužina izdanaka na medijumima sa najmanjom koncentracijom še era je mala i pove ava se sa rastom koncentracije še era (Miši , 2004).

Prose an broj nodusa kod *D. serotinus* i *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* je bio visok na podlogama sa 30 gL⁻¹ saharoze, a kod *D. pinifolius*, pored saharoze i na podlogama sa 30 gL⁻¹ glukozom, dok su kod sva tri karanfila izrazito nepovoljan efekat imale podloge sa visokom koncentracijom še era (70 gL⁻¹), bez obzira na njegovu vrstu.

Nepovoljno dejstvo niže koncentracije še era (10 gL^{-1}) na razvoj izdanaka je bilo o ekivano i može se objasniti ograničenom fotosintetičkom aktivnošću u *in vitro* uslovima. Sa jedne strane, za pravilan razvoj kulture u uslovima *in vitro* neophodno je dodavanje izvora ugljenika u podlogu. Kao što je već rečeno, saharoza je najčešće korišćeni šećer, međutim, njeno prisustvo deluje inhibirajuće na fotosintezu (Thorpe et al., 2008). Smanjivanjem koncentracije saharoze u podlozi moguće je povećati intenzitet fotosinteze (Langford i Wainwright, 1987), ali se time usporava rast kultura. Sposobnost fotosinteze u kulturi *in vitro* je ograničena i niskim koncentracijama ugljendioksida (Vinterhalter i Vinterhalter, 1996, George i Davies, 2008). Zbog svega toga danas se sve više sprovode istraživanja vezana za fotoautotrofnu metodu mikropropagacije gde se u kulturu dodaje CO_2 , a redukuje ili potpuno eliminiše šećer iz hranljivih podloga (Kozai, 1991, Cristea, 2010).

Ipak, visoke koncentracije šećera mogu biti nepovoljne za razvoj kultura. Tako, kod sva tri ispitana taksona, sa porastom koncentracije šećera na 50 gL^{-1} razvoj eksplanata je i dalje bio uspešan, međutim na koncentracijama od 70 gL^{-1} došlo je do inhibiranja rasta, što prema navodima Thorpe et al (2008) može biti i posledica visokog osmotskog pritiska hranljive podloge, jer tada dolazi do otežanog usvajanja vode iz hranljive podloge i rezultat ovakvih uslova jeste smanjen intenzitet rasta i deobaljenja, što generalno dovodi do redukovanog rasta biljaka (Kozai i Kubota, 2005, Thorpe et al., 2008).

Na podlogama sa fruktozom kod sva tri karanfila razvoj eksplanata je bio slab, što je zabeleženo i pri mikropropagaciji vrste *Nepeta rtanensis* gde je fruktoza pokazala daleko slabije rezultate u pogledu rasta i razvoja eksplanata u odnosu na iste koncentracije saharoze i glukoze (Mišić, 2004). Vinterhalter i Vinterhalter (1996) navode da prilikom autoklaviranja fruktoza značajno snižava pH vrednost medijuma što se potvrdilo i našim istraživanjima, a niska pH vrednost može prouzrokovati da se medijum ne stegne nakon autoklaviranja, što je takođe potvrđeno u ovom radu. Medijumi sa većom koncentracijom šećera su bili ređi i eksplanti su na njih znatno teže postavljani. Prema Thorpe et al (2008) razmekšavanje hranljive podloge je takođe i posledica veće hidrosolubilnosti fruktoze u odnosu na druge šećere. Usvajanje hranljivih supstanci iz ovakvih podloga je otežano. Još jedan od uzroka kontradiktornih rezultata pri korišćenju fruktoze jeste i različita osetljivost biljnih tkiva

na furfural i metil – furfural. Ove toksine supstance nastaju tokom autoklaviranja hranljivih podloga, a naročito kad su one snabdevene fruktozom (Thorpe et al., 2008). Rešenje problema sa povećanjem kiselosti podloge nakon autoklaviranja bi se moglo potražiti u povećanju pH vrednosti medijuma, tako da se medijumima sa višim koncentracijama šećera pH vrednost pre autoklaviranja povećati i to je i urađeno prilikom postavljanja ogleda, pH vrednost je podešena na 6,3, ali uprkos tome na podlogama sa fruktozom su zabeleženi najslabiji rezultati. Međutim, prilikom mikropropagacije paprati *Nephrolepis biserrata* (Sw.) Schott. istraživana je veza između pH vrednosti medijuma i različitih koncentracija šećera, u ovom slučaju saharoze. Najbolji rezultati su postignuti na pH vrednosti 7, čak i u slučaju visokih koncentracija šećera (Ambrosio, de Melo, 2004).

Prilikom ispitivanja promene pH vrednosti podloge nakon autoklaviranja i nakon gajenja kulture *D. serotinus* konstatovano je da su na opadanje pH vrednosti podloge uticali i tip šećera i njegova koncentracija (tabela 115). Podloge sa fruktozom su nakon autoklaviranja bile kiselije (3,5-4,2) od podloga koje su sadržale saharozu (5,0-5,6) ili glukozu (4,4-5,4). Takođe, što je veća koncentracija šećera bila u podlozi, to je pH vrednost više opala nakon autoklaviranja. Treba istaći i činjenicu da i sama biljka tokom kultivisanja može značajno promeniti pH podloge na kojoj raste (Skirvin et al., 1986), diferencijalnim usvajanjem azota u vidu nitrata ili amonijuma. Pošto asimilacija NH_4^+ rezultuje stvaranjem efluksa H^+ jona, koji se izlakuje u hranljivu podlogu, dolazi do zakiseljavanja podloge (Thorpe et al., 2008, George i de Klerk, 2008). Pokazano je da korišćenjem hranljive podloge sa NH_4^+ kao jedinim izvorom azota, pH vrednost hranljive podloge može da se spusti ispod 4.0 (Vinterhalter i Vinterhalter, 1996). To se tokom naših istraživanja i pokazalo jer je nakon 25 dana gajenja kulture *D. serotinus* pH vrednost podloga sa saharozom i glukozom dodatno opala, ali je na podlogama sa fruktozom, koje su ujedno bile i najkiselije, pH vrednost neznatno porasla. To može da bude posledica asimilacije NO_3^- jona nakon čega se stvara višak OH^- , pa dolazi do povećanja pH vrednosti podloge. Početni pH hranljive podloge određuje da li će doći do usvajanja azota u obliku NO_3^- ili NH_4^+ (Pasqua et al., 1991). Pored navedenog, na promenu pH vrednosti podloge mogu uticati i dužina i uslovi njenog skladištenja, pri čemu do sniženja pH vrednosti dolazi i nakon dužeg

uvanja podloge ili njenog skladištenja na sobnoj temperaturi na osvetljenom mestu (Skirvin et al., 1986, Owen et al., 1991).

Preliminarno ispitivanje uticaja dodavanja šećernog alkohola sorbitola na razvoj kultura *D. serotinus* dalo je različite rezultate, zavisno od tipa eksplanta i koncentracije fruktoze u podlozi. Osnovno dejstvo sorbitola se ogleda u modifikaciji vodnog potencijala medijuma, pri čemu je sorbitol higroskopan element koji stvara osmotski stres. Njegovo dodavanje ima značaj u indukciji kalusa, a pre svega za indukciju somatske embriogeneze (Benkirane et al., 2000, Rashid et al., 2002, Hassan et al., 2009), ali se dejstvo razlikuje zavisno od ispitivane vrste i dok se u nekim slučajevima može koristiti čak i kao jedini izvor ugljenika, uz potpuno izostavljanje šećera u medijumu (Swedlund i Locy, 1993), u drugim situacijama nema nikakvog efekta (Traore i Guiltinan, 2006). Pored značaja u indukciji somatske embriogeneze, sorbitol može imati pozitivno dejstvo u mikropropagaciji nekih vrsta (Marino et al., 1991, Pua i Chong, 1983, 1985). Na primer, prilikom mikropropagacije *Pyrus pyrifolia* 'Hosui' proliferacija bočnih izbojaka bila je najbolja na podlozi sa sorbitolom (u poređenju sa podlogama sa saharozom, fruktozom, laktozom, glukozom, maltozom i manitolom), a dodavanje sorbitola je imalo pozitivnog efekta i na ožiljavanje izdanaka ovog kultivara (Kadota i Nimii, 2004).

Pozitivno dejstvo sorbitola u mikropropagaciji pojedinih vrsta i kultivara može biti posledica prisustva enzima sorbitol oksidaze ili sorbitol dehidrogenaze kojima se sorbitol prevodi u glukozu, odnosno u fruktozu, čime se omogućuje njegovo dalje metabolisanje (Marino et al., 1991, Kadota i Nimii, 2004). Ipak, i pored toga, mora se obratiti pažnja na činjenicu da dugotrajno gajenje kultura na podlogama samo sa sorbitolom (više uzastopnih subkultura) može dovesti do nedostatka bora jer se mogu stvoriti kompleksna jedinjenja koja vezuju bor i čine ga nedostupnim za biljke (George i de Klerk, 2008). S obzirom da bor utiče na nivo endogene IAA i na njenu translokaciju u biljkama, nedostatak bora se manifestuje zadržavanjem IAA na mestu sinteze, zbog čega biljke imaju slabo razvijen korenov sistem.

Tokom naših istraživanja nije se ispoljilo negativno dejstvo sorbitola na razvoj izdanaka *D. serotinus*, međutim, da bi se utvrdilo da li sorbitol može da se koristi kao izvor energije prilikom mikropropagacije ove vrste, a ne samo kao osmotikum, potrebno je sprovesti dodatna detaljna istraživanja.

5.3. Ožiljavanje

5.3.1. Ožiljavanje na podlogama sa agarom

Ožiljavanje je uspješno sprovedeno, a procenat ožiljavanja je zavisio od sastava hranljive podloge, tipa eksplanta, kao i od posmatranog taksona. Kod *D. serotinus* najbolji rezultati su dobijeni na 1/2MS podlozi sa 2,68 μ M NAA gde se ožililo 75,0 - 86,7% postavljenih eksplanata (tabela 116). Na procenat ožiljavanja kod ove vrste zna ajno je uticao tip eksplanta (tabela 117), pa je procenat ožiljenih nodusnih reznica i terminalnih pupoljaka (85,0 - 86,7%) bio znatno viši nego kod vršnih reznica sa razli itim brojem nodusa (75,0-76,7%).

Na 1/2MS podlogama procenat ožiljavanja *D. serotinus* i *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* je bio ve i nego na MS podlogama sa istom koncentracijom NAA. Me utim, ožiljavanje *D. pinifolius* je bilo uspješnije na MS podlogama (88,3% do 96,7%) nego na 1/2MS podlogama (75-86,7%).

Kod *D. pinifolius* nije bilo zna ajnih razlika izme u razli itih tipova eksplanta, procenat ožiljavanje je slabo varirao, od 95,0 do 96,7%, a kod *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* ve i procenat ožiljavanja su vršne reznice (93,4-95,0%) nego terminalni pupoljci (88,3%) i nodusne reznice (76,7%). Visok procenat ožiljavanja zabeležen je i kod karanfila - *D. superbis* ssp. *superbus* - 100 % (Mikulik, 1999), *D. deltoides* - 100% (Markovi , 2008) i *D. petraeus* ssp. *noeanus* - 91 % (Radojevi et al., 1997). Nešto niže vrednosti, sli no kao i kod *D. serotinus* tokom naših istraživanja, su zabeležene prilikom ožiljavanja *D. arenarius* ssp. *bohemicus* - 85 % (Kova , 1995), *D. gratianopolitanus* 'Spotti' - 80 % (Fraga et al., 2004), *D. gratianopolitanus* 'Frosty Fire' - 70 % (Fraga et al., 2004), i *D. caryophyllus* (62 - 80 %), zavisno od kultivara (Radojevic et al., 1990).

Kod sva tri karanfila sa pove anjem koncentracije NAA, pove avao se i broj ožiljenih bilj ica, a najve i procenat ožiljavanja zabeležen je na podlogama sa 2,68 μ M NAA, s tim da je kod *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* uticaj koncentracije NAA slabo izražen.

Prose an broj korenova koji se formirao po eksplantu se razlikovao u zavisnosti od koncentracije MS soli u podlozi, koncentracije NAA i tipa eksplanta. Kod *D. serotinus* i *D. pinifolius* ve i broj korenova se obrazovao na MS podlogama (tabele 122

i 124), a tip eksplanta nije imao uticaja na broj korenova (tabele 123 i 125). Kod *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* prose an broj korenova je bio gotovo dvostruko ve i na 1/2MS podlogama (tabela 126).

Pove anje koncentracije NAA je imalo uticaja na pove anje broja korenova *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*, ali je to slabije izraženo nego kod *D. serotinus* gde je znatno ve i broj korenova obrazovan na podlogama sa višom koncentracijom NAA, formiraju i pri tom prose no izme u 15 - 20 korenova po eksplantu. Kod *D. pinifolius* koncentracija NAA nije uticala na broj korenova i on se na MS podlogama uglavnom kretao izme u 13 i 18. Takav broj korenova je relativno visok i zabeležen je i kod vrste *D. deltoides* (Markovi , 2008). Me utim, prilikom ožiljavanja *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* prose an broj korenova je iznosio najviše 6,3 - 10,5 zavisno od tipa eksplanta, što odgovara rezultatima dobijenim sa *D. gratianopolitanus* i *D. petraeus* ssp. *noeanus*, koji su imali prose no 1 - 7 korenova po eksplantu (Radojevi et al., 1997, Fraga et al., 2004), kao i *D. ciliatus* ssp. *dalmaticus* (7,5 korenova) i *D. giganteus* ssp. *croaticus* (7,8 korenova) (Radojevi et al., 2010).

Kod *D. serotinus* najduži korenovi su obrazovani na podlogama sa nižom koncentracijom NAA, a tip eksplanta i koncentracija MS soli nisu imali uticaja. Me utim, kod *D. pinifolius* prose na dužina najdužeg korena nije zavisila od koncentracije NAA, ve od tipa eksplanta i duži korenovi su se formirali ožiljavanjem izdanaka sa razli itim brojem nodusa. Jedino je kod *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* bio izražen uticaj koncentracije MS soli i na 1/2MS podlogama formirani su duži korenovi, a sama koncentracija NAA nije imala zna ajnijeg uticaja.

U literaturi je poznato da sa porastom koncentracije auksina obi no broj korenova po eksplantu raste, a njihova dužina opada (Vinterhalter i Vinterhalter, 1996), što se kod *D. serotinus* i pokazalo, ali ne i kod *D. pinifolius*. Sli no, ni prilikom ožiljavanja *D. deltoides* koncentracija NAA nije imala uticaja na broj i dužinu korenova (Markovi , 2008). Tako e, pri ožiljavanju *D. gratianopolitanus* dodavanje razli itih koncentracija auksina - NAA, IBA i IAA (0,5 i 1 mgL⁻¹) nije zna ajno uticalo na broj formiranih korenova (Fraga et al., 2004).

5.3.2. Ožiljavanje na podlogama bez agara

Može se reći i da je ožiljavanje na podlogama bez agara, sa peskom i perlitom bilo gotovo bezuspešno, sa velikim brojem nekrotiranih biljaka (55,6% - 100%). Iako su više koncentracije NAA (2,68 μ M) imale povoljnije dejstvo, ni u tom slučaju procenat ožiljavanja nije prešao 25% ni kod jedne vrste karanfila, a uglavnom je bio znatno niži.

Pretpostavlja se da jedan od uzroka visokog procenta nekroza visok sadržaj vlage u podlozi, odnosno nedostatak aeracije, što nije pogodovalo eksplantima, naročito onima manjih dimenzija (nodusne i vršne reznice). Sama metoda ožiljavanja je bila vrlo specifična. Kao što je već navedeno, korišćen je klasičan supstrat tretiran MS rastvorom bez agara i prvih 10 dana kulture su gajene u sterilnim uslovima, nakon čega je uklonjena aluminijska folija na zatvaraču i istovremeno sa ožiljavanjem vršena je aklimatizacija. Međutim, kako je MS podloga bila teška, prvih 10 dana kulture, i pored dodavanja potporne komponente, po svojim karakteristikama odgovara kulturi *in vitro* na teškoj podlozi, a kod takvih kultura aeracija podloga je veoma važna (George, 2008). Međutim, sličan metod ožiljavanja istovremeno sa aklimatizacijom su prilično uspešno primenili Benson et al. (2000) prilikom mikropropagacije *Primula scotica*, koristeći perlit, vermikulit, treset i komercijalno proizveden kompost koje su autoklavirali i tretirali sterilnim MS mineralnim rastvorom. Ipak, u njihovom radu nije precizirana količina supstrata, ni količina mineralnog rastvora, odnosno nije poznat odnos težine i vrste komponente, zbog čega se rezultati dobijeni u našim istraživanjima ne mogu adekvatno uporediti sa rezultatima koje su dobili Benson et al. (2000).

Takođe, istraživanja Benson et al. (2000) su pokazala da aklimatizacija značajno zavisi od tipa supstrata koji je korišćen, najpovoljnije rezultate su dobili koristeći treset, komercijalni kompost i perlit, a najslabije koristeći vermikulit, dok u našem radu su bolji rezultati postignuti korišćenjem peska u odnosu na perlit. Međutim, prilikom ožiljavanja izdanaka *D. arenarius* ssp. *bohemicus* u uslovima *ex vitro* bolji rezultati su postignuti korišćenjem perlita jer se u mešavini perlita i peska (1 : 2) ožiljilo 65 %, a u perlitu 73 % izdanaka (Kováč, 1995). Uticaj sastava supstrata na intenzitet ožiljavanja u uslovima *ex vitro* izdanaka bio je prisutan i kod vrste *D. deltoides* (Marković, 2008).

5.4. Aklimatizacija

Ožiljene biljice sva tri karanfila su uspješno aklimatizovane, a procenat aklimatizacije se kod *D. serotinus* kretao od 77,7% do 88,9%, kod *D. pinifolius* od 90,0 do 95,5% i kod *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* od 85,5 do 90,0%, zavisno od tipa eksplanta iz kog se obrazovala ožiljena biljica (tabele 144, 146 i 148). Visok procenat aklimatizacije je zabeležen i kod drugih vrsta karanfila: *D. arenarius* ssp. *bohemicus* - 85 %, *D. gratianopolitanus* - preko 99%, *D. petraeus* ssp. *noeanus* - 100% i *D. deltoides* - 100% (Kovac, 1995, Radojević et al., 1997, Fraga et al. 2004, Marković, 2008).

Kod sva tri karanfila najveći i procenat aklimatizacije bio je na supstratu koji se sastojao iz treseta i peska u odnosu 4 : 1. Slični rezultati su zabeleženi i kod vrste *D. deltoides* (Marković, 2008) gde je na istoj mešavini supstrata koja je ujedno imala i najmanji procenat peska bila najuspešnija aklimatizacija. Međutim, tokom ovih istraživanja korišćene su mešavina treseta i peska u odnosu 1 : 1 i mešavina treseta, peska, baštenske zemlje i pregorelog stajnjaka (2 : 2 : 2 : 1), koje su po svom sastavu različite, ali između njih uglavnom nije bilo statistički značajne razlike u procentu aklimatizacije posađenih biljaka. Značajan uticaj sastava supstrata na aklimatizaciju ustanovljen je i prilikom mikropropagacije drugih vrsta (Kovac, 1995, Benson et al., 2000).

Tip eksplanta iz kog se razvila ožiljena *in vitro* biljka nije uticao na aklimatizaciju vrste *D. serotinus*, ali je imao uticaja kod *D. pinifolius* i *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* u korist ožiljenica poreklom od izdanaka sa različitim brojem nodusa u odnosu na one koje su se razvile iz nodusnih i vršnih reznica. Uticaj porekla ožiljenica na aklimatizaciju može da se tumačiti veličinom i razvijenošću u ožiljene biljice, ali ne i brojem korenova, jer se broj korenova kod *D. pinifolius* nije značajno razlikovao zavisno od tipa eksplanta, a aklimatizacija jeste. Tome u prilog idu i istraživanja Marković et al. (2012) kojima je ustanovljeno da na aklimatizaciju *D. deltoides* ne utiče broj korenova, nego razgranatost korenovog sistema.

6. ZAKLJUČCI

Osnovni cilj preduzetih istraživanja, iznalaženje optimalnih uslova mikropropagacije ugoženih taksona *D. serotinus*, *D. pinifolius* i *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*, je postignut. Protokol prikazan u ovom radu se može koristiti za mikropropagaciju ovih taksona, koja je uspešno sprovedena, a kao potvrda toga je i činjenica da su, i nakon aklimatizacije, sledeće godine, dobijene biljke cvetale. Pored toga faza multiplikacije obezbeđuje masovno razmnožavanje ovih ugroženih vrsta, što je presudno za njihovu reintrodukciju.

Sterilna kultura *in vitro* je uspešno uspostavljena kod sva tri ispitivana taksona. Za dobijanje primarnih eksplanata poslužilo je seme što je opravdano s obzirom da je neophodno otkloniti prirodnu genetsku varijabilnost pri razmnožavanju biljaka koje rastu na prirodna staništa. Klijavost semena je bila visoka, 88% - *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*, 92% - *D. pinifolius* i 96% - *D. serotinus*. Uspešna sterilizacija je postignuta korišćenjem 4% rastvora NaOCl tokom 20 minuta, koji je kao jako oksidativno sredstvo ujedno uticao i na povećanje klijavosti.

Kod sva tri ispitivana taksona najuspešnija regeneracija izdanaka je bila na podlogama sa niskom koncentracijom hormona: 0,44 μ M BAP i 0,54 μ M NAA, razlikuju se i se zavisi od tipa eksplanta i koncentracije MS soli u podlozi. Tako, kod *D. serotinus* procenat pravilno regenerisanih izdanaka na MS podlogama bio je od 65% (nodusne reznice) do 83% (vršne reznice), a na 1/2MS podlogama od 87% (nodusne reznice) do 100% (vršne reznice); kod *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* od 98% (nodusne reznice) do 100% (terminalni pupoljci i vršne reznice) i na 1/2MS i na MS podlogama; a kod *D. pinifolius* iz svih postavljenih eksplanata (100%) su se regenerisali pravilno razvijeni izdanci, bez obzira na tip eksplanta i koncentraciju mineralnih soli (1/2MS ili MS).

Vrsta *D. serotinus* je podložna vitrifikaciji, a procenat vitrifikovanih eksplanata je prelazio 20% u pojedinim slučajevima. Međutim, vitrifikacija kod ove vrste se može uspešno redukovati korišćenjem niskih koncentracija fitohormona (0,44 μM BAP i 0,54 μM NAA), dodavanjem MS soli u upola manjoj koncentraciji (1/2MS podloga) i gajenjem vršnih reznica umesto terminalnih pupoljaka i nodusnih reznica.

Prosečan broj izdanaka u fazi multiplikacije je bio prilično varijabilan i bio je kod *D. serotinus* od 3,6 - 10,1 (MS podloge) i od 3,6 - 7,2 (1/2MS podloge); kod *D. pinifolius* od 3,1 - 15,4 (MS podloge) i od 2,5 - 10,3 (1/2MS podloge), a kod *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* od 1,7 do 4,6 (MS podloge) i od 1,7 do 4,4 (1/2MS podloge). Pri tome, uticaj ispitivanih faktora, koncentracije hormona, koncentracije MS soli i uticaj tipa eksplanata su se različito manifestovali zavisno od posmatranog taksona. Kod *D. pinifolius* su svi posmatrani faktori značajno uticali na prosečan broj izdanaka, za razliku od *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* gde ni jedan od ispitivanih faktora nije imao statistički značajan uticaj na broj izdanaka. Međutim, kod *D. serotinus* broj izdanaka se nije značajno razlikovao zavisno od tipa eksplanata, ali je zato postojao statistički značajan uticaj koncentracije hormona i koncentracije MS soli u podlozi.

Posmatrajući i dužinu izdanaka, na većini hranljivih podloga, kod sva tri taksona, dominiraju izdanci kraći od 10 mm, a izuzetak predstavljaju podloge sa niskom koncentracijom fitohormona (0,44 μM BAP i 0,54 μM NAA), gde je uglavnom manje od 50% izdanaka bilo kraće od 10 mm. Uticaj koncentracije mineralnih soli u podlozi uopšte je jedino kod *D. serotinus*, gde su izdanci koji su se razvili na 1/2MS podlogama bili kraći od izdanaka obrazovanih na MS podlogama. Slično i prosečna dužina internodija je prvenstveno zavisila od koncentracija BAP i NAA i kod sva tri ispitivana taksona je bila od 1,7 do 4,2 mm. Najkraće internodije su bile na podlogama sa visokom koncentracijom BAP (8,88 μM), ili na podlogama sa niskom koncentracijom NAA (0,54 μM) i višom koncentracijom BAP (2,22 μM i 4,44 μM), najduže internodije su formirane na podlogama sa niskim koncentracijama hormona (0,44 μM BAP i 0,54 μM NAA).

Prosečan broj nodusa je bio varijabilan i kod *D. serotinus* je iznosio od 2,6 do 15,3, kod *D. pinifolius* je bio nešto niži, od 1,0 do 9,7, a kod *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* od 2,7 do 12,5.

Prilikom ispitivanja uticaja pH vrednosti podloge na razvoj izdanaka u fazi multiplikacije, posmatraju i stepen regeneracije normalno razvijenih izdanaka i ostale parametre kojima se definiše uspešnost multiplikacije izdanaka (broj izdanaka, broj nodusa, dužina izdanaka), pokazano je da optimalna pH vrednost za *D. pinifolius* iznosi 5,8, a *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* se uspešno može gajiti na podlogama ija je pH vrednost 5,8 ili 6,3. Tako e, iako *D. serotinus* na svom prirodnom staništu raste na alkalnom zemljištu (pH = 8,0) optimalna pH vrednost podloge je 5,8, a zadovoljavaju i rezultati se postižu i na 6,8, dok dalje pove anje pH vrednosti inhibira rast izdanaka i dovodi do pojave nekroza i vitrifikacija. Pored uticaja na razvoj izdanaka, pove avanje pH vrednosti podloge dovelo je do pove anja broja vitrifikovanih izdanaka kod vrste *D. serotinus*, odnosno do pojave vitrifikacije kod *D. pinifolius* i *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*.

Kao izvor ugljenika u podlogama za umnožavanje izdanaka najpovoljnijom se pokazala saharoza u koncentraciji 30 gL^{-1} kod sva tri ispitivana karanfila, a zadovoljavaju i rezultati su dobijeni i koriš enjem 30 gL^{-1} glukoze, dok fruktozu treba izbegavati. Nakon autoklaviranja pH vrednost podloge opada, a stepen zakišeljavanja zavisi od vrste i koncentracije še era: najmanje opada kada se koristi saharoza, a najviše ukoliko je u podlozi fruktoza. Tako e, pove anje koncentracije še era u hranljivoj podlozi dovodi do ve eg zakišeljavanja podloge nakon autoklaviranja, tako da se nepovoljan uticaj viših koncentracija še era ispoljava i zbog suviše kisele podloge, kao i zbog suviše visokog osmotskog pritiska podloge.

Preliminarno ispitivanje uticaja dodavanja še ernog alkohola sorbitola na razvoj kultura *D. serotinus* dalo je razli ite rezultate, zavisno od tipa eksplanta i koncentracije fruktoze u podlozi, ali se nije ispoljilo negativno dejstvo sorbitola na razvoj izdanaka. Me utim, da bi se utvrdilo da li sorbitol može da se koristi kao izvor energije prilikom mikropropagacije karanfila, potrebno je sprovesti dodatna detaljnija istraživanja.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaklju iti da optimalna podloga za multiplikaciju *D. serotinus* sadrži 1/2MS koncentraciju mineralnih soli, $0,44 \mu\text{M}$ BAP i $0,54 \mu\text{M}$ NAA, a kao eksplante treba koristiti vršne reznice. U tom, slu aju faktor multiplikacije iznosi 9,5, procenat pravilno razvijenih izdanaka je najve i, a vitrifikacija je svedena na minimum. Na taj na in bi se za samo 6 subkultura (150 dana) od jedne vršne reznice *D. serotinus* dobilo 77378 novih.

Hranljiva podloga za *D. pinifolius* treba da sadrži MS koncentraciju mineralnih soli, 2,22 μ M BAP i 0,54 μ M NAA, jer je na toj podlozi procenat regeneracije pravilno razvijenih izdanaka bio maksimalan (100%), a faktor multiplikacije najviši (15,4) korišćenjem vršnih reznica. Za 6 subkultura (150 dana) bi se od jedne vršne reznice dobilo 866171 novih.

Za razmnožavanje *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* treba koristiti vršne reznice, a optimalna podloga u tom slučaju sadrži 1/2MS mineralne soli, 2,22 μ M BAP i 0,54 μ M NAA. Kako je procenat regeneracije pravilno razvijenih izdanaka iznosio 98,3, faktor multiplikacije u tom slučaju je 4,0, stoga se za 6 subkultura (150 dana) od jednog početnog eksplanta može dobiti 1024 novih vršnih reznica.

Za ožiljavanje eksplanta sva tri ispitivana taksona potrebno je koristiti podloge sa 2,68 μ M NAA. Međutim, *D. serotinus* treba ožiljavati na 1/2MS podlogama, a kao eksplante koristiti nodusne reznice i terminalne pupoljke jer se oni ožiljavaju u većem procentu (85 - 86%) od vršnih reznica (75 - 76%). *D. pinifolius* treba ožiljavati na MS podlogama (ožiljavanje 95,0-96,0%), a uspešno se mogu koristiti svi tipovi eksplanta (nodusne i vršne reznice i terminalni pupoljci). Kod *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* ožiljavanje treba vršiti na 1/2MS podlogama, pri tom koristiti vršne reznice (93-95% ožiljenih), a izbegavati korišćenje nodusnih reznica i terminalnih pupoljaka.

Prosečan broj korenova koji se formira tokom *in vitro* ožiljavanja ispitanih taksona ne zavisi od tipa eksplanta već od koncentracije MS soli u podlozi, i kod *D. serotinus* i *D. pinifolius* je veći i na MS podlogama, a kod *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* na podlogama 1/2MS podlogama. Uticaj povećanja koncentracije NAA na formiranje većeg broja korenova je bio prisutan kod *D. serotinus* i *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*, ali ne i kod *D. pinifolius*. Koncentracija NAA je uticala i na dužinu korenova kod *D. serotinus*, formirani su duži korenovi na podlogama sa nižom koncentracijom NAA. Kod *D. pinifolius* i *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus* na dužinu korenova NAA nije imala uticaja, ali tip eksplanta jeste i duži korenovi su formirani kod vršnih reznica, nego kod nodusnih reznica i terminalnih pupoljaka.

Aklimatizacija ispitivanih karanfila je bila uspešna, a procenat aklimatizacije je prelazio 88% kod *D. serotinus*, 95% kod *D. pinifolius* i dostigao 90% kod *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*. Procenat aklimatizacije karanfila zavisio je od vrste supstrata koji se koristi, a kod sva tri taksona najpovoljniji rezultati su dobijeni

koriš enjem mešavine treseta i peska u odnosu 4 : 1. Tako e, tip eksplanta iz kog se razvila ožiljena *in vitro* biljka je imao uticaja na aklimatizaciju *D. pinifolius* i *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*, gde za aklimatizaciju treba koristiti ožiljene vršne reznice, dok kod *D. serotinus* poreklo ožiljenih biljica nije imalo uticaja na aklimatizaciju.

Ožiljavanje na podlogama bez agara istovremeno sa aklimatizacijom, uz dodatak sterilnog peska ili perlita kao potporne komponente se ne preporučuje ni kod jednog od ispitivanih karanfila zbog velikog procenta nekrotiranih izdanaka. Stoga se preporučuje primena autotrofnog sistema mikropropagacije (photoautotrophic micropropagation system - PMS) u razmnožavanju karanfila.

Promenom preporu enog protokola, ukoliko bi se sterilna kultura uspostavila u leto, neposredno po sakupljanju semena, nakon 6 subkultura u fazi multiplikacije, ožiljavanja *in vitro* i aklimatizacije dobijenih biljaka koja bi se u tom slučaju okončala u proleće naredne godine, dobilo bi se od samo jednog klijavca 115757 novih biljaka *D. serotinus*, 1645725 biljaka *D. pinifolius* i 876 novih biljaka *D. giganteiformis* ssp. *kladovanus*.

Sadni materijal dobijen tokom ovih istraživanja je vitalan i može se koristiti za ispitivanje mogućnosti i postupka razmnožavanja ovih vrsta klasičnim metodama, što potvrđuje visoko preživljavanje biljaka u preliminarnim ogledima za reintrodukciju u podnožju Kosmaja. Na taj način bi se obezbedila dovoljna količina za sadnju na prirodnom staništu, kao i za obogaćenje asortimana karanfila na našem tržištu. Međutim, za pravilno sprovedenu i uspešnu *ex situ* i *in situ* konzervaciju, neophodno je sprovesti detaljna istraživanja genetike strukture populacija ovih karanfila, kao i detaljna istraživanja ekologije i stepena ugroženosti drugih vrsta na staništima istraživanih karanfila. Takođe, treba razmotriti faktore koji deluju na njihovom staništu, a naročito na lokalitetima gde se preporučuje reintrodukcija ovih taksona i neophodno je napraviti predviđanje promene dejstva i interakcije spoljašnjih faktora na tim staništima kako bi reintrodukcija bila dugoročno uspešna. Protokol razmnožavanja prikazan u ovom radu je samo jedan korak ka multidisciplinarnom pristupu neophodnom za uspešnu konzervaciju ovih taksona.

7. LITERATURA

- Abdul-Baki, A. A. (1974): Hypochlorite and tissue sterilization, *Planta* 115 (373-376)
- Acosta M., Oliveros-Valenzuela M.R., Nicolás C., Sánchez-Bravo C.J. (2009): Rooting of carnation cuttings: The auxin signal, *Plant Signaling et Behavior* 4(3) (234–236)
- Albrecht M.A., Guerrant E.O., Maschinski J., Kennedy K. (2011): A long-term view of rare plant reintroduction, *Biological Conservation* 144(11) (2557-2558)
- Allen W.H. (1994): Re-introduction of endangered plants, *Bioscience* 44 (65-69)
- Altvorst A.C. van, Koehorst H.J.J., Bruinsma T., Dons, J.J.M. (1994): Improvement of adventitious shoot formation from carnation leaf explants, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 37 (87-90)
- Altvorst A.C. van, Koehorst H.J.J., Bruinsma T., Jansen J., Custers J., De Jong J., Dons J.J.M. (1992): Adventitious shoot formation from *in vitro* leaf explants of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.), *Scientia Horticulturae* 51 (223-235)
- Altvorst A.C. van, Yancheva S., Dons H. (1995): Cells within the nodal region of carnation shoots exhibit a high potential for adventitious shoot formation, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 40 (151-157)
- Ambrosio S.T., de Melo N.F. (2004): Interaction between sucrose and pH during *in vitro* culture of *Nephrolepis biserrata* (Sw.) Schott (Pteridophyta), *Acta Botanica Brasilica* 18(4) (809-813)
- Anderson N.O. (2005): *Breeding Flower Seed Crops*. "Flower Seeds, Biology and Technology", Ured. McDonald, M.B., Kwong, F.Y., CABI Publishing, CAB

International, (53-86)

Anonymous (1988): United Nations Economic Commission for Europe, ECE Declaration on Conservation of Flora, Fauna, and Their Habitats, Environmental Conservation 15(2) (183 - 183)

Anonymous (2010): Rules Proposals for the International Rules for Seed Testing 2011 Edition, International Seed Testing Association. (<http://www.seedtest.org/upload/cms/user/05-2010-OMRulesProposalsfor2011Edition.pdf>) (pristupljeno/accessed 2012)

Arditti J., Krikorian A.D. (1996): Orchid micropropagation: the path from laboratory to commercialization and an account of several unappreciated investigations, Botanical Journal of the Linnean Society 122 (183–241)

Armstrong D.P., Seddon P.J. (2008): Directions in reintroduction biology, Trends in Ecology et Evolution 23 (20–25)

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

Baque M.A., Shin Y.K., Elshamari T., Lee E.J., Paek K.Y. (2011): Effect of light quality, sucrose and coconut water concentration on the micropropagation of *Calanthea* hybrids ('Bukduseong' x 'Hyesung' and 'Chunkwang' x 'Hyesung'), Australian Journal of Crop Science 5(10) (1247-1254)

Barghchi M. (1988): Micropropagation of *Alnus cordata* (Loisel.) Loisel., Plant Cell Tissue Organ Culture 15 (233-244)

Barrett S.C.H., Kohn J.R. (1991): *Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation*, "Genetics and Conservation of Rare Plants", ured. Falk D.A., Holsinger K.E., Oxford University Press, Oxford. (3–30)

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)

Baumert A., Groger D., Kuzovkina I.N., Reisch J. (1992): Secondary metabolites produced by callus cultures of vari-ous *Ruta* species, Plant Cell Tissue and Organ Culture 28 (159-162)

- Bell T.J., Bowles M.L., McEachern A.K. (2003): *Projecting the success of plant population restoration with viability analysis*. "Population Viability in Plants", ured. Brigham C.A., Schwartz M.W., Springer, Berlin, (313–350)
- 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)
- Benson E., Danaher J.E., Pimbley I.M., Anderson C.T., Wake J.E., Daley S., Adams L.K. (2000): *In vitro* propagation of *Primula scotica*: a rare Scottish plant, *Biodiversity and Conservation* 9 (711-726)
- Bewley J.D., Black M. (1994): *Seeds: physiology of development and germination, 2nd Edition*, Plenum Press, New York
- Bhatia P., Ashwath N. (2005): Effect of medium pH on shoot regeneration from the cotyledonary explants of tomato, *Biotechnology* 4 (7-10)
- Bhojwani S.S., Razdan M.K. (1996): *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*, Jones and Bartlett Publishers, Inc., Boston
- Bilz M. (2011): *Dianthus serotinus*. "IUCN Red List of Threatened Species" <http://www.iucnredlist.org/details/165217/0>
- Blažen i J., Ran elovi V., Butorac B., Vukoji i S., Zlatkovi B., Žukovec D., ali I., Pavi evi D., Lakuši D. (2005): *Staništa Srbije – Priru nik sa opsima i osnovnim podacima, Rezultati projekta: "Harmonizacija nacionalne nomenklature u klasifikaciji staništa sa standardima me unarodne zajednice"*, Institut za Botaniku i Botani ka Bašta "Jevremovac", Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd
- Bonga J.M., (1985): *Tissue Culture in Forestry*, Kluwer Academic Publishers Group. Dordrecht
- Boža P. (1999): *Dianthus serotinus Waldst. et Kit.*, "Crvena knjiga flore Srbije", ured. Stevanovi V., Ministarstvo za životnu sredinu republike Srbije, Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, Zavod za zaštitu prirode Republike Srbije, Beograd, (252 – 254)
- Brar M.S., Al Khayri J.M., Klingaman G.L. (1995): *In vitro* shoot multiplication of carnation axillary buds and nodes, *In Vitro* 31 (3/2) (61)

- Buslaff J., Johnson L. (2004): *Wild Ones: Native Plants, Natural Landscapes, Landscaping with Native Plants*, United States Environmental Protection Agency
http://www.epa.gov/greenacres/wildones/wo_2004b.pdf
- Butiuc-Keul A., Suteu A., Munteanu-Delieu C., Deliu C. (2001): Study on the *in vitro* preservation of *Dianthus spiculifolius* Schur., *Contributii Botanice* 36 (137-145)
- Caplow F. (2004): *Reintroduction plan for golden paintbrush (Castilleja levisecta)*, Western Washington Fish and Wildl. Office. Washington Natural Heritage Program, Washington Dep. of Natural Resources Olympia, WA
- Carvalho L., Santos P., Amâncio S. (2002): Effects of light intensity and CO₂ concentration during the acclimatisation of *in vitro* grapevine, *Vitis* 41 (1-6)
- Chan Y.H. (2005): Biostatistics 305. Multinomial Logistic Regression, Singapore
Medical Journal 46: (259-68)
http://www.nuhs.edu.sg/wbn/slot/u3344/Biostats305_Multinomial.pdf
- Clark J.A., Hoekstra J.M., Boersma P.D., Kareiva P. (2002): Improving U.S. Endangered Species Act recovery plans: key findings and recommendations of the SCB recovery plan project, *Conservation Biology* 16 (1510-1519)
- Coenen C., Lomax T.L. (1998): The *Diageotropica* gene differentially affects auxin and cytokinin responses throughout development in tomato, *Plant Physiology* 117 (63–72)
- Cogoni D., Fenu G., Concas E., Bacchetta G. (2013): The effectiveness of plant conservation measures: the *Dianthus morisianus* reintroduction, *Oryx* 47 (203-206).
- Collett C.E., Harberd N.P., Leyser O. (2000): Hormonal interactions in the control of *Arabidopsis* hypocotyl elongation, *Plant Physiology* 124 (553–562)
- Cook E.L., Staden J. van (1988): The carnation as a model for hormonal studies in flower senescence, *Plant Physiology and Biochemistry* 26 (793-807)
- Correll M.J., Weathers P.J. (2001): One-step, *in vitro* acclimatization of carnation using a mist reactor, *Biotechnology and Bioengineering* 73(3) (253-258)
- 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., 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. (2010): Photoautotrophic *in vitro* culture of endemic and endangered *Dianthus* species from Romania. Todesco, Cluj-Napoca.
- Crouch N.R., Staden J. van (1993): *In vitro* culture of *Dianthus zeyheri* subsp. natalensis, a South African carnation, *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 35 (81-85)
- Cuenca B., Vieitez A.M. (2000): Influence of carbon source on shoot multiplication and adventitious bud regeneration in *in vitro* beech cultures, *Plant Growth Regulation* 32 (1–12)
- Cullen J., Knees S., Cubey S. (1989): *The European Garden Flora, Volume 3*, Cambridge University Press, Cambridge, UK (185)
- Cullen J., Knees S., Cubey S. (2011): *The European Garden Flora Vol. 2 : Dicotyledons - Casuarinaceae to Cruciferae - A Manual for the Identification of Plants Cultivated in Europe, Both Out-of-Doors and under Glass. Second ed*, Cambridge University Press, Cambridge, UK (516)
- Dantas A.K., Majada J.P., Fernández B., Cañal M.J. (2001): Mineral nutrition in carnation tissue cultures under different ventilation conditions, *Plant Growth Regulation* 33 (237-243)
- Debnath S.C. (2005): Effects of carbon source and concentration on development of lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) shoots cultivated in *in vitro* from nodal explants, *In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 41 (145–150)
- Diao W.P., Jia Y.Y., Song H., Zhang X.Q., Lou Q.F. Chen J.F. (2009): Efficient embryo induction in cucumber ovary culture and homozygous identification of the regenerants using SSR markers, *Scientia Horticulture* 119 (246 – 251)

- Diaz-Perez J.C., Shackel K.A., Sutter E.G. (1995): Effects of *in vitro*-formed roots and acclimatization on water status and gas exchange of tissue-cultured apple shoots, *Journal of the American Society for Horticultural Science* 120 (3) (435-440)
- Dikli N., Niketi M., Tomovi G. (1999): *Dianthus giganteiformis ssp. kladovanus (Degen) Soo*, "Crvena knjiga flore Srbije", ured. Stevanovi V., Ministarstvo za životnu sredinu republike Srbije, Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, Zavod za zaštitu prirode Republike Srbije, Beograd, (249 – 251)
- Dole J.M., Wilkins H.F. (2004): *Floriculture, Principles and Species. 2nd Ed*, Pearson Prentice Hall, New Jersey
- Dodds, J.H. (1991): *In vitro methods for conservation of plant genetic resources*. Chapman and Hall, London, UK
- Draper S.R. (1985): International rules for seed testing, *Seed science and technology* 13 (2) (300-520)
- uki M. (1985): Uticaj giberelina i auksina na rast potomstva razli itih genotipova breze (*Betula pendula* Roth.), *Glasnik Šumarskog fakulteta* 64, Univerzitet u Beogradu - Šumarski fakultet, Beograd (359-366)
- Ebrahim M.H.K., Ibrahim I.A. (2000): Influence of medium solidification and pH value on *in vitro* propagation of *Maranta leuconeura* cv. Kerchoviana, *Scientia Horticulturae* 86 (211-221)
- Elzinga C.L., Salzer D.W., Willoughby J.W. (1998): *Measuring and Monitoring Plant Populations*, Technical Reference 1730-1., USDI Bureau of Land Management Denver, Colorado
- Errea P., Garay L., Marin J.A. (2001): Early detection of graft incompatibility in apricot (*Prunus armeniaca*) using *in vitro* techniques. *Physiologia Plantarum* 112 (135–141)
- Evenor D., Reuveni M. (2004): Micropropagation of *Achillea filipendulina* cv. Parker. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 79 (91-93)
- Fal M.A., Majada J.P., González A., Tamés R.S. (1999): Differences between *Dianthus caryophyllus* L. cultivar in *in vitro* growth and morphogenesis are related to their ethylene production, *Plant Growth Regulation* 27 (2) (131-136)

- Falk D.A., Millar C.I., Olwell M. (1996): *Guidelines for developing a rare plant reintroduction plan*, "Restoring diversity: strategies for reintroduction of endangered plants", Island Press, Washington, D.C., (453–490)
- 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)
- Fraga M., Mertxe A., Ellul P., Borja M. (2004): Micropropagation of *Dianthus gratianopolitanus*, *HortScience* 39 (4) (112-115)
- 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)
- Fu X., Harberd N. P. (2003): Auxin promotes *Arabidopsis* root growth by modulating gibberellin response, *Nature* 421 (740-743)
- Gaji M. (1970): *Rod Dianthus L.*, "Flora SR Srbije", ured. Josifovi M., Srpska akademija nauka i umetnosti, odeljenje prirodno-matemati kih nauka, Beograd
- Gaji M. (1986): *Flora i vegetacija Suboti ko-horgoške peš are*, Šumarski fakultet Univerzitet u Beogradu, Beograd - Šumsko gazdinstvo, Subotica
- Gamon J., Dunwiddie P., Thomas T. (2000): *Recovery plan for golden paintbrush (Castilleja levisecta)*, U.S. Fish and Wildlife Service, Portland, OR
- Garrido G., Cano E.A., Arnao M.B., Acosta M., Sanchez-Bravo J. (1996): Influence of cold storage period and auxin treatment on the subsequent rooting of carnation cuttings, *Scientia Horticulturae* 65 (73-84)
- Garrido G., Guerrero J.R., Cano E.A., Acosta M., Sánchez-Bravo J. (2002): Origin and basipetal transport of the IAA responsible for rooting of carnation cuttings, *Physiologia Plantarum* 114 (2) (303-312)
- Gaspar T., Kevers C., Penei C., Greppin H., Reid D.M. Thorpe T. (1996): Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture, *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 32 (272–289)

- George E.F. (2008): *Plant Tissue Culture Procedure - Background* "Plant Propagation by Tissue Culture, 3rd Edition", ured. George E.F., Hall M.A., De Klerk D.J., Springer, AA Dordrecht, Netherlands, (1-29)
- George E.F., Davies, W. (2008): *Effects of the Physical Environment*, "Plant Propagation by Tissue Culture, 3rd Edition", ured. George E.F., Hall M.A., De Klerk D.J., Springer, AA Dordrecht, Netherlands, (423-464)
- 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)
- Giridhar P., Ravishankar G.A. (2004): Efficient micropropagation of *Vanilla planifolia* Andr. under the influence of thidiazuron, zeatin and coconut milk, *Indian Journal of Biotechnology* 3 (113–118)
- Godefroid S., Piazza C., Rossi G., Buord S., Stevens A.D., Aguraju R., Cowell C., Weekley C.W., Vogg G., Iriando J.M., Johnson I., Dixon B., Gordon D., Magnanon S., Valentin B., Bjureke K., Koopman R., Vicens M., Virevaire M., Vanderborcht T. (2011): How successful are plant species reintroductions? *Biological Conservation* 144 (672–682)
- Grbi M. (1992): Unapre enje rasadni ke proizvodnje nekih brestova (*Ulmus L.*) *autovegetativnim metodama razmnožavanja*, Doktorska disertacija, Šumarski fakultet, Beograd
- Grbi M. (1996): *Specifi nost bioloških osobina sadnog materijala za potrebe ure enja prirodnih predela*, "Planiranje i ure enje predela", ured. Lješevi M., Dabi D., Udruženje urbanista Srbije, Beograd, (117-121)
- Grbi M. (2003): Dormantnost i klijanje semena - mehanizmi, klasifikacije i postupci, *Glasnik Šumarskog fakulteta* 87 (25 - 49)
- Grbi M. (2004): *Vegetativno razmnožavanje ukrasnog drve a i žbunja*, I.P. „Tragovi", I.K.P. „NeetBo", Beograd
- Guerrant E.O., Kaye T.N. (2007): Reintroduction of rare and endangered plants: common factors, questions and approaches, *Australian Journal of Botany* 55 (362–370)

- Guerrant E.O.Jr., Fiedler P.L. (2004): *Accounting for Sample Decline During Ex Situ Storage and Reintroduction*, "Ex Situ Plant Conservation: Supporting Species Survival in the Wild", ured. Guerrant E.O.Jr., Havens K., Maunder M., Island Press. Covelo, CA. (365-385)
- Guerrant E.O.Jr., Raven A. (2003): *Supporting In Situ Conservation: the Berry Botanic Garden, an Ex Situ Regional Resource in an Integrated Conservation Community*, "Seed Conservation: Turning Science into Practice", ured. Smith V.J., Dickie V., Linington V., Pritchard H.W., Probert R.J., Royal Botanic Gardens, Kew, London, UK
- Guerrant, EO Jr., Havens K., Maunder M. (2004): *Ex Situ Plant Conservation: Supporting Species Survival in the Wild*, Island Press. Covelo
- Halmagyi A., Lambardi, M. (2007): *Cryopreservation of carnation (Dianthus caryophyllus L.) using different approaches*, International Scientific Conference, Propagation of Ornamental Plants, Sofia, Bulgaria
- Hamill J.D., Pental, D., Cocking E.C. (1985): Analysis of fertility in somatic hybrids of *Nicotiana rustica* and *N. tabacum* and progeny over two sexual generations, *Theoretical and Applied Genetics* 71 (3) (486-490)
- Harbage J.F., Stimart D.P. (1996): Effect of pH and 1H-indole-3-butyric acid (IBA) on rooting of apple microcuttings, *Journal of the American Society for Horticultural Science* 121 (1049-1053)
- Hartmann T.H., Kester E.D., Davies T.F. (1990): *Plant Propagation - Principles and Practices*, Prentice Hall International Inc., London, UK
- Hasan I. (2008): *Agricultural botany*, Rajat publications, New Delhi, India (115-165)
- 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)
- Havens K., Vitt P., Maunder M., Guerrant Jr. E.O., Dixon K. (2006): *Ex Situ Plant Conservation and Beyond*, *BioScience* 56(6) (525-531)
- Hill S.J., Tung P.J., Leishman M.R. (2005): Relationships between anthropogenic disturbance, soil properties and plant invasion in endangered Cumberland Plain Woodland, *Australian Ecology* 30 (775-788)

- Hitchmough J. (2008): New approaches to ecologically based, designed urban plant communities in Britain: do these have any relevance in the United States? *Cities and the Environment* 1 (2) (1-15)
- Hoekstra J.M., Clark J.A., Fagan W.F., Boersma P.D. (2002): A comprehensive review of Endangered Species Act Recovery Plans, *Ecological Applications* 12 (630–640)
- Hohn T.C. (2008). *Curatorial practices for botanical gardens*, Lanham, MD, AltaMira Press
- Holey W.D., Farmer R. (1951): Cold storage of carnation cuttings, *Horticultural Abstracts* 21 (2) (1880-1886)
- Holobiuc I., Blîndu R. (2006): Improvement of the micropropagation and in vitro medium - term preservation of some rare *Dianthus species*, *Contribuii Botanice* 41(2) (143 - 151)
- Holobiuc I., Blîndu R., Cristea V. (2009): Researches concerning in vitro conservation of the rare plant species *Dianthus nardiformis* Janka, *Biotechnology et Biotechnological Equipment* 23(2) (221-224)
- Holobiuc I., Brezeanu A., Blîndu R. (2009): *Somatic embryogenesis induction in presence of moderate osmotic stress, synthetic seeds production in rare Dianthus species from Romanian flora as a tool for ex situ conservation*, New researches in biotechnology, Proceedings of the 2nd International Symposium, Bucharest, Romania, November 19-20, Special Volume, (69-77)
- Holobiuc I., Catana R., Cristea V. (2010b): 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., Mitoi M., Blîndu R., Helepciuc F. (2010a): 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)
- Hussain M., Fareed S., Ansari S., Rahman M., Ahmad I.Z., Mohamad S. (2012): Current approaches toward production of secondary plant metabolites, *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* 4 (10-20)

- Hvoslef-Eide A.K., Preil W. (2005): *Liquid culture systems for in vitro plant propagation*, Dordrecht, The Netherlands: Springer
- Jadwiszczak K.A., Drzymulska D., Banaszek A. Jadwiszczak P. (2012): Population history, genetic variation and conservation status of the endangered birch species *Betula nana* L. in Poland, *Silva Fennica* 46(4) (465–477)
- Jain A., Kantia A., Kothari S.L. (2001): *De novo* differentiation of shoot buds from leaf-callus of *Dianthus caryophyllus* L. and control of hyperhydricity, *Scientia Horticulturae* 87 (319-326)
- Jalas J., Suominen J. (1988): *Atlas Florae Europaeae. Distribution of Vascular Plants in Europe. 3. Caryophyllaceae*, Cambridge University Press, Cambridge (208)
- Janarthanam B., Sumathi E. (2011): High Frequency Shoot Regeneration from Internodal Explants of *Santalum album* L., *International Journal of Botany* 7 (249-254)
- Janarthanam, B. Sumathi E. (2010): *In vitro* regeneration of *Justicia gendarussa* Burm., *Libyan Agriculture Research Center Journal International* (284-287)
- Jethwani V., Kothari S.L. (1993): Micropropagation of *Dianthus barbatus* and *D. chinensis* through cotyledonary node culture, *Plant Tissue Culture* 2 (91-96)
- Jethwani V., Kothari S.L. (1996): Phenylacetic acid induced organogenesis in cultured leaf segments of *Dianthus chinensis*, *Plant Cell Reports* 15 (869-872)
- Jethwani V., Sharma V.K., Kothari S.L. (1994): Micropropagation of *Dianthus chinensis* and *Dianthus barbatus* through shoot tip culture, *Journal of Indian Botanical Society* 73 (357-358)
- Jonard R., Lukman D., Schall F., Villemur P. (1990): Early testing of graft incompatibilities in apricot and lemon trees using *in vitro* callus techniques. *Scientia Horticulturae* 53 (117–128)
- Johnson K. (2002): *In vitro* conservation including rare and endangered plants, heritage plants and important agricultural plants, *Proceedings of the 7th meeting of the International Association for Plant Tissue Culture and Biotechnology*, University of New England, Armidale, Australia, (79-90)
- Josifovi M. (1970): *Flora SR Srbije II*, Srpska Akademija Nauka i Umetnosti, Odeljenje prirodno-matemati kih nauka, Beograd

- Kantia A., Kothari S.L. (2002): High efficiency adventitious shoot bud formation and plant regeneration from leaf explants of *Dianthus chinensis* L., *Scientia Horticulturae* 96 (205-212)
- Kaye T.N. (2008): Vital steps toward success of endangered plant reintroductions, *Native Plants Journal* 3 (313-322)
- Kaye T.N. (2009): *Toward successful reintroductions: the combined importance of species traits, site quality, and restoration technique*, Proceedings of the 22nd California Native Plant Society Conference: Current Threat to California's Native Flora, Strategies and Solutions, January 17–19, Sacramento, California, (99–106)
- Kaye T.N., Lawrence B. (2003): *Fitness effects of inbreeding and outbreeding on golden paintbrush (Castilleja levisecta): Implications for recovery and reintroduction*, Institute for Applied Ecology, Corvallis, Oregon and Washington Department of Natural Resources, Olympia, Washington
- Kevers C., Franck Th., Strasser R.J., Dommes J., Gaspar Th. (2004): Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 77 (181-191)
- Khah E.M., Passam H.C. (1992): Sodium Hypochlorite Concentration, Temperature and Seed Age Influence Germination of Sweet Pepper, *HortScience* 27(7) (821-823)
- Khawar Kh.M., Ozel C.A., Arslan, O. (2007): *In vitro axenic culture of Turkish Sweet William (Dianthus barbatus L.) using shoot meristem and first axillary node*, International Scientific Conference, Propagation of Ornamental Plants, Sofia, Bulgaria
- Kováč J. (1995): Micropropagation of *Dianthus arenarius* subsp. bohemicus - an endangered endemic from the Czech Republic, *Botanic Gardens Micropropagation News* 8 (106-108)
- 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)

- Kozai, T. (1991): *Micropropagation under photoautotropic conditions*, Ured. Debergh, P.C., Zimmerman, R.H., Micropropagation, Technology and Application, Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands (447-469)
- Kubota C. (2002): Photoautotrophic Micropropagation: Importance of Controlled Environment in Plant Tissue Culture. Combined Proceedings International Plant Propagators' Society 52 (609-613)
- Lake J.C., Leishman M.R. (2004): Invasion success of exotic plants in natural ecosystems: the role of disturbance, plant attributes and freedom from herbivores, *Biological Conservation* 117 (215–226)
- Langford, P.J., Wainwright, H. (1987): Effect of sucrose concentration on the photosynthetic ability of rose shoots *in vitro*. *Annals of Botany* 60 (633-640)
- Langhans R.W. (1954): Carnation cutting storage. *Horticultural Abstracts* 24(4) (4082-4086)
- Lapadatescu S., Petolescu C., Velicevici G., Bala M. (2012): *In vitro* culture initiation and phytohormonal influence on ornamental plants, *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology* 16(2) (203-205)
- Laslo V., Z pâr an M. (2011): The Effects of Coconut Extract Added to the Culture Medium on the *in vitro* Multiplication of *Chrysanthemum morifolium* Ramat., *Analele Universit ii din Oradea, Fascicula Protec ia Mediului* 17 (691-696)
- 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)
- Lee-Espinosa H., Murguía-González J., García-Rosas B., Córdova-Contreras A., Laguna-Cerda A., Mijangos-Cortés J., Barahona-Pérez L., Iglesias-Andreu L., Santana-Buzzy N. (2008): *In vitro* clonal propagation of vanilla (*Vanilla planifolia* 'Andrews'), *HortScience* 43 (454–458)
- Leifert C. Cassells AC. (2001): Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 37(2) (133 - 138)
- Leifert C., Pryce S., Lumsden P.J., Waites W.M. (1992): Effect of medium acidity on growth and rooting of different plant species growing *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 30 (3) (171-179)

- Lubomski M., Jerzy M. (1989): *In vitro* propagation of pot carnation from the stem internodes, *Acta Horticulturae* 251 (235-240)
- 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)
- Majada J.P., Centeno M.L., Feito I., Fernández B., Sanchez-Tames R. (1998): Stomatal and cuticular traits on carnation tissue culture under different ventilation conditions. *Plant Growth Regulation* 25 (2) (113-121)
- Majada J.P., Tadeo F., Fal M.A., Sánchez-Tamés R. (2000): Impact of culture vessel ventilation on the anatomy and morphology of micropropagated carnation, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 63 (3) (207-214)
- Marcu D., Cristea V., Butiuc-Keul A. (2006): Micropropagation of *Dianthus pyrenaicus* Pourr. - endemic species from Pyrenean Mountains, *Contributii botanice* 41(2) (153-159)
- Mariner R., Dreher D., Huebner K., Hill L., Wurm E. (2004): Source book on natural landscaping for local officials, Northeastern Illinois Planning Commission, Applied Ecological Services, Inc. Brodhead, Wisconsin; Thompson Dyke et Associates, Ltd Northbrook, Illinois; University of Wisconsin-Extension in Cooperation with the Wisconsin Department of Natural Resources, (14-22)
- 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)
- Markovi M. (2008): *Mogu nost razmnožavanja vrste Dianthus deltoides L. metodom mikropropagacije*, magistarski rad u rukopisu, Univerzitet u Beogradu - Šumarski fakultet, Beograd
- Markovi M., Grbi M., Sko aji D., unisijevi - Bojovi D. (2007): Uticaj balansa fitohormona na multiplikaciju izdanaka i ožiljavanje vrste *Dianthus serotinus* Waldst. et Kit., *Glasnik Šumarskog fakulteta* 95 (83-94)

- Markovi M., Grbi M., Šindeli A. (2006): Mogu nost mikropropagacije *Dianthus giganteiformis* ssp. *kladovanus* (Degen) Soo metodom proliferacije bo nih izdanaka. Glasnik Šumarskog fakulteta 94 (171-179)
- Markovi , M., Tanasi , M., Stoji , N., Bulatovi , R., Jovi , M., Vidojkovi , S., Stankovi , D. (2012): Unapre enje protokola za mikropropagaciju *Phalaenopsis* sp. direktnom regeneracijom izdanaka iz nodusnih reznica, Glasnik Šumarskog fakulteta 106 (141-150)
- Markovi M., Popovi M. (2012): Uticaj tipa eksplanta, sastava hranljive podloge i supstrata na ožiljavanje i aklimatizaciju vrste *Dianthus deltoides* L., Glasnik Šumarskog fakulteta 105, Univerzitet u Beogradu - Šumarski fakultet, Beograd (117-126)
- Maschinski J., Baggs J., Sacchi C. (2004): Seedling recruitment and survival of an endangered limestone endemic in its natural habitat and experimental reintroduction sites, American journal of botany 91(5) (689-698)
- Maunder M., (1992): Plant reintroductions: an overview, Biodiversity and Conservation 1 (51–61)
- McClelland M.T. (1990): The effects of *in vitro* and *ex vitro* root initiation on subsequent microcutting root quality in three woody plants, Plant Cell Tissue and Organ Culture 23 (115-123)
- McNeely J.A., Mooney H.A., Neville L.E., Schei P., Waage J.K. (2001): *A Global Strategy on Invasive Alien Species*, IUCN Gland, Switzerland, and Cambridge, UK
- Menges E. S. (1991): Seed germination percentage increases with population size in a fragmented prairie species, Conservation Biology 5 (158-164)
- Menges E.S. (2008): Restoration demography and genetics of plants: when is a translocation successful? Australian Journal of Botany 56 (187–196)
- Messeguer J., Arconada M.C., Mele E. (1993): Adventitious shoot regeneration in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) Scientia Horticulturae 54 (153-163)
- Miclaus M., Cristea V., Deliu C. (2003): Micropropagation on *Dianthus petraeus* W. et K. ssp. *simonkaianus* (Peterfi) Tutin, Contributii Botanice 38 (77-84)
- Mii M. (2009): Breeding of ornamental plants through interspecific hybridization using advanced techniques with a special focus on *Dianthus*, *Primula*, *Cosmos* and *Kalanchoe*, Acta Horticulturae 836 (63-72)

- Mijanovi O. (1976): *Cve arstvo 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)
- Miller C.O., Skoog F., Von Saltza M.H., Strong F. (1955) Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid, *Journal of American Chemical Society* 77 (1392)
- Miller R.M., Kaul V., Hutchinson J.F., Richards D. (1991): Adventitious shoot regeneration in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) from axillary bud explants, *Annals of Botany* 67 (35-42)
- Milosavljevi V., Ran elovi N., Zlatkovi B., Ran elovi V. (2005): *Flora silikatnog dela Rudina planine*, 8. Simpozijum o flori jugoisto ne Srbije i susednih regiona, 20.-24. jun 2005, Niš, Srbija
- 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)
- Miši D. (2004): *Mikropropagacija rtanjske metvice (Nepeta rtanjensis Dikli et Milojevi) kao efikasan na in ex situ zaštite*, Magistarski rad u rukopisu, Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd, (42-94)
- Miši D., Ghalawenji N., Grubiši D., Konjevi R. (2005a): Micropropagation and Reintroduction of *Nepeta rtanjensis*, an Endemic and Critically Endangered Perennial of Serbia, *Phyton* 45 (9-20)
- Miši D., Grubiši D., Konjevi R. (2006): Micropropagation of *Salvia brachyodon* through nodal explants, *Biologia Plantarum* 50 (473-476)
- Miyoshi, K., Mii, M. (1995): Enhancement of seed germination and protocorm formation in *Calanthe discolor* (Orchidaceae) by NaOCl and polyphenol absorbent treatments, *Plant Tissue Culture Letters* 12 (267–272)
- 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)
- Mohamed M.A.H., Alsadon A.A. (2010): Influence of ventilation and sucrose on growth and leaf anatomy of micropropagated potato plantlets, *Scientia Horticulturae* 123 (295–300)

- Moore R. (1991): *Graft compatibilities in vitro*. "Biotechnology in Agriculture and Forestry. High-Tech and Micropropagation" ured. Bajaj Y.P.S.. Springer-Verlag, Berlin (71 – 84)
- Montes S., Ramírez L., Hernández M.M., Santana N., Martínez D.L. (1997): Varietal micropropagation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L. i *Dianthus plumarius* L.) through meristem culture, *Cultivos Tropicales* 18 (1) (75-81)
- Moshkov I.E., Novikova G.V., Hall M.A., George E.F. (2008): *Plant Growth Regulators III: Gibberellins, Ethylene, Abscisic Acid, their Analogues and Inhibitors; Miscellaneous Compounds*, "Plant Propagation by Tissue Culture, 3rd Edition" ured. George E.F., Hall M.A., De Klerk D.J. Springer, AA Dordrecht, Netherlands, (227-282)
- Munshi M.K.; Hakim L., Islam M.R., Ahmed G. (2004): *In vitro* clonal propagation of banyan *Ficus benghalensis* L. through axillary bud culture, *International Journal of Agriculture and Biology* 6(2) (321-323)
- Murashige T., Skoog F. (1962):. A revised medium for growth and bioassays with tobacco tissue culture, *Physiologia Plantarum* 15 (473–497)
- Murovec J., Bohanec B. (2012): *Haploids and Doubled Haploids in Plant Breeding*, "Plant Breeding", ured. Abdurakhmonov I., (<http://www.intechopen.com/books/plant-breeding/haploids-and-doubled-haploids-in-plant-breeding>)
- Nagata T., Bajaj Y.P.S. (2001): *Somatic hybridization in crop improvement II, vol 49. Biotechnology in agriculture and forestry*, Springer, Berlin Heidelberg New York
- Nakano M., Hoshino Y. Mii M. (2001): *Somatic Hybridization in Dianthus Species*, "Somatic Hybridization in Crop Improvement II", *Biotechnology in Agriculture and Forestry Volume 49*, ured. Nagata T., Bajaj Y.P.S. (277-291)
- Nakano M., Hoshino Y., Mii M. (1994): Adventitious shoot regeneration from cultured petal explants of carnation, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 36 (15-19)
- Nakano M., Hoshino Y., Mii M. (1996): Intergeneric somatic hybrid plantlets between *Dianthus barbatus* and *Gypsophylla paniculata* obtained by elektrofusion. *Theoretical and Applied Genetics* 92 (170-172)

- Nakano M., Mii M. (1992): Protoplast culture and plant regeneration of several species in genus *Dianthus*, *Plant Cell Reports* 11 (225-228)
- Nakano M., Mii M. (1993a): Somatic hybridization between *Dianthus chinensis* and *Dianthus barbatus* through protoplast fusion, *Theoretical and Applied Genetics* 86 (1-5)
- Nakano M., Mii M. (1993b): Interspecific somatic hybridization in *Dianthus*: selection of hybrids by the use of iodoacetamide inactivation and regeneration ability, *Plant Science* 88 (203-208)
- Nakano M., Mii M. (1993c): Application of Plant Biotechnology for Breeding of Flower Crops in the Genus *Dianthus*, *Plant Tissue Culture Letters* 10 (2) (115-122)
- Nakano M., Mii M. (1993d): Callus and root formation from an intergeneric somatic hybrid between *Dianthus caryophyllus* and *Gypsophila paniculata*. *Scientia Horticulturae* 53 (13-19)
- Nambiar N., Tee C.S., Maziah M. (2012): Effects of organic additives and different carbohydrate sources on proliferation of protocorm-like bodies in *Dendrobium 'Alya Pink'*, *Plant Omics Journal* 5(1) (10-18)
- Nasib A., Ali K., Khan S. (2008): An optimized and improved method for the in vitro propagation of Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) using coconut water, *Pakistan Journal of Botany* 40 (2355-2360)
- Neel M.C. Ellstrand N. C. (2003): Conservation of genetic diversity in the endangered plant *Eriogonum ovalifolium* var. *vineum*, *Conservation Genetics* 4 (337-352)
- Nemhauser J.L., Hong F., Chory J. (2006): Different plant hormones regulate similar processes through largely non-overlapping transcriptional response, *Cell* 126 (467-475)
- Neškovi M. (1986): *Zna aj kulture tkiva i elija u oplemenjivanju biljaka, Teorijski i prakti ni aspekti kulture tkiva biljaka*, Jugoslovensko društvo za fiziologiju biljaka (3-20)
- Neškovi M., Konjevi R., ulafi LJ. (2003): *Fiziologija biljaka*, NNK - International, Beograd
- Nikoli , B., Batos, B., okeša, V., okovi , R. (2005): Effects of storage and stratification on the germination of seeds of *Pinus peuce* Gris. *Natura Montenegrina* 4 (155-159)

- Nontaswatsri C., Ruamrungsri S., Fukai S. (2008): Callus induction and plant regeneration of *Dianthus chinensis* L. and *Dianthus barbatus* L. via anther culture, Proceedings of the International Workshop on Ornamental Plants, ISHS Acta horticulturae 788 (109-114)
- Nowak B., Miczynski K., Hudy L. (2004): Sugar uptake and utilization during adventitious bud differentiation on in vitro leaf explants of 'Wegierka Zwykta' plum (*Prunus domestica*), Plant Cell Tissue and Organ Culture 76 (255–260)
- Nugent G., Wardley R.T., Lu C. (1991): Plant regeneration from stem and petal of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.), Plant Cell Reports 10 (477-480)
- Olsen S. (2007): *Encyclopedia of garden ferns*, Timber Press, Inc. Portland, Oregon, USA (64-65)
- Ostrolucka M.G., Gajdosova A., Ondruskova E., Lateekova A., Libiakova G. (2010): Effect of Medium pH on Axillary Shoot Proliferation of Selected *Vaccinium vitis-idaea* L. Cultivars, Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica 52(2) (92–96) DOI: 10.2478/v10182-010-0029-1
- Ostrolucka M.G., Libiakova G., Ondruskova E., Gajdosova A. (2004): *In vitro* propagation of *Vaccinium* species, Acta Universitatis Latviensis, Biology 676 (207–212)
- Owen, H.R., Wengerd, D., Miller, A.R. (1991): Culture medium pH influenced by basal medium, carbohydrate source, gelling agent, activated charcoal, and medium storage method. Plant Cell Reports 10 (583-586)
- Papafotiou M., Stragas J. (2009): Seed germination and *in vitro* propagation of *Dianthus fruticosus* L., VI International Symposium on New Floricultural Crops, ISHS Acta horticulturae 813 (481-484)
- Pareek A., Kantia A., Kothari S.L. (2004): *In vitro* cloning of ornamental species of *Dianthus*, Indian Journal of Biotechnology 3 (263-266)
- Pareek A., Kothari S.L. (2003): Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf cultures of ornamental species of *Dianthus*, Scientia Horticulturae 98 (449-459)
- Pareek A., Pareek L.K. (2005): *De-novo* differentiation of shoots of *Dianthus barbatus* from callus cultures, Journal of Cell and Tissue Research 5 (327-329)

- Parkin M. (2005): *Reintroducing native plants into the wild*, Position paper for the New England Plant Conservation Program (NEPCoP).
<http://www.newfs.org/consERVE/reintro.htm>
- Pasqua G., Monacelli B., Altamura M.M. (1991): Influence of pH on flower and vegetative bud initiation and development *in vitro*, *Cytobiosistematics* 68 (111–121)
- P unescu A., Holobiuc I. (2003): Conservation of the endemic species *Dianthus callizonus* Schott et Kotsky using *in vitro* techniques, *Romanian Journal of Biology - Plant Biology* 48(1-2) (3-7)
- Pavlik B., Heisler K. (1988): *Habitat characterization and selection of potential sites for establishment of new populations of Amsinckia grandiflora*, Report, California Department of Fish and Game. Sacramento, CA.
http://botanicalgarden.berkeley.edu/research/Amsinckia/Habitat%20characterization%20and%20selection%20of%20potential_1988.pdf
- Pavlik B.M. (1996) *Defining and measuring success*, "Restoring Diversity: strategies for the reintroduction of endangered plants", ured. Falk D.A., Millar C.I., Olwell M., Island Press, Washington, DC, (127–155)
- 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)
- Peri M., Dmitrovi S., Živkovi S., Filipovi B., Skori M., Simonovi A., Todorovi S. (2012): *In Vitro* Growth, Morphogenesis, and Acclimatization of Endangered *Rindera umbellata* (Waldst. et Kit.) Bunge., *HortScience* 47 (1123-1128)
- Petru E., Landa Z. (1974): Organogenesis in isolated caranation plant callus tissue cultivated *in vitro*, *Biologia Plantarum* 16 (450-453)
- Pierik R.L.M. (1987): *In Vitro Culture of Higher Plants*, Martinus Nijhoff Publishers, Netherlands
- Pina A., Errea P. (2005): A review of new advances in mechanism of graft compatible–incompatible in *Prunus* spp., *Scientia Horticulturae* 106 (1–11)
- Pop T., Pamfil D. (2011): *In vitro* Preservation of Three Species of *Dianthus* from Romania, *Bulletin UASVM Horticulture* 680 (414-422)

- Popovi M., Grbi M., Markovi M. (2008): Razmnožavanje *Dianthus deltoides* L. kulturom izdanaka, Glasnik Šumarskog fakulteta 97 (209-219)
- Pospisilova J., Ticha I., Kadlecek P., Haisel D., Plzakova S. (1999): Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions, Biologia Plantarum 42 (4) (481-497)
- Prevalek-Kozlina B., Kostovi -Vranješ V., Slade D. (1997): *In vitro* propagation of *Fibigia triquetra* (DC.) Boiss., a rare stenoendemic species. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 51 (141-143)
- Proli M., Radi S., Pevalak-Kozlina B. (2002): *In Vitro* Propagation of *Dianthus giganteus* ssp. *croaticus*, Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica, Abstracts 44 (107-110)
- 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)
- Radojevi Lj., ali -Dragosavac, D. Špiri J., Stevanovi B., Stevanovi V. (2010): *In vitro* umnožavanje u kulturi segmenata stabla of *Dianthus ciliatus* ssp. *dalmaticus* i *D. giganteus* ssp. *croaticus* (Caryophyllaceae). Botanica Serbica 34(2) (153-161)
- Radojevi Lj., or evi N., Petrovi J. (1990): *In vitro* culture techniques for carnation breeding, Acta Horticulturae 280 (163-168)
- Radojevi Lj., Marinkovi N., Jevremovi S. (1997): Vegetativno razmnožavanje u kulturi meristema i segmenata stabla *Dianthus petraeus* Waldst. et Kit. subsp. *noeanus*, Glasnik instituta za botaniku i Botani ke bašte Univerziteta u Beogradu 31 (73-77)
- Radojevi Lj., Špiri J., Stevanovi B., Stevanovi V. (2006): *In vitro* culture of several endemic species *Dianthus* in Balkan Peninsula, XXII International Symposium Section Ornamentals, September 11-15, Sanremo, Italy, (36)
- Ran elovi V., Zlatkovi B., Milosavljevi V., Ran elovi N. (2008): The endemic flora of Bosilegrad surroundings (Krajište region) in SE Serbia, Phytologia Balcanica 14(3) (367 – 375)

- 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.
- Razdan M.K. (2003): *Introduction to Plant Tissue Culture*, Science Publishers Inc. USA.
- Reckinger C., Colling G. Matthies D. (2010) Restoring populations of the endangered plant *Scorzonera humilis*: influence of site conditions, seed source, and plant stage, *Restoration Ecology* 18(6) (904–913)
- Roest S., Bokelmann G.S. (1981): Vegetative propagation of carnation *in vitro* through multiple shoot development, *Scientia Horticulturae* 14 (357-366)
- Rossi G., Bonomi C. (2007): *A review of plant reintroduction practice*, <http://www.societabotanicaitaliana.it/uploaded/370.pdf>
- Rugini, E., Tarini, P., Rossodivita, M.E. (1987): Control of shoot vitrification of almond and olive grown *in vitro*. *Acta Horticulturae* 212 (177-183)
- Ruzicka K., Ljung K., Vanneste S., Podhorská R., Beeckman T., Friml J., Benková E. (2007) Ethylene Regulates Root Growth through Effects on Auxin Biosynthesis and Transport-Dependent Auxin Distribution, *Plant Cell* 19 (2197-2212)
- Ruzicka K., Simásková M., Duclercq J., Petrásek J., Zazimalová E., Simon S., Friml J., Van Montagu M.C., Benková E. (2009): Cytokinin regulates root meristem activity via modulation of the polar auxin transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (4284-4289)
- Sabovljevic A., Sabovljevic M., Rakic T., Stevanovic B. (2008): Establishment of procedures for *in vitro* maintenance, plant regeneration and protoplast transfection of the resurrection plant *Ramonda serbica* Pan ., *Belgian Journal of Botany* 141 (178-184)
- Sabovljevic M., Vujicic M., Sinzar-Sekulic J., Segarra-Moragues J.G., Papp B., Skoric M., Dragacevic L., Sabovljevic A. (2012): Reviving, *in vitro* differentiation, development and micropropagation of the rare and endangered moss *Bruchia vogesiaca* (Bruchiaceae), *HortScience* 47(9) (1347–1350)

- Saha M., Bhot M., Phatak A., Chandra, N. (2003): *In Vitro* Propagation of *Carica papaya* L. variety Coorg Honey Dew by nodal explants, Asian journal of microbiology biotechnology et environmental science 5(3) (331-332)
- Saher S., Piqueras A., Eladio H., Olmos E. (2004): Hyperhidricity in micropropagated carnation shoots: the role of oxidative stress, Physiologia Plantarum 120 (152-161)
- Sarasan V. (2010): Photoautotrophics micropropagation systems applications to conservation biotechnology programmes. IV International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants. ISHS Acta horticulturae 865 (21-28)
- Sarasan V., Cripps R., Ramsay M.M., Atherton C., McMichen M., Prendergast G., Rowntree J.K. (2006): Conservation *in vitro* of threatened plants - progress in the past decade. In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant 42 (206-214)
- Sato S., Katoh N., Yoshida H., Iwai S., Hagimori M. (2000): Production of doubled haploid plants of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) by pseudofertilized ovule culture, Scientia Horticulturae 83 (301-310)
- Selvakumar V., Anbudurai P.R., Balakumar T. (2001): *In vitro* propagation of the medicinal plant *Plumbago zeylanica* L. through nodal explants. In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant 37 (280 - 284)
- Sindelarova M., Sindelar L., Burketova L. (1999): Changes in glucose, fructose and saccharose metabolism in tobacco plants infected with potato virus, Biologia Plantarum 42 (3) (431-439)
- Sita G.L., Ravindran S. (1991): *Gynogenic plants from ovary culture of mulberry, Morus indica*, Horticulture new technologies and applications, Proceedings of the International Seminar on New Frontiers in Horticulture, Indo American Hybrid Seeds, Bangalore, India, November 25-28, (225-229)
- 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)
- Skoog F., Miller C.O. (1957): Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*, Symposia of the Society for Experimental Biology 54 (118-130)

- Staden J. van, Zazimalova E., George E.F. (2008): *Plant Growth Regulators II: Cytokinins, their Analogues and Antagonists*, "Plant Propagation by Tissue Culture, 3rd Edition", ured. George E.F., Hall M.A., De Klerk D.J., Springer, AA Dordrecht, Netherlands, (205 - 226)
- Steffen J.D., Sachs R.M., Hackett W.P. (1988): Growth and development of reproductive and vegetative tissues of *Bougainvillea* cultured *in vitro* as a function of carbohydrate, *American Journal of Botany* 75 (1219-1224)
- Stepanova A.N., Yun J., Likhacheva A.V. Alonso J.M. (2007): Multilevel interactions between ethylene and auxin in *Arabidopsis* roots, *Plant Cell* 19 (2169-2185)
- Stevanovi V. (1999): *Crvena knjiga Flore Srbije, I tom*, Ministarstvo za životnu sredinu Republike Srbije, Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, Zavod za zaštitu prirode Republike Srbije, Beograd
- Stilinovi S. (1987): *Proizvodnja sadnog materijala šumskog i ukrasnog drve a i žbunja*, OOUR Institut za šumarstvo Šumarskog fakulteta u Beogradu, Beograd
- Stojić D., Budimir S. (2004): Cytokinin-mediated axillary shoot formation in *Pinus heldreichii*, *Biologia plantarum*, 48(3) (477-479)
- Stojić D., Budimir S., Culafic, Lj. (1999): Micropropagation of *Pinus heldreichii*. *Plant cell tissue and organ culture*, 59(2) (147-150)
- Stojić 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)
- Stojić D., Janosevic, D., Uzelac, B., Cokesa, V., Budimir, S. (2012): Micropropagation of *Pinus peuce*. *Biologia plantarum* 56(2) (362-364)
- Stone O.M. (1963): Factors affecting the growth of carnation plants from shoot apices, *Annals of Applied Biology* 52 (199-209)
- 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)
- Takayama, S., Misawa, M. (1979): Differentiation in *Lilium* bulb scales grown *in vitro* - effect of various cultural conditions. *Physiologia Plantarum* 46 (184-190)
- 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)

- Todorovic S., Grubisic D., Giba Z., Mistic D., Konjevic R. (2006): Sucrose effects on *in vitro* fruiting and seed production of *Centaureum pulchellum*, *Biologia Plantarum* 50 (771–774)
- Tomicevic J., Bjedov I., Obratov-Petkovic D., Milovanovic M. (2011): Exploring the Park-People Relation: Collection of *Vaccinium myrtillus* L. by Local People From Kopaonik National Park in Serbia, *Environmental management* 48 (4) (835-846)
- Tomicevic J., Shannon M., Milovanovic, M. (2010a): Socio-economic impacts on the attitudes towards conservation of natural resources: Case study from Serbia, *Forest policy and economics* 12 (3) (157-162)
- Tomicevic J., Shannon M., Vuletic D. (2010b): Developing Local Capacity for Participatory Management of Protected Areas: The Case of Tara National Park, *Sumarski list* 134 (9-10) (503-515)
- Tomici evi J., Grbi M., Sko aji D., Radovanovi D. (2012): Stav javnosti grada Beograda o stranim invazivnim drvenastim vrstama, *Glasnik Šumarskog fakulteta* 105 (189-204)
- Tomovi G., Ran elovi V., Niketi M., Vukoji i S., Zlatkovi B. (2003): New distribution data of some Pontic and submediterranean plant species in Serbia, *Archives of Biological Sciences* 55 (1-2) (45-54)
- Traore, A., Gultinan, M. (2006): Effects of carbon source and explant type on somatic embryogenesis of four cacao genotypes. *HortScience* 41(3) (753–758)
- Tremblay F.M., Lalonde M. (1984): Requirements for *in vitro* propagation of seven nitrogen-fixing *Alnus* species, *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 3 (189-199)
- Valassi I.N., Economou A.S., Tsaftaris A.S. (2003): Rooting and acclimatization in transgenic carnation microplants, I International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants ISHS *Acta Horticulturae* 616 (227-230)
- Vanisree M., Lee C.Y., Lo S.F., Nalawade S.M., Lin C.Y., Tsay H.S. (2004): Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by tissue cultures, *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 45 (1-22)

- Vasil I.K., Thorpe T.A. (1994): *Plant Cell and Tissue Culture*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Vinterhalter D., Vinterhalter B. (1996): *Kultura in vitro i mikropropagacija biljaka*, Axial P.O., Beograd
- Volis S., Blecher M. (2010): Quasi *in situ*: A bridge between *ex situ* and *in situ* conservation of plants, *Biodiversity Conservation* 19 (2441-2454)
- Vujicic M., Sabovljevic A., Sinzar-Sekulic J., Skoric M., Sabovljevi M. (2012): *In vitro* development of the rare and endangered moss *Molendoa hornschuchiana* (Hook.) Lindb. ex Limpr. (Pottiaceae, Bryophyta). *HortScience* 47(1) (84-87)
- Watad A.A., Ahroni A., Zuker A., Shejtman H., Nissim A., Vainstein A. (1996): Adventitious shoot formation from carnation stem segments: a comparison of different culture procedures, *Scientia Horticulturae* 65 (313-320)
- 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)
- Xin L., Zhang Y.N., Chen L.X., Yue H. (2009): Tissue culture and rapid regeneration of *Dianthus barbatus*. *Journal of Northeast Forestry University* 37 (3) (12-13)
- Yadav MK., Gaur A.K., Garag G.K. (2003): Development of suitable protocol to overcome hyperhydricity in carnation during micropropagation, *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 72 (153-156)
- Yu X., Reed B.M. (1993): Improved shoot multiplication of mature hazelnut (*Corylus avellana* L.) *in vitro* using glucose as a carbon source, *Plant Cell Reports* 12 (256-259)
- Zaid A., Hughes H.G., Porceddu E., Nicholas F. (2007): Biotehnološki rečnik za hranu i poljoprivredu, Obnovljeno i prošireno izdanje rečnika Biotehnologije i genetičkog inženjeringa, Food and Agriculture Organization of the United Nations <http://www.fao.org/biotech/docs/serbglos.pdf>
- Zencirkiran M. (2010): Cold storage of rooted and non-rooted carnation cuttings. *African Journal of Biotechnology* 9 (24) (3603-3606)

Web adrese

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

Convention Concerning the Protection of the World Cultural and Natural Heritage, from: <http://whc.unesco.org/en/conventiontext>, (pristupljeno 2012)

Cotswold Garden Flowers, from: <http://www.cgf.net/>, (pristupljeno 2012)

Declaration of the United Nations Conference on the Human Environment, from: <http://www.unep.org/Documents.Multilingual/Default.asp?documentid=97&articleid=1503> (pristupljeno 2012)

GRIN Taxonomy for Plants, United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, from: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/index.pl> (pristupljeno 2012)

Handbook of Biological Statistics, Logistic regression, from: <http://udel.edu/~mcdonald/statlogistic.html> (pristupljeno 2013)

European Botanic Gardens Consortium, from: <http://www.botanicgardens.eu> (pristupljeno 2013)

Everwilde seeds, from: <http://www.everwilde.com/Dianthus-armeria-WildFlower-Seed.html> (pristupljeno 2012)

FAO. 2014. *Genebank Standards for Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. Rev. ed. Rome*, www.fao.org/publications (pristupljeno 2014)

International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications, from: <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/cropevents/default.asp?CropID=4&Crop=Carnation>, (pristupljeno 2012)

International Union for Conservation of Nature, from: <http://cms.iucn.org/> (pristupljeno 2012)

Native British Wild Flowers, Naturescape, from: <http://www.naturescape.co.uk/gardening.htm> (pristupljeno 2012)

Nature Convention on the conservation of European wildlife and natural habitats,

from: http://www.coe.int/t/dg4/cultureheritage/nature/bern/default_en.asp,

(pristupljeno 2012)

Resource Conservation, GreenScapes, from:

<http://www.epa.gov/osw/conserv/rrr/greenscapes/index.htm> (pristupljeno 2012)

Ringel nursery, from: http://www.ringelnursery.com/packing.asp?item_id=7)

(pristupljeno 2012)

Plant Conservation Alliance, from: <http://www.nps.gov/plants/index.htm> (pristupljeno

2013)

Goldsmith seeds and Syngenta flowers, from:

http://www.syngentaflowers.com/country/us/en/seeds/TechnicalServices/Pages/tech_support.aspx (pristupljeno 2012)

The Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and

Flora, from: <http://www.cites.org/> (pristupljeno 2012)

The cut flowers and foliage market in the EU, 2007, Source: CBI Market Information

Database, from: www.cbi.eu (pristupljeno 2012)

The flower factory nursery, Wisconsin, from:

<http://www.theflowerfactorynursery.com/index.asp>, (pristupljeno 2012)

The IUCN Red List of Threatened Species, from:

<http://www.iucnredlist.org/details/165217/0>) (pristupljeno 2012)

The Royal Botanic Gardens, Kew, Neotropical Lentibulariaceae, from:

<http://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/Lentibulariaceae.htm>
(pristupljeno 2012)

US Forest Service, Native Gardening, from:

<http://www.fs.fed.us/wildflowers/nativegardening/> (pristupljeno 2012)

IUCN Position Statement on the Translocation of Living Organisms: Introductions, Re-

introductions, and Re-stocking, Prepared by the Species Survival Commission in

collaboration with the Commission on Ecology and the Commission on

Environmental Policy, Law and Administration. (1987) IUCN , from:

(<http://www.iucnssc.org>)

Kew, Global Strategy for Plant Conservation (2010), from:

<http://herbaria.plants.ox.ac.uk/bol/content/Groups/ukot/resources/GSbrochure.pdf>
(pristupljeno 2012)

United States Environmental Protection Agency - Greenscapes, from:

<http://www.epa.gov/epawaste/conservation/tools/greencapes/index.htm> / (pristupljeno 2012)

US Forest Service - Native gardening, from:

<http://www.fs.fed.us/wildflowers/nativegardening/> (pristupljeno 2012)

Naturescape British Wild Flowers, from: <http://www.naturescape.co.uk/>, (pristupljeno 2012)

European Environment Agency, Dianthus giganteiformis ssp. kladovanus, from:

<http://eunis.eea.europa.eu/species/195255/general> (pristupljeno 2013)

Everwilde farms Inc., from: <http://www.everwilde.com/> (pristupljeno 2012)

Biografija autora

Mr Marija Marković je rođena 15.7.1978. godine u Koraćici. Osnovnu školu, kao najbolji učenik u generaciji, i gimnaziju je završila u Mladenovcu. Školske 1997/98. upisala je Šumarski fakultet Univerziteta u Beogradu, Odsek za pejzažnu arhitekturu. Diplomirala je u junu 2002. godine, sa prosečnom ocenom 9,45. Iste godine je dobila nagradu Fonda kraljevskog doma Karađorđević, kao najbolji student završne godine Šumarskog fakulteta. Takođe, izabrana je za najboljeg studenta na Odseku za pejzažnu arhitekturu i nagrađena je statuom košute.

Poslediplomske (magistarske) studije upisala je školske 2002/03. na Šumarskom fakultetu i položila ispite sa prosečnom ocenom 10,00. Magistarski rad pod nazivom "Mogućnost razmnožavanja vrste *Dianthus deltoides* L. metodom mikropropagacije" odbranila je u martu 2008. godine, čime je stekla akademsko zvanje magistra pejzažne arhitekture.

Tokom školske 1999/2000. godine bila je angažovana kao demonstrator na predmetu Dekorativna dendrologija, a u školskoj 2003/04. kao demonstrator na predmetima Cvečarstvo 1 i Cvečarstvo 2. Od 2004. do 2008. godine radila je kao asistent pripravnika, a u zvanje asistenta za užu nauku u oblasti Pejzažna arhitektura i hortikultura izabrana je 2008. godine. Angažovana je na predmetima osnovnih i master studija: Cvečarstvo, Tehnologija proizvodnje cveča, Dizajn biljkama i Proizvodnja ukrasnih biljaka. Bila je članicom komisije za odbranu više diplomskih radova.

Od 2004. godine, kao istraživačica angažovana je na više naučno-istraživačkih projekata i do sada je objavila i saopštila više i broj radova. Takođe, tokom 2008. godine bila je mentor na programu nacionalne službe za zapošljavanje, za stručno usavršavanje praktikanata u Laboratoriji za kulturu tkiva Šumarskog fakulteta.

Član je Američkog udruženja za hortikulturu ("American Society for Horticultural Science"). Govori engleski, francuski i persijski jezik.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Мр Марија Марковић

број уписа школска 2008/09, докторанд - истраживач

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Размножавање неких угрожених врста каранфила (*Dianthus L.*) методом микропропагације“

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

У Београду, 4.6.2014.

Потпис докторанда

Марија Марковић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Мр Марија Марковић

Број уписа школска 2008/09. година, докторанд - истраживач

Студијски програм Пејзажна архитектура и хортикултура

Наслов рада „Размножавање неких угрожених врста каранфила (*Dianthus L.*)
методом микропропагације“

Ментор Др Михаило Грбић, редовни професор Универзитета у Београду –
Шумарског факултета

Потписани/а Мр Марија Марковић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 4.6.2014.

Марија Марковић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Размножавање неких угрожених врста каранфила (*Dianthus* L.) методом микропропагације“ која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду, 4.6.2014.

Потпис докторанда

