

## EFFECT OF SILVER NITRATE AND THIDIAZURON ON SHOOT PROLIFERATION, HYPERHYDRICITY AND ASSESSMENT OF GENETIC FIDELITY OF MICROPLANTS IN CARNATION (*DIANTHUS CARYOPHYLLUS* L.)

R.L. MAURYA<sup>1</sup>, M. KUMAR<sup>1</sup>, U. SIROHI<sup>2</sup>, PRIYA<sup>2#</sup>, V. CHAUDHARY<sup>3</sup>, V.R. SHARMA<sup>4</sup>, D. YADAV<sup>5</sup>, M.K. YADAV<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Horticulture, College of Agriculture, SVP University of Agriculture & Technology, Meerut- 250 110, Uttar Pradesh, INDIA

<sup>2</sup> Department of Biotechnology, SVP University of Agriculture and Technology, Meerut- 250 110, Uttar Pradesh, INDIA

<sup>3</sup> Department of Chemistry, Meerut College Meerut 250001, Uttar Pradesh, India

<sup>4</sup> Plant Genetic Resources and Improvement, CSIR-National Botanical Research Institute, Rana Pratap Marg, Lucknow 226 001 Uttar Pradesh, India

<sup>5</sup> Department of Biotechnology, DDU University Gorakhpur, Uttar Pradesh India

E-mail: mkyadav711@gmail.com

*In the present investigation, optimization of the best concentration combinations of BAP (Benzyl Amino Purine), TDZ (Thidiazuron) and Silver Nitrate (AgNO<sub>3</sub>) for micropropagation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L) cv. Irene was performed. Genetic fidelity in the microplants of different generation was determined with the help of ISSR markers. Results of the present investigation showed that the MS gelled media supplemented with BAP (0.5 mg l<sup>-1</sup>) and AgNO<sub>3</sub> (1.5 mg l<sup>-1</sup>) showed maximum shoot proliferation, good shoot length and reduced hyperhydricity significantly. Our study also indicates that hyperhydricity decreased by substantially by increasing the concentration of AgNO<sub>3</sub>, compared to control. High level of AgNO<sub>3</sub> in MS medium did not helped to reduce hyperhydricity. Another chemical combination of TDZ (1.0 mg l<sup>-1</sup>) and AgNO<sub>3</sub> (0.5 mg l<sup>-1</sup>) in MS gelled media gave the maximum shoot proliferation, shoot length with minimum hyperhydricity which showed normal growth and development compared to control and other treatments. This concentration combination proved effective to reduce hyperhydricity and to enhance shoot proliferation. Because TDZ with AgNO<sub>3</sub> had pronounced effect to reduce hyperhydricity, therefore, this concentration combination was used to advance the progeny up to subculture*

*(SC10) using donor mother microplants (SC1) selected from the best concentration response to know the genetic fidelity among the different generations. Microplants which were non hyperhydrified were used to assess the genetic fidelity using ISSR markers. Fourteen ISSR primers were used that gave good amplification and produced 616 bands with an average of 44 amplicon per primer from in vitro raised microplants including mother plant where the banding patterns exhibited uniform and homogeneous banding patterns. This study may help us to know applicability of ISSR markers to establish genetic fidelity among in vitro – raised microplants of carnation.*

**Key words:** Carnation, Clonal fidelity, Hyperhydricity, ISSR markers, Micropropagation, Plant Growth Regulators, Silver Nitrate, TDZ, True to type microplants

## ВПЛИВ НІТРАТУ СРІБЛА І ТІДІАЗУРОНУ НА ПРОЛІФЕРАЦІЮ ПАГОНІВ ТА НАДМІРНУ ГІДРАТАЦІЮ, І ОЦІНКА ГЕНЕТИЧНОЇ ЦІЛІСНОСТІ МІКРОРОСЛИН ГВОЗДИКИ САДОВОЇ (*DIANTHUS CARYOPHYLLUS* L)

У цьому дослідженні було проведено оптимізацію найкращих поєднань концентрацій ВАР (бензил-амінопурину), ТДЗ (тідіазурону) і нітрату срібла (AgNO<sub>3</sub>) з метою мікропропагації гвоздики садової (*Dianthus caryophyllus* L) cv. Irene. Генетичну цілісність мікророслин різних поколінь було встановлено за допомогою маркерів ISSR. Результати цього дослідження показали, що гелеві середовища MS з додаванням ВАР (0,5 мг/л<sup>-1</sup>) і AgNO<sub>3</sub> (1,5 мг/л<sup>-1</sup>) мали максимальну проліферацію пагонів, хорошу довжину пагона і значно знижену гідратацію. Також у нашому дослідженні було визначено, що надмірна гідратація значно знижувалася завдяки підвищенню концентрації AgNO<sub>3</sub> порівняно з контролем. Високий рівень AgNO<sub>3</sub> в середовищі MS не допоміг знизити надмірну гідратацію. Інше поєднання ТДЗ (1,0 мг/л<sup>-1</sup>) та AgNO<sub>3</sub> (0,5 мг/л<sup>-1</sup>) в гелевому середовищі MS дозволило отримати максимальну проліферацію пагонів, довжину пагонів з мінімальним рівнем надмірної гідратації, які показали нормальний ріст і розвиток порівняно з контролем та іншими способами обробки. Це поєднання концентрацій показало свою ефективність у зниженні надмірної гідратації та підвищенні проліферації пагонів. Оскільки ТДЗ у поєднанні з AgNO<sub>3</sub> мав значний вплив на зниження надмірної гідратації, це поєднання концентрацій використали для просування наступного покоління до субкультури (SC10) за допомогою материнських мікророслин (SC1), відібраних з реакцій на найкращу концентрацію, щоб дізнатися генетичну цілісність серед різних поколінь. Мікророслини, які не мали надмірної гідратації, використали для оцінки гене-

тичної цілісності за допомогою маркерів ISSR. Було використано чотирнадцять маркерів ISSR, які дали хорошу ампліфікацію, було отримано 616 смуг із середньою кількістю 44 ампліконів на праймер із мікророслин, вирощених *in vitro*, включно з материнською рослиною, на яких характер смугастості був уніфікованим і гомогенним. Результати цього дослідження можуть сприяти у вивченні застосування маркерів ISSR з метою встановлення генетичної цілісності мікророслин гвоздики садової, вирощених *in vitro*.

**Ключові слова:** гвоздика, клональна цілісність, надмірна гідратація, маркери ISSR, мікропропагування, регулятори росту рослин, нітрат срібла, TDZ, мікророслини, відповідні типу.

#### REFERENCES

- Arif M, Rauf S, Din AU, Rauf M, Afrasiab, H (2014) High frequency plant regeneration from leaf derived callus of *Dianthus caryophyllus* L. Amer J Plant Sci 5:2454–2463.
- Bhatia R, Singh KP, Sharma TR, Jhang T (2011) Evaluation of the genetic fidelity of *in vitro* propagated gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus) using DNA-based markers. Plant Cell Tissue Organ Cult 104:131–135.
- Chae SC, Park SU (2012) Improved shoot organogenesis of *Echinacea angustifolia* DC treated with ethylene inhibitors. Life Sci J 9:1725–1728.
- Cruz de Carvalho MHB, Van Le Y, Zuily-Fodil et al (2000) Efficient whole plant regeneration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using thin-cell-layer culture and silver nitrate. Plant Sci 159:223–232.
- Donnelly VA, Vidaver W (1984) Leaf anatomy of red raspberry transferred from culture to soil. J Am Soc Hort Sci 109:172–176.
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13–15.
- Esmail NN, Al-Doss AA, Barakat MN (2013) An assessment of *in vitro* culture and plant regeneration from leaf base explants in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). J Food Agric Environ 11:1113–1117.
- Gao H, Xia X, An L, Xin X, Liang Y (2017) Reversion of hyperhydricity in pink (*Dianthus chinensis* L.) plantlets by AgNO<sub>3</sub> and its associated mechanism during *in vitro* culture. Plant Sci 254:1–11.
- Gill APS, Arora JS (1988) Performance of Sim carnations under subtropical climatic conditions of Punjab. Indian J Hort 45:329–335.
- Goto S, Thakur RC, Ishii K (1998) Determination of genetic stability in long-term micropropagated shoots of *Pinus thunbergii* Parl. Using RAPD markers. Plant Cell Rep 18(3–4):193–197.
- Joshi-Saha A, Valon C, Leung J (2011) A brand new start: Abscisic acid perception and transduction in the guard cell. Sci Signal 4:645–652.
- Kantia A, Kothari SL (2002) High efficiency adventitious shoot bud formation and plant regeneration from leaf explants of *Dianthus chinensis* L. Sci Hort 96:205–212.
- Kaviani B, Hesar AA, Kharabian-Masouley A (2011) *In vitro* propagation of *Matthiola incana* (Brassicaceae) – an ornamental plant. Plant Omics J 4(7):435–440.
- Kevers C, Franck T, Strasser R J D, Ommes, J, Gasper T (2004) Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. Plant Cell, Tissue Org Cult 77:181–191.
- Lakshmanan P, Lee C, Goh C (1997) An efficient *in vitro* method for mass propagation of a woody ornamental *Ixora coccinea* L. Plant Cell Rep 16:572–577.
- Mayor M, Nestares G, Zorzoli R, Picardi L (2003) Reduction of hyperhydricity in sunflower tissue culture. Plant Cell Tissue Organ Cult 72:99–103.
- Mujib A, Pal AK (1995) Intervarietal variation in response to *in vitro* cloning of carnation. Crop Res Hisar 10:190–194.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant 15:473–497.
- Naloussi AM, Hatamzadeha A, Azadi P et al (2019) A procedure for indirect shoot organogenesis of *Polygonatum tuberosum* L. and analysis of genetic stability using ISSR markers in regenerated plants. Sci Hort 244:315–321.
- Onamu R, Obukosia SD, Musembi N, Hutchinson MJ (2003) Efficacy of Thidiazuron in *in vitro* propagation of carnation shoot tips: Influence of dose and duration of exposure. African Crop Sci J 11(2):125–132.
- Patil VM, Dhande GA, Thigale DM, Rajput JC (2011) Micropropagation of pomegranate (*Punica granatum* L.) ‘Bhagava’ cultivar from nodal explant. Afr J Biotech 10:18130–18136.
- Qin Y, Zhang S (2005) Response of *in vitro* Strawberry to Silver Nitrate (AgNO<sub>3</sub>). Hort Sci 40(3):747–751.
- Reddy MP, Sarla N, Siddiq EA (2002) Inter simple sequence repeats (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. Euphytica 120:9–16.
- Rizwan HM, Irshad M, He BZ et al (2018) Silver nitrate (AgNO<sub>3</sub>) boosted high-frequency multiple shoot regeneration from cotyledonary node explants of Okra (*Abelmoschus esculentus* L.). Appl Ecol Environ Res 16(3):3421–3435.
- Rohela GK, Jogam P, Prasad B, Christopher R (2019) Indirect regeneration and assessment of genetic fidelity of acclimated plantlets by SCoT, ISSR, and RAPD markers in *Rauwolfia tetraphylla* L.: An endangered medicinal plant. BioMed Res Intern. <http://doi.org/10.1155/2019/3698742>.

- Shi C, Qi C, Ren H et al (2015) Ethylene mediates brassinosteroid-induced stomatal closure via *Gα* protein-activated hydrogen peroxide and nitric oxide production in *Arabidopsis*. *Plant J* 82:280–301.
- Shimizu-Sato S, Tanaka M, Mori H (2009) Auxin-cytokinin interactions in the control of shoot branching. *Plant Mol Biol* 69(4):429–435.
- Staden VJ, Zazimalova E, George EF (2008) Plant growth regulators II: Cytokinins, their analogues and antagonists. In: George EF, Hall M, De Kleck GJ (Eds.). *Plant propagation by tissue culture*. Vol 1. Springer, Dordrecht, Netherlands. 205–226 p.
- Van den Dries N, Giannm, S, Czerednik A et al (2013) Flooding of the apoplast is a key factor in the development of hyperhydricity. *J Exp Bot* 64:5221–5230.
- Vinoth A, Ravindhran R (2015) Reduced hyperhydricity in watermelon shoot cultures using silver ions. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*. <http://doi.org/10.1007/s11627-015-9698-5>.
- Yadav MK, Gaur AK, Garg GK (2003) Development of suitable protocol to overcome hyperhydricity in carnation during micropropagation. *Plant Cell, Tiss Organ Cult* 72:153–156.

Received July 31, 2021

Received September 22, 2021

Accepted January 18, 2023