

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Mr Milica Čalović

Oplemenjivanje mandarina (*Citrus reticulata* Blanco) metodama somatske i seksualne hibridizacije u cilju dobijanja novih bezsemenih kultivara

Doktorska disertacija

Beograd, 2014

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Mr Milica Čalović

**Application of somatic and sexual
hybridization in mandarin (*Citrus
reticulata* Blanco) improvement with the
emphasis on seedlessness**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2014

Dr Slađana Jevremović, viši naučni saradnik Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" Univerziteta u Beogradu-mentor

Prof. dr Zlatko Giba, vanredni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu-mentor

Dr Angelina Subotić, naučni savetnik Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" Univerziteta u Beogradu-član

Datum odbrane: _____

Doktorska disertacija je urađena kao rezultat istraživanja na sledećim projektima:

-“Development of Fresh Citrus Varieties” finansiranog od strane New Varieties Development and Management Corporation - Florida Department of Citrus (rukovodilac prof. dr Jude W. Grosser)

-“Surviving HLB and Canker: Genetic Strategies for Improved Scion and Rootstock Varieties” finansiranog od strane Citrus Research and Development Foundation (CRDF) (rukovodilac prof. dr Jude W. Grosser)

-“Razvoj i primena biotehnoloških postupaka u dobijanju zdravog sadnog materijala ukrasnih biljaka“ (projekat broj TR31019) finansiranog od strane Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije (rukovodilac dr Angelina Subotić).

Najveću zahvalnost dugujem svom dugogodišnjem šefu prof. dr Jude W. Grosser (Citrus Research and Education Center, Institute for Food and Agricultural Sciences, University of Florida, USA) na stručnim konsultacijama, strpljenju, materijalnoj i psihološkoj podršci tokom izrade ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se svim članovima komisije koji su svojim sugestijama pomogli finalnu izradu ove doktorske disertacije i uporedo besprekorno odradili administrativni deo posla vezan za doktorsku disertaciju.

Najtopliju zahvalnost upućujem svom suprugu dr Vladimiru Orboviću na nesebičnom davanju saveta tokom izrade eksperimentalnog dela i na velikoj pomoći prilikom recenzije doktorske disertacije. Mom ljubljenoj sinu Marku hvala što je lepo i dugo spavao u jutarnjim i popodnevrim satima i time mi dao vremena da se koncentrišem prilikom pisanja ove doktorske disertacije.

Oplemenjivanje mandarina (*Citrus reticulata* Blanco) metodama somatske i seksualne hibridizacije u cilju dobijanja novih bezsemenih kultivara

R E Z I M E

Dobijanje novih kultivara mandarina na klasičan način je izuzetno spor i dug proces zbog nemogućnosti da se prevaziđu problemi vezani za reproduktivnu biologiju mandarina kao što su apomiksija (nucelarna poliembrija), seksualna nekompatibilnost i dug juvenilni period. U novije vreme, da bi se prevazišli ovi problem, primenjuju se dve savremene metode koje su postale neizostavni deo programa oplemenjivanja mandarina - somatska hibridizacija (fuzija protoplasta) i interploidno seksualno ukrštanje. Obe metode su bazirane na izmeni ploidnosti postojećih kultivara. Primenom somatske hibridizacije, u prvom koraku moguće je dobiti tetraploidne hibride sa kumulativnim roditeljskim kombinacijama genoma koje određuju nasleđivanje kvalitetnih osobina oba diploidna roditelja. Dobijeni tetraploidni somatski hibridi mogu dalje, u drugom koraku, da se koriste u interploidnom seksualnom ukrštanju sa izabranim diploidnim, komercijalno važnim kultivarima u cilju dobijanja triploidnih hibrida. Triploidne hibridne biljke uvek daju bezsemena plodove što je najvažniji cilj programa za oplemenjivanje mandarina. Pored bezsemenosti, postoje i drugi ne manje značajni ciljevi, u programu oplemenjivanja mandarina kao što su lako ljuštenje, produženje sezone plodonošenja, poboljšanje ukusa ploda, poboljšanje kvaliteta iscedenog soka, produženje dužine trajanja svežine ploda na policama prodavnica, otpornost na niske temperature i bolesti.

Kompleksni sistem oplemenjivanja koji uključuje ove dve savremene biotehnološke metode je već bio primenjen na druge pripadnike roda *Citrus*, a u ovoj doktorskoj disertaciji je primenjen za oplemenjivanje mandarina koje se gaje na Floridi. U prvom delu disertacije su prikazani rezultati somatske hibridizacije gde je dobijeno 65 somatskih hibrida. Somatski hibridi su dobijeni kroz "hemijsku" fuziju protoplasta izolovanih iz embriogenog nucelnog kalusa i mezofila listova uz primenu polietilenglikola (PEG). Nivo ploidnosti regenerisanih hibrida je utvrđen metodom "flow" citometrije. Dobijeni somatski hibridi su bili rezultat hibridizacije šest roditeljskih kombinacija koje uključuju šest diploidnih roditelja – kultivara/selekcija sa vrhunskim kvalitetom ploda: tri mandarine ['Ponkan' (*C. reticulata* Blanco), 'Willowleaf' (*C. deliciosa* Tenore) i 'Kinnow' ('King' tangor (*C. nobilis* Lour.) × 'Willowleaf' mandarina (*C. deliciosa* Tenore))] i tri tangora ['Murcott' (*C. reticulata* Blanco × *C. sinensis* Osbeck), 'W.Murcott' (*C. reticulata* Blanco × *C. sinensis* Osbeck) i 'Snack' (*C. reticulata* Blanco × *C. sinensis* Osbeck)]. Regenerisane biljčice koje su aklimatizovane i gajene dalje u uslovima staklenika su testirane molekularnom markerima, primenom "expressed sequence tag – simple sequence repeat (EST-SSR)" metode, da bi se utvrdila komplementarnost genoma dobijenih somatskih hibrida i njihovih roditelja. Uz pomoć EST-SSR markera je dokazano da su 46 somatskih hibrida autotetraploidi, 18 alotetraploidi a za jedan somatski hibrid nije bilo moguće odrediti genetičko poreklo. U grupi autotetraploida sa udvojenim genomom jednog od roditelja, 20 biljaka je imalo SSR alelske profile koji su bili potpuno podudarni sa alelskim profilom genoma tog roditelja. Neke biljke su bile autotetraploidi svog ženskog roditelja: 'Murcott',

‘W.Murcott’ i ‘Ponkan’ a jedna biljka je bila autotetraploid svog muškog ‘Willowleaf’ roditelja. Sve druge autotetraploidne biljke (26) su imale udvojene genome svog ženskog roditelja ‘W.Murcott’ tangora ali EST-SSR markerima nije bilo moguće u potpunosti potvrditi identitet genoma majke biljke. Dodatno testiranje EST-SSR markerima kalusnih linija kultivara ‘W.Murcott’ dobijenih iz individualnih ovula je pokazalo je da neke kalusne linije imaju zigotsko a ne, kao što se očekivalo, nucelarno poreklo. Takođe, u grupi alotetraploidnih biljaka, poređenje SSR profila hibrida sa zbirom alela od oba roditelja je pokazalo da profili hibrida nisu identični roditeljskim što se posebno odnosi na muškog roditelja tj. kultivar ‘W.Murcott’. Na osnovu ovih rezultata se može zaključiti da su neke od ‘W.Murcott’ *in vitro* biljaka koje su korišćene kao izvor mezofilnih protoplasta takođe bile zigotskog porekla (proizvod unakrsnog a ne samo-oprašivanja). Urađena je morfološka analiza listova dobijenih somatskih hibrida kao i analiza plodova odabranih somatskih hibrida gajenih u polju. Analiza dobijenih plodova je pokazala da su oni po mnogim morfološkim osobinama i kvalitetu iscedenog soka jednakog ili čak višeg kvaliteta od unapred utvrđenih standardnih vrednosti za minimum zrelosti i kvaliteta za grupu mandarina.

U drugom delu doktorske disertacije su prikazani rezultati primene metode seksualne hibridizacije kroz tri različite vrste ukrštanja ($2x \times 2x$, $2x \times 4x$ i $4x \times 2x$) iz kojih je dobijena velika populacija triploidnih ($3x$) hibrida. Za potrebe seksualnog ukrštanja je korišćeno ukupno 29 roditelja – 14 diploidnih ($2x$) i 15 tetraploidnih ($4x$) adultnih biljaka. Urađena je interploidna seksualna hibridizacija kod 48 roditeljskih kombinacija, od čega je kod 34 roditeljske kombinacije ukrštanje bilo uspešno i dobijeno je 4051 semena. Tehnika “spašavanja” zigotskih embriona se pokazala kao neophodan deo protokola za dobijanje triploidnih hibrida mandarina jer je uz njenu primenu procenat klijanja embriona izolovanih iz semena bio 66% u $2x \times 4x$ ukrštanjima i 92% u $2x \times 2x$ ukrštanjima. Potpuno razvijene biljčice dobijenih seksualnih hibrida koji su se razvile u *in vitro* uslovima i čiji je nivo ploidnosti bio utvrđen metodom “flow” citometrije su bile nakalemljene na klijance podloga. Od 43 roditeljske kombinacije interploidnog $2x \times 4x$ ukrštanja, 33 su bile uspešne i proizvele 689 triploida, što je predstavljalo 62% od ukupno regenerisanih biljaka *in vitro*. Preostale dobijene biljke su bile diploidi 35% (394 biljke) i tetraploidi 3% (31 biljka). Četiri recipročna interploidna $4x \times 2x$ ukrštanja nisu dovela do stvaranja nijednog triploida. Iz jedine roditeljske $2x \times 2x$ kombinacije dobijeno je 735 biljaka od čega su njih 4% (29 biljaka) bile triploidi a 96 % diploidi (706 biljaka). Efikasnost dobijanja triploida je za pojedinačne roditeljske kombinacije izračunata kao broj triploidnih seksualnih hibrida po dobijenom plodu. Ovaj parametar je zavisio od nekoliko faktora koji uključuju genotipove oba roditelja kao i sredinske faktore.

Naučna oblast: Biologija
Uža naučna oblast: Fiziologija biljaka
UDK broj: 577.21:581.145.2(043.3)
 581.16:634.322(043.3)

Ključne reči: *C. reticulata* Blanco, somatska hibridizacija, seksualna hibridizacija, “flow” citometrija, EST-SSR molekularna analiza, oplemenjivanje mandarina, bezsemenost

Application of somatic and sexual hybridization in mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) improvement with the emphasis on seedlessness

ABSTRACT

Development of improved cultivars through conventional hybridization in mandarins has been hampered by several characteristics of their reproductive biology, mainly apomixis (nucellar polyembryony), sexual incompatibility, and long juvenility. As an alternative, two unconventional methods - somatic hybridization *via* protoplast fusion and interploid sexual hybridization have become integral part of mandarin variety improvements programs worldwide since they can easily overcome mentioned limitations of reproductive biology characteristics. Both techniques are based on ploidy manipulation. By using somatic hybridization, it is possible to produce novel germplasm at tetraploid level that combines all the good qualities of fused diploid selections. Used further in interploid sexual hybridization, these newly produced somatic hybrids crossed with selected diploid commercial cultivars could generate eventually triploid hybrids. Triploid hybrids always produce seedless fruit which is a primary objective of mandarin breeding program. Besides seedlessness, there are other main breeding objectives for mandarins: easy-peel fruit, extension of the season of availability (early and late), improved flavor, juice quality, shelf life, cold hardiness, and disease resistance.

This complex system of two unconventional biotechnological methods, used to generate triploid hybrids in other citrus species, was successfully applied in this thesis for mandarin cultivar improvement in Florida. In the first part of the thesis, a total of 65 somatic hybrids were obtained *via* somatic hybridization. They were produced by using chemically (polyethylene glycol - PEG) induced fusion of embryogenic suspension-derived protoplasts with leaf-derived protoplasts. "Flow" cytometry was used to determine ploidy level of regenerated somatic hybrids. Somatic hybrids came from six different parental combinations involving six diploid parents - cultivars/selections with exceptional fruit qualities: three mandarins ['Ponkan' (*C. reticulata* Blanco), 'Willowleaf' (*C. deliciosa* Tenore), and 'Kinnow' ('King' tangor (*C. nobilis* Lour.) × 'Willowleaf' mandarina (*C. deliciosa* Tenore))] and three tangors ['Murcott' (*C. reticulata* Blanco × *C. sinensis* Osbeck), 'W.Murcott' (*C. reticulata* Blanco × *C. sinensis* Osbeck), and 'Snack' (*C. reticulata* Blanco × *C. sinensis* Osbeck)]. Produced plants, that survived *in vitro* conditions and acclimation in the greenhouse, were tested with expressed sequence tag – simple sequence repeat (EST-SSR) marker analysis to examine complementation of their nuclear genomes with their parental genomes. EST-SSR markers identified 46 autotetraploid plants, 18 allotetraploid plants, and one undefined plant. In autotetraploid group, 20 plants had SSR profiles completely matching the allelic profiles of one of their parents' genomes but in duplicate. Following plants were autotetraploids of their female parents: 'Murcott', 'W.Murcott', and 'Ponkan' and in one case the plant was autotetraploid of 'Willowleaf' male parent. All other autotetraploid plants (26) had a duplicate genome of their female parent 'W.Murcott', except that EST-SSR markers did not completely match their maternal genome. Further testing with EST-SSR markers of some 'W.Murcott' callus lines derived from individual ovules discovered unexpected zygotic origin of several lines which were presumed to be of nucellar origin. In allotetraploid group of plants,

comparison of SSR profiles of hybrids with the sum of alleles from both parental profiles showed that they were also not completely identical to profiles of their 'W.Murcott' male parent. It was concluded that some of *in vitro* 'W.Murcott' stock plants used as a source of mesophyll protoplasts in fusion experiments must have been of zygotic origin (coming from cross pollination and not from selfing). Hybrids growing in the field were used for leaf morphological analysis and evaluation of commercial qualities of the fruit. Fruit evaluation has shown that according to their features and juice quality they meet or exceed the standards for quality and maturity of mandarins.

In the second part of the thesis, where sexual hybridization was employed, three different types of crosses ($2x \times 2x$, $2x \times 4x$, and $4x \times 2x$) were performed in order to produce large population of triploid ($3x$) hybrids. Total of 29 parents were utilized - 14 diploid ($2x$) and 15 tetraploid ($4x$) mature plants. Out of 48 parental combinations in sexual hybridization experiments, 34 were successful and generated 4051 seeds. Embryo rescue proved to be an indispensable part of the protocol for triploid hybrid recovery as germination rate of embryos from extracted seeds was 66% in $2x \times 4x$ and 92% in $2x \times 2x$ hybridization. Ploidy level of all obtained sexual hybrids was determined by means of "flow" cytometry and those which were fully developed in *in vitro* conditions were grafted onto rootstock seedlings. Thirty three out of forty three parental combinations of interploid $2x \times 4x$ crosses were successful at producing total of 689 triploids which represented 62% of successfully regenerated plants *in vitro*. The rest of the plants were diploids 35% (394) and tetraploids 3% (31). Four reciprocal interploid $4x \times 2x$ crosses did not yield any triploids. The single parental combination of $2x \times 2x$ cross generated total of 735 plants out of which were triploids 4% (29) and the rest of 96% (706) were diploids. Efficiency of triploid hybrid production was calculated as the number of triploid genotypes per harvested fruit for each parental combination. This parameter was affected by several factors including genotypes of both parents and environmental conditions.

Scientific field:	Biology
Specific scientific field:	Plant Physiology
UDC number:	577.21:581.145.2(043.3) 581.16:634.322(043.3)

Key words:	<i>C. reticulata</i> Blanco, somatic hybridization, sexual hybridization, flow cytometry, EST-SSR marker analysis, mandarin improvement, seedlessness
-------------------	---

Sadržaj

SKRAĆENICE

1. UVOD	1
1.1. Taksonomija i poreklo roda <i>Citrus</i>	1
1.2. Rasprostranjenost i ekonomski značaj gajenja citrusa	3
1.3. Poreklo, klasifikacija i morfo-fiziološke karakteristike mandarina	5
1.4. Kultura tkiva vrsta roda <i>Citrus</i>	7
1.5. Kultura protoplasta vrsta roda <i>Citrus</i>	11
1.6. Važnost postojanja bezsemenih kultivara citrusa	14
1.7. Pojava spontane poliploidnosti kod citrusa	16
1.8. Promena nivoa ploidnosti u cilju stvaranja triploidnih bezsemenih kultivara	19
1.8.1. Selekcija spontanih triploida u $2x \times 2x$ seksualnom ukrštanju	19
1.8.2. Stvaranje haploida u cilju fuzionisanja sa diploidnim protoplastima	21
1.8.3. Somatska hibridizacija i interploidna seksualna hibridizacija kao metode u procesu oplemenjivanja citrusa	22
1.8.4. Primena somatske i interploidne seksualne hibridizacije u procesu oplemenjivanja plemki citrusa	27
1.8.5. Primena somatske i interploidne seksualne hibridizacije u procesu oplemenjivanja podloga citrusa	30
2. CILJ RADA	33
3. MATERIJAL I METODE	34
3.1. Somatska hibridizacija (fuzija protoplasta)	34
3.1.1. Uspostavljanje i gajenje embriogenih kultura (nucelarnog kalusa i ćelijskih suspenzija)	34
3.1.2. Priprema i enzimski tretman ćelija iz embriogenih kultura suspenzija	37
3.1.3. Priprema i enzimski tretman tkiva iz listova	39
3.1.4. Određivanje efikasnosti enzimskih smesa za izolovanje protoplasta iz embriogenih kultura suspenzija i neembriogenih mezofilnih ćelija	40
3.1.5. Izolacija i prečišćavanje protoplasta	41
3.1.6. Hemijska fuzija protoplasta uz pomoć polietilen glikola (PEG)	42
3.1.7. Regeneracija biljaka iz fuzionisanih protoplasta	43
3.1.8. Identifikacija somatskih hibrida	46
3.1.8.1. Utvrđivanje nivoa ploidnosti pomoću "flow" citometrije	46
3.1.8.2. Utvrđivanje auto- i alotetraploidnosti somatskih hibrida pomoću EST-SSR molekularne analize	47
3.1.9. Mikro-kalemljenje somatskih hibrida na komercijalnu biljnu podlogu i njihovo gajenje u stakleniku	50
3.1.10. Analiza plodova somatskih hibrida gajenih u polju	51
3.2. Interploidna i diploidna seksualna hibridizacija	54
3.2.1. Biljni material	54
3.2.2. Prikupljanje polena i utvrđivanje polenske vijabilnosti	55
3.2.3. Polinacija, ubiranje plodova i ekstrakcija semena	56
3.2.4. Kultura ("spašavanje") zigotskih embriona	57
3.2.5. Utvrđivanje nivoa ploidnosti seksualnih hibrida pomoću "flow" citometrije	58

3.2.6. Mikro-kalemljenje seksualnih hibrida na komercijalnu biljnu podlogu i njihovo gajenje u stakleniku	58
3.3. Kratki opis kultivara/selekcija/hibrida korišćenih za oplemenjivanje mandarina	58
3.3.1. Diploidni roditelji	58
3.3.2. Tetraploidni roditelji	72
4. REZULTATI	77
4.1. Somatska hibridizacija (fuzija protoplasta)	77
4.1.1. Uspostavljanje embriogenih kultura kalusa i ćelijskih suspenzija	77
4.1.2. Uspostavljanje embriogenih ćelijskih suspenzija iz kultura kalusa	81
4.1.3. Dobijanje protoplasta iz mezofilnih ćelija lista	82
4.1.4. Ispitivanje efikasnosti enzimske smese koja se koristi za izolovanje protoplasta iz embriogenih kultura suspenzija i neembriogenih mezofilnih ćelija	82
4.1.5. Fuzija protoplasta i ispitivanje uticaja različitih molekularnih masa PEG na efikasnost proizvodnje somatskih hibrida	85
4.1.6. Analiza porekla somatskih hibrida pomoću "flow" citometrije i EST-SSR molekularne analize	91
4.1.7. Morfologija listova somatskih hibrida	94
4.1.8. Analiza plodova somatskih hibrida gajenih u polju	98
4.2. Interploidna i diploidna seksualna hibridizacija	112
4.2.1. Vijabilnost polena	114
4.2.2. Utvrđivanje ukupnog broja plodova i kategorizacija semena	114
4.2.3. Kultura ("spašavanje") zigotskih embriona	117
4.2.4. Kategorizacija izolovanih embriona i utvrđivanje nivoa ploidnosti	119
5. DISKUSIJA	132
5.1. Somatska hibridizacija (fuzija protoplasta)	132
5.1.1. Efikasnost indukcije embriogenog kalusa iz nucelarnog tkiva ovula	134
5.1.2. Ispitivanje efikasnosti enzimske smese koja se koristi za izolovanje protoplasta iz embriogenih kultura suspenzija i neembriogenih mezofilnih ćelija	135
5.1.3. Uspešnost "hemijske" fuzije protoplasta sa PEG za dobijanje auto- i alotetraploidnih hibrida	137
5.1.4. Morfološka, citološka i molekularna analiza auto- i alotetraploidnih somatskih hibrida	140
5.1.5. Analiza plodova somatskih hibrida gajenih u polju	147
5.2. Interploidna i diploidna seksualna hibridizacija	152
5.2.1. Uspešnost oprašivanja i formiranja plodova	152
5.2.2. Kategorizacija semena i uspešnost tehnike "spašavanja" embriona	155
5.2.3. Efikasnost dobijanja triploidnih hibrida	163
6. ZAKLJUČCI	166
LITERATURA	168

SKRAĆENICE

AFLP	amplified fragment length polymorphism
BAP	6-benzil-aminopurin
C	‘Clementine’ mandarina
CAPS	cleaved amplified polymorphic sequence
Ch	‘Changsha’ mandarina
CMS	citoplazmatska muška sterilnost
CREC	Citrus Research and Educational Center
CTV	citrus tristeza virus
D	‘Dancy’ mandarina
2,4-D	2,4-dihlorfenoksi-sirćetna kiselina
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol fluorescentna boja
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
DPI	Department of Plant Industry
EBN	”Endosperm Balance Number” hipoteza
EST-SSR	expressed sequence tag – simple sequence repeat
F	‘Furr’ tangor
FAO	Food and Agricultural Organization of the United Nations
FDA	fluorescein-diacetat
FAWM	Florida Automated Weather Network
GA ₃	giberelna kiselina
GISH	genomic in situ hybridization
H	‘Hamlin’ pomorandža
HBP	‘Hirado Buntan’ pameló
HLB	bolest citrusa “greening” koga izaziva Huanglongbing bakterija
ISSRs	inter-simple sequence repeats
Minn	‘Minneola’ tangelo
MM	molekulska masa
Mt	‘Murcott’ tangor
mt	metrička tona
N	‘Nova’ tangelo
NAA	 α -naftil-sirćetna kiselina
Osc	‘Osceola’ tangelo
P, Pg	‘Page’ tangelo
PCR	polymerase chain reaction - reakcija lanč anog umnožavanja
PEG	polietilen glikol
Ort	‘Ortanique’ tangor
Po	‘Ponkan’ mandarina
RAPD	random amplified polymorphic DNA
RFLP	restriction fragment length polymorphism
RHS	Royal Horticultural Society
RR	‘Rhode Red Valencia’ pomorandža
S	‘Satsuma’ mandarina
Sck	‘Snack’ tangor
SSRs	simple sequence repeats

Suc	 ‘Succari’ pomorandža
4XSuc	 autotetraploidna ‘Succari’ pomorandža
TA	 total acids tj. kiselost
TSS	 total soluble solids tj. °briks
USDA	 United States Department of Agriculture
Val	 ‘Valencia’ pomorandža
WL	 ‘Willowleaf’ mandarina
WM	 ‘W.Murcott’ tangor

1. UVOD

1.1. Taksonomija i poreklo roda *Citrus*

Rod *Citrus*, kao i njegovi bliski srodnici, pripadaju redu *Geraniales*, podredu *Geraniineae*, familiji *Rutaceae* i podfamiliji *Aurantioideae* poznatijoj kao podfamilija pomorandži (Nicolosi 2007). Taksonomska podela unutar ove podfamilije je kompleksna i ponekad zbunjujuća pa se u današnjoj literaturi istovremeno koristi nekoliko taksonomskih sistema. Glavni razlozi konfuzije i neslaganja su pre svega seksualna kompatibilnost roda *Citrus* sa srodnim rodovima kao i njihovo lako ukrštanje koje se dešava unazad već vekovima. Takođe tu spadaju široko rasprostranjenje predstavnika roda *Citrus* i učestala pojava prirodnih mutacija pupoljaka.

Najkorišćeniji i najdetaljniji taksonomskih sistem je po Swingle-u (Swingle 1967). Po njemu, podfamilija *Aurantioideae* ima 2 tribusa: *Clauseneae* i *Citreae*. Tribus *Clauseneae* u sebi obuhvata 3 podtribusa sa ukupno 5 primitivnijih rodova. Situacija u tribusu *Citreae* je malo komplikovanija jer se on deli u 3 podtribusa sa ukupno 28 rodova. Najinteresantniji je svakako podtribus *Citrinae* jer u sebi obuhvata rod *Citrus* i njemu srodne rodove: *Fortunella*, *Poncirus*, *Eremocitrus*, *Microcitrus* i *Clymenia*. Po Swingle-u, podfamilija *Aurantioideae* ima ukupno 203 vrste, od toga rodu *Citrus* pripada 16.

Drugi taksonomski sistem koji se često sreće u literaturi je sistem po japanskom botaničaru T. Tanaka (1977). On je podelio rod *Citrus* u dva podroda *Archicitrus* i *Metacitrus*, 8 sekcija, 15 podsekcija, 8 grupa, 2 podgrupe, 2 mikrogrupe i unutar svih njih opisao 162 vrste. Tanaka je, naime, pripisivao rang vrste svim onim prirodnim formama koje su pokazivale i najmanju razliku u morfološkim karakteristikama (npr. veličina listova ili plodova) pa otuda toliki veliki broj vrsta u njegovom sistemu. S druge strane, Swingle je bio mnogo rigorozniji i ovakvim formama dodeljivao rang podvrste. U literaturi se takođe sreće taksonomska podela po RW Hodgson-u (1961). Po ovom autoru, rod *Citrus* ima ukupno 36 vrsta koje su razvrstane u 4 različite grupe: pomorandže, mandarine, kiselo voće, i grupa svog ostalog citrusnog voća.

Od 80-tih godina prošlog veka pa sve do danas pojavilo se nekoliko tzv. modernih taksonomskih sistema koji su bazirani ne samo na morfo-anatomskim razlikama i geografskom poreklu već na rezultatima dobijenim iz analiza sa

biohemijskim i molekularnim markerima (Herrero *et al.* 1996; Luro *et al.* 1995; Fang *et al.* 1998; Nicolosi *et al.* 2000). Moderni taksonomski sistemi daju mnogo jasniju sliku o tome šta se može nazvati pravom vrstom i većina njih se slaže da u okviru roda *Citrus* postoje 3 velike filogenetske grupe (grupa mandarina, pamelu grupa, kao i citron grupa) i nekoliko manjih. Nameće se zaključak da današnji kultivisani citrus vodi poreklo od 3 primordijalne vrste: *C. medica* (citron), *C. grandis* (pamelu) i *C. reticulata* (mandarina) koje su prve nastale i da su se od njih razvile sve ostale vrste/podvrste u procesu njihovog međusobnog ukrštanja ili ukrštanja sa predstavnicima iz srodnih rodova. Takođe se smatra da su preteče spomenute 3 primordijalne vrste: *C. hystrix*, *C. latipes*, *C. macroptera*, *C. ichangensis* i *C. combara* (Nicolosi *et al.* 2000; Nicolosi 2007).

Utvrđivanje porekla roda *Citrus* je jako kompleksan proces zbog velikog genetičkog diverziteta i različitih centara nastanka vrsta unutar ovog roda. Tačno mesto i vreme nastanka citrusa nisu jasno identifikovani, ali postoji saglasnost da bi to moglo da bude u tropskim i subtropskim regionima jugo-istočne Azije (severo-istočnoj Indiji, severnoj Burmi, jugo-zapadnoj Kini i Malajskom arhipelagu) 2000 godina pre nove ere (Davies & Albrigo 1994). Mnogi autori (Tanaka 1954; Gmitter & Hu 1990; Calabrese 1998) smatraju da je upravo kineska provincija Junan (koja leži severno od Burme, Laosa i Vijetnama), zbog svoje velike raznolikosti u vrstama roda *Citrus*, glavni centar nastanka ovih vrsta. Ukoliko je kineska provincija stvarno glavni centar nastanka vrsta roda *Citrus*, onda se on odatle polako proširio na druge susedne orijentalne regione i dalje samo pratio civilizacijske putanje i kretanja.

Rasprostiranje i širenje citrusa iz Azije u Evropu je bilo sporo u početku. Citron (*Citrus medica*) je bio prvi citrus koji je donešen u Evropu, u istočni deo Mediterana, od strane Jevreja (Soost & Roose 1996) ali se ne zna tačno kada se to desilo i kako je uopšte prenešen iz svoje native postojbine - Indije. Za citron se zna da je imao važnu ulogu u jevrejskim religioznim ritualima i da je taj običaj započet još u prvom veku a možda i ranije. Nakon što su Jevreji preneli citron u istočni deo Mediterana, ova vrsta se brzo proširila do Italije i drugih evropskih država sa toplom klimom. Kiselu pomorandžu (*C. aurantium*) su verovatno Arapi preneli iz Indije u istočni deo Mediterana u X veku a odatle se ona polako proširila u države severne Afrike i južne Evrope tj. mediteranski basen. U XII veku su na sličan način rasprostranjeni limun (*C. lemon*), kiseli lajm (*C. aurantifolia*) i pamelu (*C. grandis*) (Soost & Roose 1996).

Slatka pomorandža (*C. sinensis*) je došla iz Kine u Evropu uz pomoć Portugalaca u 16-om veku. U Kini je gajena vekovima i tamo je dosegla visoki stepen uzgoja pre nego što je uopšte postala poznata u Evropi (Weber 1967).

Mandarine (*C. reticulata*) nisu bile poznate u Evropi sve do modernih vremena bez obzira što su u Kini i Japanu gajene vekovima. Prvo drvo je doneto iz Kine u Englesku 1805. godine i odatle se rasprostrlo po celom Mediteranu (Soost & Roose 1996; Nicolosi 2007). Grejpfrut (*C. paradisi*), koji je nastao na Barbadosu tek sredinom XVIII veka je dosegao Severnu Ameriku u XIX a Evropu tek u XX veku.

Citrus, izuzev grejpfruta, je stigao sa starih na nove kontinente, Severnu i Južnu Ameriku, tek u XV veku sa španskim i portugalskim pomorskim ekspedicijama, specijalno onim koje je organizovao Kolumbo (Allen 2000). Do početka druge polovine XIX veka već su bile uspostavljene kompanije koje su trgovale svežim plodovima citrusa da bi tehnologija zamrznutog koncentrovanog soka zaživela 1940-tih godina prvi put u Floridi, zbog povećanog zahteva tržišta za ovim proizvodom (Lewandowski 2000).

1.2. Rasprostranjenost i ekonomski značaj gajenja citrusa

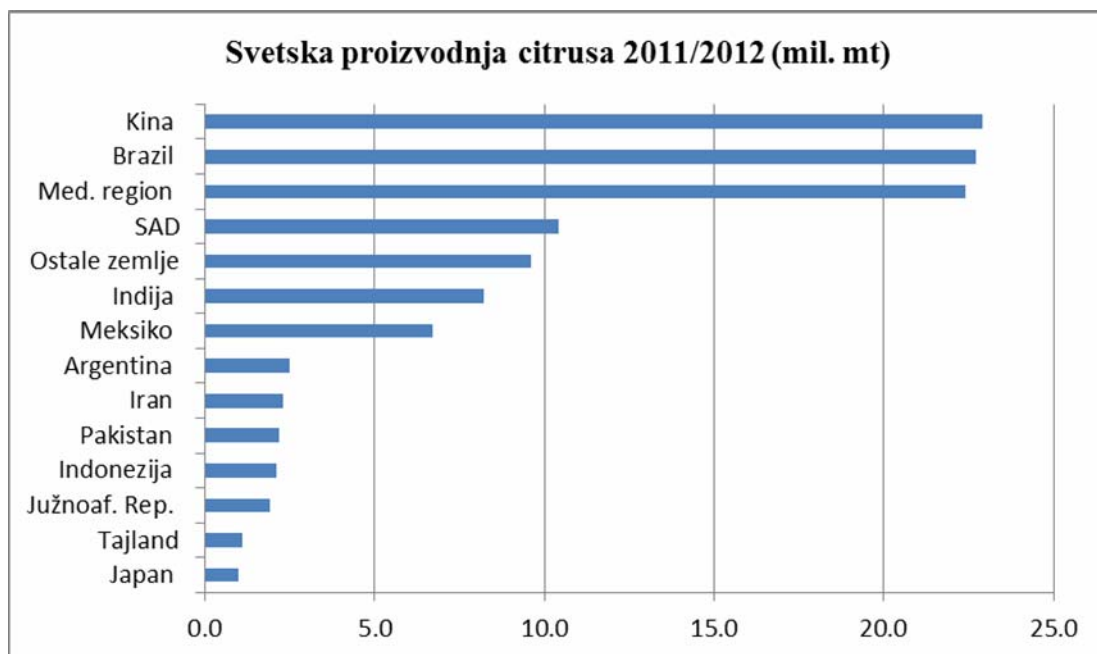
U okviru podfamilije *Aurantioideae* samo tri roda su od komercijalnog značaja: *Citrus* (pravi citrus), *Poncirus* (trolisne pomorandže) i *Fortunella* (kumkuat). Sam rod *Citrus* u sebi obuhvata veliki broj komercijalno važnih vrsta a najpoznatije su: slatka pomorandža, kisela pomorandža, limun, mandarina, grejpfrut, citron, pamelio i kiseli lajm (Saunt 1990). Ovo voće osim što ima fantastičan ukus ima i hranljivo i blagotvorno dejstvo na čovečji organizam. Odavno se zna da je bogato prirodnim hranljivim materijama kao što su minerali, vitamini (specijalno vitamini C i A), flavonoidi, limonoidi, karotenoidi (npr. likopen), folna kiselina i pektinska vlakna; mnoge od njih su poznate kao antioksidansi (Katz & Weaver 2003). Do sada je objavljen veliki broj medicinskih studija kojima je dokazana zaštitna uloga hranljivih komponenata citrusa od raznih vrsta kancera kod čoveka (Tian *et al.* 2001; Rafter 2002; Li *et al.* 2010).

Plodovi citrusa se konzumiraju u svežem stanju, ali se takođe koriste za ceđenje soka. Kora ploda je nejestiva, ali ima upotrebnu vrednost u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji jer sadrži u sebi eterična ulja izrazitog mirisa i tonizirajućeg dejstva (Katz & Weaver 2003). Ono što je novijeg datuma jeste prehrana stoke sa nusproizvodima koji

zaostaju posle ceđenja soka iz plodova citrusa. Smatra se da bogata energetska vrednost u ostacima plodova može da zameni travu/seno u animalnoj prehrani a da ne poremeti kvalitet dobijenog mleka (Fegeros *et al.* 1995).

Citrus se danas gaji u oko 140 zemalja (na svih 6 kontinenata) skoncentrisanih u oblastima koje se nalaze unutar subtropskog i tropskog klimatskog regiona (unutar 40° severne i južne geografske širine). U tim oblastima postoji dovoljno atmosferske vlažnosti da podrži rast drveća a zime nisu preterano hladne da bi ih ubile (Soost & Roose 1996).

Glavni proizvođači su Brazil (20%), mediteranske zemlje (15%), SAD (Kalifornija, Arizona, Teksas, Florida, zajedno - 14%) i Kina (12%) i one doprinose sa 2/3 u ukupnoj proizvodnji citrusa. Svetska proizvodnja citrusa se sistematski uvećavala u poslednje četiri decenije i u 2011/2012 sezoni je premašila prinos od 116 miliona metričkih tona (mt) (**Slika 1**) (Internet stranica FAO). Od toga na pomorandže otpada 55%, mandarine 23%, limun/lajm 11%, grejpfrut 5% a na ostale citruse 6%. Što se tiče samih mandarina, najveći proizvođači su Kina (13 mil. mt), Španija (2 mil. mt), Brazil (1 mil. mt), Japan (1 mil. mt) a za njima slede Turska, Italija, Egipat, Južna Koreja, SAD, Pakistan, Iran i dr. (Internet stranica FAO).



Slika 1. Svetska proizvodnja citrusa (Internet stranica FAO).

1.3. Poreklo, klasifikacija i morfo-fiziološke karakteristike mandarina

Mandarine i njihovi hibridi predstavljaju najveću gupu roda *Citrus*. Po izgledu najviše potsećaju na pomorandže zbog čega se često pogrešno nazivaju “lakoljuštećim pomorandžama” mada između ove dve prirodne grupe postoje jako izražene razlike. Kao i u slučaju svih ostalih citrusa, pravo poreklo i mesto nastanka mandarina je teško utvrditi (Nicolosi *et al.* 2000). Hirai *et al.* (1986) navode da današnje gajene mandarine imaju tri mesta nastanka i da su to: Indija, Kina i Japan. Po drugom mišljenju, jugo-zapadna Kina je primarno mesto nastanka mandarina odakle su se one dalje proširile u jugoistočnu Aziju i Indiju (Saunt 1990). Za Kinu se zna da ima najduži staž u gajenju mandarina (oko 4000 godina) jer najraniji pisani zapisi o ovom voću datiraju iz vremena Ta-Ju kraljevine koja je vladala od 2205-2197. godine pre nove ere. U japanskoj literaturi se mandarina pojavila u XIII veku a tek početkom XIX veka je prenešena u Evropu. Na američko kopno je donešena između 1840-1850. godine kada je italijanski konzul zasadio prve stabljike u svom konzulatu u Nju Orleansu. Odatle je ovo voće lako našlo svoj put do tople Floride i Kalifornije gde se ubrzo počelo sa njihovom komercijalnom propagacijom (Hodgson 1967).

Do danas je bilo nekoliko pokušaja da se mandarine klasifikuju u grupe ili vrste. Američki autor Swingle (1967) ih je grupisao u tri vrste dok ih je japanski autor Tanaka (1954) svrstao u 36 vrsta. Obe klasifikacije imaju svoje manjkavosti (jedna se smatra preoskudnom a druga preobimnom) zbog čega se u literaturi najčešće koristi sistem po RW Hodgson-u (1967) gde su najznačajniji kultivari mandarina svrstani u četiri vrste: ***C. deliciosa*** (mediteranska mandarina), ***C. nobilis*** (king i kunenbo), ***C. unshiu*** (satsuma) i ***C. reticulata*** (najveća i najraznorodnija grupa gde se pored tzv. običnih mandarina nalaze i klementine, tangori, tangeli i svi njihovi hibridi). Treba napomenuti da često korišćeni pojam “tangerine” ne označava zasebnu botaničku grupu u okviru mandarina niti predstavlja sinonim za mandarine. Ovaj pojam je ušao u upotrebu u XIX veku kao pokušaj da se njime istaknu kultivari mandarina sa tamno-narandžastom bojom kore. Dakle, pojam je isključivo komercijalnog karaktera (Saunt 1990). Morfo-fiziološke karakteristike po kojima se mandarine izdvajaju u posebnu grupu citrusa su sledeće:

- plodovi su male i srednje veličine elipsoidnog do ovalnog oblika;

- kora i unutrašnji segmenti ploda slabo prijanjaju jedni uz druge (mnogo slabije nego kod bilo koje pomorandže) zbog čega se plodovi lako ljušte a segmenti lako razdvajaju jedni od drugih;
- ukus i miris ploda su prepoznatljivi i različiti od svih ostalih citrusa;
- semena su sa zelenkastim kotiledonima (uz pojedine izuzetke);
- drvo je otporno na niske temperature (više nego bilo koja pomorandža) ali plod nije, pretežno zbog male veličine i tanke kore ploda; iz istih raloga je plod jako otporan na visoke temperature;
- list ima prepoznatljivu razraslu lisnu dršku (uz pojedine izuzetke);
- lisna površina je zašiljena na vrhu sa jako izraženim lisnim nervom;
- bodlje su male, malobrojne ili u potpunosti odsustvuju;
- cvetovi su mali, raspoređeni pojedinačno ili grupisani u sitne negranate cvasti (Hodgson 1967).

Spomenute karakteristike mandarina - otpornost na niske i visoke temperature im omogućavaju da kao grupa biljaka imaju dobru adaptaciju na različite klimatske uslove tj. mogu da rastu u: tropskim, subtropskim, polutropskim i pustinjским klimatskim uslovima. Tako se mandarine gaje u oblastima sa suvom i umerenom mediteranskom klimom (npr. u Španiji, Italiji, Maroku, Turskoj) ali isto tako i u oblastima sa toplom i vlažnom tropskom klimom (npr. Brazilu, Argentini, jugoistočnoj Kini) ili sa toplom i sušnom pustinjским klimom (Iran, Egipat). S druge strane, kad se pogleda unutar grupe, uočava se da pojedinačni kultivari mandarina imaju usku specifičnost u pogledu klimatskih zahteva koji se u velikoj meri odražavaju na kvalitet ploda i prinos. Tako je npr. kultivar ‘Clementine’ najspecifičniji u klimatskim zahtevima (najbolje uspeva na toplim i suvim staništima bez perioda hladnih zima); shodno tome ima jako ograničenu distribuciju i javlja se samo u priobalnim delovima Maroka, Španije i Korzike. Manje su specifične mandarine iz grupe ‘Satsuma’ koje mogu da uspevaju u subtropskim regionima sa hladnim zimama ali i u onima sa blagim zimama. Kvalitet ploda i prinos ‘Satsuma’ mandarina su ipak bolji u subtropskim regionima sa hladnim zimama. Uska specifičnost u pogledu klimatskih zahteva dalje znači da kultivari imaju različite zahteve u pogledu ukupne količine toplote koju treba da prime a koja je neophodna za sazrevanje ploda. U tom smislu kultivari imaju različitu sezonu sazrevanja ploda. ‘Satsuma’ mandarine najranije sazrevaju (na početku

jeseni) tj. za zrenje plodova im je potrebna najmanja količina toplote dok plodovi ‘King’ mandarine sazrevaju tek u kasno proleće. Svakako da klimatski faktori utiču na sastav i ukus ploda (npr. topla i vlažna podneblja utiču na plod da bude sočniji i blaži po ukusu jer je u takvim oblastima niži nivo kiselih materija u plodu) kao i na veličinu i oblik ploda (niska vlažnost vazduha utiče na osu ploda da bude izduženija tj. da plod poprimi više loptastiji oblik. Specifični zahtevi koje mandarine pokazuju u pogledu klimatskih faktora kao i uticaj tih klimatskih faktora na prinos i kvalitet ploda u mnogome objašnjavaju zašto se komercijalne mandarine gaje na malom prostoru unutar SAD – na Floridi i u najtoplijim delovima Kalifornije i Arizone (Saunt 1990; Hodgson 1967).

Zajedničko svim kultivarima mandarina je da imaju kratku sezonu berbe, odnosno, da čim plodovi postignu zrelost moraju brzo da se uberu da bi mogli da se koriste. Ukoliko se plodovi ne uberu i ostanu na drvetu, kora počinje da se odvaja od srži ploda, menja se kiselost i plod počinje da menja ukus i da truli.

Ono što razlikuje mandarine od ostalih grupa citrusa (specijalno pomorandži) jeste velika varijabilnost unutar te grupe u pogledu veličine i boje ploda, debljine i prijanjanja kore, ukusa i perioda sazrevanja. Ova velika genetička različitost između kultivara mandarina je posledica njihovog nastanka putem seksualne hibridizacije (za razliku od kultivara unutar grupe pomorandži, grejpfruta, limuna i lajma koji su nastali u procesu odabira nucelarnih klijanaca ili zahvaljujući prirodnim mutacijama pupoljaka tzv. ”budsports”) (Uzun & Yesiloglu 2012).

1.4. Kultura tkiva vrsta roda *Citrus*

U cilju primene biotehnoloških metoda u oplemenjivanju citrusa bilo je neophodno prvo razviti efikasnu tehniku dobijanja kulture tkiva sa embriogenim potencijalom. U razvijanju ove tehnike, ključnu ulogu je imala nucelarna poliembrionija – aseksualni oblik propagacije koja se sreće kod mnogih vrsta citrusa. Nucelarna poliembrionija je ustvari adventivna (somatska) embriogeneza a rezultat je totipotentnosti majčinskog somatskog nucelnog tkiva unutar ovula/semena; javlja se nezvezano od procesa oprašivanja i oplođenja. Tako se unutar poliembrionog semena nalazi veliki broj aseksualnih (nucelarnih) embriona ali je među njima takođe moguće i prisustvo seksualnog (zigotskog) embriona; razlika između nucelnog i zigotskog embriona je u

tome što zigotski ima potpuno nov genotip dok nucelarni embrion ima genotip majke pa se za njega kaže da je “true-to-type” (Soost & Roose 1996).

Ranih 1960-ih godina je pokazano da je izdvajanjem nucelusa iz semena ili gajenjem neoplođenih ovula moguće dobiti adventivne (somatske) embrione *in vitro* (Maheshwari & Rangaswamy 1958; Swamy 1961; Sabharwal 1962). Svi kasniji radovi su bili o utvrđivanju optimalne hranljive podloge i starosnog stanja nucelusa/ovula za indukciju somatske embriogeneze. Rangan *et al.* (1968) su dobili uspešnu indukciju somatske embriogeneze iz nucelarnog tkiva izolovanog iz nezrelih semena plodova starosti 100 – 120 dana kod tri monoembriogene vrste citrusa tako što su gajili eksplantate na Murashige & Skoog (MS) (1962) podlozi bogatoj maltoznim ekstratom (500 mg/l). Sa razvitkom MT hranljive podloge (Murashige & Tucker 1969) počela je jedna nova etapa u istoriji kulture tkiva citrusa. Radeći sa limunom (*C. limon*), Murashige & Tucker su dobili indukovani kalus, iako nije postignuta potpuna regeneracija biljaka. Po ovim autorima, egzogeno dodati auksini i citokinini u hranljivoj podlozi nisu bili kritični faktor za kalusogenezu kod limuna. Od velike važnosti su bili izvesni vitamini: nikotinamid, piridoksin-HCl i tiamin-HCl, jer se pokazalo da je za gajenje tkiva citrusa potrebno dodati ove vitamine u hranljivu podlogu u mnogo većim koncentracijama u odnosu na vitamine u MS recepturi (koja se inače koristi za gajenje *in vitro* tkiva većine drugih vrsta). Naime, u MT hranljivoj podlozi u odnosu na MS ima 10× više nikotinamida, 20× više piridoksina-HCl a tiamina-HCl 100× više. U istom radu su Murashige & Tucker pokazali da je saharoza od 5% neophodna u indukciji i održavanju kalusnih kultura citrusa u odnosu na koncentraciju od 3% koja se uglavnom koristi za druge vrste. U svim ostalim aspektima, MT hranljiva podloga sadrži istu koncentraciju makro i mikroelemenata kao i najčešće upotrebljivana MS hranljiva podloga.

Kasnije, Kochba *et al.* (1972) su pokazali da ovule izolovane iz četiri nedelje starih plodova ‘Shamouti’ slatke pomorandže (*C. sinensis*) i ovule iz 6-8 nedelja starih plodova ‘Valencia’ slatke pomorandže i ‘Marsh’ grejpfruta (*C. paradisi*) imaju najveći embriogeni potencijal. U ovom slučaju je somatska embriogeneza bila indukovana na MT hranljivoj podlozi uz dodatak 500 mg/l maltoznog ekstrakta i bez regulatora rastanja, ali dobijeni somatski embrioni nisu mogli da se razviju dalje u kompletne biljčice bez dodatka GA₃ (giberelne kiseline), kinetina i IAA (indol-3-sirćetne kiseline).

Pored direktne embriogeneze, Kochba *et al.* su u istom ovom radu uspjeli da dobiju i kalus iz nucelusa ali samo kod ‘Shamouti’ slatke pomorandže.

Rezultati svih kasnijih istraživanja su pokazali da indukcija embriogenog kalusa iz nucelusa zavisi od kombinacije više faktora kao što su npr: sredinski faktori u kojima se razvijala majka biljka, genotip, starost eksplantata, komponente hranljive podloge i sredinski faktori gajenja eksplantata (Grosser & Gmitter 1990). U literaturi ne postoji jedinstven efikasan protokol za indukciju nucelnog embriogenog kalusa kod svih citrusa, već je taj protokol različit kod različitih vrsta/kultivara. Grosser *et al.* (2010b) u opisu protokola za indukciju embriogenog kalusa kod citrusa sugeriraju korišćenje MT hranljive podloge sa 5% saharoze i 0.5 mg/l maltoznog ekstrakta bez dodatka regulatora rastanja i/ili 5 mg/l kinetina. Na MT hranljivoj podlozi bez regulatora rastanja je moguće postići kalusogenezu kod mnogih vrsta citrusa: ‘Ponkan’ mandarine (*C. reticulata* Blanco), ‘Cravo’ mandarine (*C. reticulata* Blanco), ‘Itaboraí’ slatke pomorandže (*C. sinensis*), ‘Valencia’ slatke pomorandže (*C. sinensis*) i ‘Kinnow’ mandarine (*C. nobilis* × *C. deliciosa*, Tenore) (Ricci *et al.* 2002). Međutim, za mnoge druge vrste/kultivare je potrebno egzogeno dodati regulatore rastanja pretežno citokinine i to u visokoj koncentraciji (Starrantino & Caponnetto 1990; Carimi *et al.* 1998). Ukoliko je za indukciju kalusa potrebno egzogeno dodati regulatore rastanja u hranljivu podlogu, interesantno je da on posle izvesnog vremena gajenja postaje habituiran. Naime, rast kalusa postaje nezavisan od egzogeno dodatih regulatora rastanja (auksina i citokina) i moguće ga je dalje konstantno gajiti na hranljivoj podlozi bez regulatora rastanja. Ovu pojavu kod citrusa su prvi primetili Kochba & Spiegel-Roy (1977) gajeći kalus ‘Shamouti’ slatke pomorandže.

Pored prisutnih regulatora rastanja u hranljivoj podlozi, embriogeni potencijal kalusa poreklom iz nucelusa u mnogome zavisi i od starosti samog kalusa. Kochba & Button (1974) su koristili tri nedelje star kalus ‘Shamouti’ slatke pomorandže kao standard. U odnosu na standard, šest nedelja star kalus je imao 10× veći kapacitet za razvoj embriona, dok je taj kapacitet bio 100× veći kod četrnaestonedelnog kalusa, dok je kalus starosti dvadeset nedelja totalno izgubio embriogeni potencijal. S druge strane, postoji veliki broj radova u kojima se spominje postojanje kalusa koji je godinama gajen u kulturi jer nije gubio embriogeni kapacitet, već se on samo postepeno smanjivao s vremenom (Jiménez *et al.* 2001; Starrantino & Caponnetto 1990).

Morfo-anatomskim ispitivanjem strukture embriogenog kalusa poreklom iz nucelusa (Button *et al.* 1974) je utvrđeno da se ovaj kalus razlikuje od većine biljnih kalusa koji se sastoje od neorganizovanih parenhimskih ćelija sa tendencijom obrazovanja amorfnih oblika. S druge strane, utvrđeno je da se nucelarni kalus sastoji od malih, kompaktnih sfernih nodula (prečnika 0.1-1.0 mm) povezanih međusobno u tesne klastere, koji kao takvi daju kalusu izgled rastresitosti. Za “nodule” je ustanovljeno da su proembrioni koji imaju sposobnost da repetitivno (putem procesa deobe i diferencijacije epidermalnih ćelija primarnih proembriona tj. putem procesa sekundarne somatske embriogeneze) daju sekundarne embrione. Sekundarni embrioni se dalje razvijaju u kotiledonarne embrione koji se konačno razvijaju u biljčice (Litz & Gray 1992).

Za indukciju somatske embriogeneze iz kalusa citrusa je utvrđeno da može biti stimulirana od strane različitih izvora ugljenika u hranljivoj podlozi. Još su Kochba *et al.* 1982. godine pokazali da saharoza nije tako efikasna u indukciji somatske embriogeneze iz kalusa i da čak koncentracije više od 32 mM inhibiraju taj proces. Slične rezultate su dobili i mnogi drugi autori (Ricci *et al.* 2002; Kunitake *et al.* 1991; Mendes-da-Gloria *et al.* 2000a). S druge strane galaktoza, kao i šećeri koji u sebi imaju galaktozu kao monomernu jedinicu - rafinoza i laktoza, mogu da podstaknu embriogenezu kod kalusa ‘Shamouti’ slatke pomorandže (*C. sinensis*) čak i u linijama koje pre nisu pokazivale da imaju embriogeni potencijal (Kochba *et al.* 1977). Glicerol takođe može stimulirati embriogenezu u kulturama koje ne daju puno embriona. U tom slučaju, embrioni moraju biti uklonjeni sa hranljivih podloga obogaćenih sa glicerolom odmah po indukovanju jer u suprotnom vrlo brzo nekroziraju (Ben-Hayyim & Neumann 1983). Pored toga, i maltoza se pokazala mnogo efikasnijom u odnosu na saharozu u indukciji embriogeneze u kalusnoj kulturi dobijenoj nakon somatske hibridizacije ‘Caipira’ slatke pomorandže i ‘Rangpur’ lajma (Mendes-da-Gloria *et al.* 2000a).

Kod citrusa se dosta dugo pokušavalo sa dobijanjem embriogenog kalusa poreklom iz biljnih tkiva koja nisu nucelarna i do sada postoji samo nekoliko radova na tu temu. Hidaka *et al.* (1981) su regenerisali 11 diploidnih biljaka iz antera *C. aurantium* na MS hranljivoj podlozi uz dodatak IAA (0.11-11.42 μ M) i kinetina (0.09-9.30 μ M). Ohgawara *et al.* (1989) su dobili samo nekoliko biljaka iz protoplasta poreklom iz lista ‘Marsh’ grejpfruta gajeći ih na MT hranljivoj podlozi bez regulatora

rastenja. Slične rezultate je dobio i Tusa *et al.* (1990) radeći sa ‘Femminello’ limunom. Nito & Ivamasa (1990) su prvi objavili formiranje kalusa (i 8 embriona iz njih) iz vezikula nezrelih plodova ‘Satsuma’ mandarine (*C. unshiu*). Indukcija kalusa je postignuta na MS podlozi sa dodatkom NAA (1 mg/l). Iste godine su Gmitter *et al.* (1990) uspjeli da dobiju triploidne biljčice iz kalusa poreklom iz endosperma. Oni su indukovali kalus kod *C. grandis*, *C. sinensis* i *C. paradisi* tako što su gajili endosperm (izolovan iz plodova starosti 12-14 nedelja) na MT hranljivoj podlozi sa dvostrukom količinom mineralnih soli i sa dodatkom GA₃. Embriogenza je bila postignuta samo kod slatke pomorandže. Carimi *et al.* (1994) su dobili preko 1000 somatskih embriona iz kalusa poreklom iz stubića/stigme plodnika limuna (*C. limon*) gajenog na MS hranljivoj podlozi uz dodatak 0.5 g maltoznog ekstrakta, 1 mg/l 2,4-D i 3 mg/l BAP. U literaturi se može naći da je samo indijska grupa naučnika (Gill *et al.* 1994; 1995) uspjela da dobije embriogeni kalus iz *in vitro* gajenih tri nedelje starih nucelarnih biljaka a kao eksplantati su korišćeni delovi epikotila, kotiledona, listova i korenova. Problem sa svim embriogenim kalusima poreklom iz biljnih tkiva koja nisu nucelarna je u tome što oni nemaju sposobnost sekundarne somatske embriogeneze kao što je to slučaj sa nucelarnim kalusom.

1.5. Kultura protoplasta vrsta roda *Citrus*

Od svih drvenastih biljnih vrsta, najveći uspeh u dobijanju kulture protoplasta i fuzije protoplasta je postignut upravo u porodici *Rutaceae* (Liu *et al.* 2003). Kod roda *Citrus*, sa uspostavljanjem kulture protoplasta se započelo ubrzo pošto su Kochba *et al.* (1972) objavili dobijanje embriogenog kalusa iz nucelnog tkiva ovula slatke pomorandže (*C. sinensis*) gajenih u *in vitro* kulturi. Prvo uspešno izolovanje protoplasta citrusa se desilo 1975. godine (Vardi *et al.* 1975) nakon što su ćelije embriogenog kalusa poreklom iz neoplođenih ovula ‘Shamouti’ slatke naranče bile gajene preko noći u tačnoj MT hranljivoj podlozi koja je sadržala pektinazu, celulazu i driselazu. U ovom radu je prvi put utvrđeno da je molaritet osmotikuma u hranljivoj podlozi za izolaciju i rastenje protoplasta važan za održavanje njihovog normalnog osmotskog pritiska (u suprotnom oni liziraju) i da je koncentracija od 0.7 M (0.14 M saharoze i 0.28 M manitola i 0.28 M sorbitola) optimalna za izolaciju, dok je 0.6 M najbolja za kultivaciju. Iz ovako izolovanih protoplasta su na kraju dobijeni embrioni, ali se nije uspelo sa regeneracijom

celih biljaka. Regeneracija celih biljaka je postignuta tek nekoliko godina kasnije (Vardi 1977). Ubrzo nakon toga su usledili radovi na mnogim drugim vrstama citrusa i njihovim srodnicima čime je pokazano da je izolacija protoplasta i regeneracija biljaka iz njih moguća i rutinski izvodljiva. Postoji veliki broj revijskih radova u kojima se navode dosadašnji rezultati za sve vrste i kultivare citrusa kod kojih je uspešno postignuta regeneracija biljaka iz protoplasta kao što su Vardi & Galun (1988), Grosser & Gmitter (1990), Liu *et al.* (2003, 2005). Ovo je širom otvorilo vrata korišćenju protoplasta u eksperimentima fuzije protoplasta tj. somatske hibridizacije za koju se ubrzo pokazalo da je jedna od najvažnijih metoda za proces oplemenjivanja citrusa (Grosser & Gmitter 1990).

Radeći na problemu interspecijske/intergeneričke somatske hibridizacije citrusa kasnih 80-tih i ranih 90-tih godina, grupa za ćelijsku genetiku prof. dr JW Grosser-a (sa Univerziteta u Floridi) je dala najveći doprinos stvaranju protokola za rutinsku izolaciju protoplasta iz nucelnog i mezofilnog tkiva. Važan trenutak u istoriji izolacije protoplasta se desio kada je u ovoj laboratoriji 1987. godine (Grosser & Chandler 1987) napravljen enzimski rastvor za digestiju ćelijskog zida koji je mogao da se koristi uspešno i univerzalno kod svih kultivara citrusa. Autori su uspeli da dobiju veliki broj ($2-6 \times 10^7$ protoplasta/g sveže mase) viabilnih protoplasta iz lista kisele pomorandže (*C. aurantium*), 'Swingle' citrumeo hibrid grejpfruta i trolisne pomorandže (*C. paradisi* Macf. $\times$ *P. trifoliata*), 'Carrizo' citrandž hibrid slatke i trolisne pomorandže (*C. sinensis* Osb. $\times$ *Poncirus trifoliata* Raf.), *P. trifoliata* i *S. buxifolia*. Enzimski rastvor se sastojao od 1% celulaze (Onozuka RS), 1% maceraze, 0.2% pektolijaze (Y-23), osmotskog stabilizatora (0.7 M manitola), pufera (6.0 mM MES) i membranskih stabilizatora (12.0 mM CaCl_2 i 1.4 mM NaH_2PO_4). Posle 27 godina od publikovanja, ovaj enzimski rastvor je i dalje u širokoj upotrebi mada je nedavno izvršena mala modifikacija sastava (Grosser *et al.* 2010b). Vremenom se pokazalo da je ovo najbolja kombinacija enzima za izolaciju protoplasta za razliku od ostalih nastalih u drugim laboratorijama koje su sadržavale različite tipove enzima u različitim koncentracijama (Vardi *et al.* 1982) ali nisu davale dovoljan broj protoplasta, niti su imale univerzalnu primenu. Tako su Vardi i Galun (1988) dobili da je broj gajenih protoplasta koji daju kolonije $>10\%$ kod dva različita kultivara 'Shamouti' pomorandže i 'Murcott' tangora kada se oni inkubiraju u mešavini 0.2% celulaze (Onozuka RS), 0.1% drizelaze i 0.3% maceraze (R-10) dok je

taj broj 3-5× manji ako se umesto maceraze koristi pektinaza iste koncentracije. Slučaj je bio obrnut kod 'Villafranca' limuna dok protoplastima 'Duncan' grejpfruta nije odgovarala nijedna od ove dve mešavine te su autori zaključili da se "odgovarajuća enzimaska mešavina treba utvrditi empirijski za svaku različitu kalusnu liniju zasebno". Navođenjem ovog citata se još više želi istaći značaj pronalaženja univerzalne enzimske mešavine za digestiju ćelijskog zida publikovane od strane Grosser & Chandler (1987).

Drugi važan doprinos rada prof. dr Grosser-a na utvrđivanju procedure za rutinsko izolovanje protoplasta kod citrusa jeste dobijanje i objavljivanje sastava BH3 bazalne hranljive podloge (Grosser & Chandler 1987). BH3 podloga je modifikovana MT bazalna hranljiva podloga koja je bila obogaćena sa 3100 mg/l glutamina i substituisanim makrosolima sa 370 mg/l MgSO_4 , 170 mg/l KH_2PO_4 i 1500 mg/l KCl. Pored ove promene, BH3 hranljiva podloga je sadržala šećerne alkohole, vitamine i aditive organskih kiselina iz recepture 8P podloge objavljene od strane Kao & Michayluk (1975) uz dodatak i 250 mg/l kazein-hidrolizata, 500 mg/l maltoznog ekstrakta, 20 ml/l kokosovog mleka, 51.35 g/l saharoze i 82 g/l manitola. Ova hranljiva podloga se u literaturi još sreće kao 0.6 M BH3 gde 0.6 M označava zajedničku molarnost saharoze (0.15M) i manitola (0.45M) jer se pokazalo da su izvor C-atoma i osmotski pritisak u hranljivoj podlozi podjednako važni za uspešnu izolaciju protoplasta.

Definisanje enzimskog rastvora i BH3 hranljive podloge kao i usavršavanje celokupnog protokola za izolaciju protoplasta je ne samo omogućilo već u velikoj meri pospešilo napredak u oblasti somatske hibridizacije kod svih vrsta roda *Citrus*, a ne samo mandarina. Detaljan protokol za izolaciju protoplasta i njihovu fuziju se može naći u revijskom radu (Grosser & Gmitter 1990) kao i poglavlju u knjizi (Grosser *et al.* 2010b).

Važno je napomenuti da izolacija protoplasta kod citrusa ne mora biti ograničena samo na embriogeni nucelarni (ovularni) kalus/suspenziju mada se ova vrsta tkiva najčešće koristi za potrebe fuzije protoplasta. Pregled literature pokazuje da su protoplasti uspešno izolovani iz embriogenog kalusa poreklom od hipokotila kod 'Washington navel' slatke pupčane pomorandže (*C. sinensis*), 'Yuko' (*C. yuko*) i 'Ponkan' mandarine (Hidaka & Kajiura 1988). Što se tiče neembriogenih izvora, protoplasti su uspešno izolovani iz ćelija kotiledona 'Valencia' slatke pomorandže

(Burger & Haket 1982), vezikula ‘Valencia’ slatke pomorandže, ‘Marsh’ grejpfruta i ‘Palestine’ slatkog lajma (*C. limettioides*) (Echeverria 1987) i iz mezofilnih ćelija lista mnogih vrsta citrusa (Grosser & Gmitter 1990). Za potrebe dobijanja haploidnih protoplasta, Ollitrault *et al.* (1996) su koristili ćelije embriogenog kalusa nastalog u procesu indukovane ginogeneze kod ‘Clementine’ mandarine dok su Deng *et al.* (1992) koristili tetrade iz antera *Poncirus trifoliata*.

Kobayashi (1987) je proučavao postojanje varijabilnosti između biljaka regenerisanih iz protoplasta izolovanih iz nucelnog kalusa. Urađena je analiza lisne i cvetne morfologije, prisustva ulja u listu, izozima kao i analiza broja hromozoma i nisu pronađene značajne somaklonalne varijacije između biljaka. Međutim, treba napomenuti da je testirao samo 25 biljaka tako da ove analize ipak nisu dovoljne da bi se tvrdilo da značajne somaklonalne varijacije ne postoje.

1.6. Važnost postojanja bezsemenih kultivara citrusa

Na današnjem tržištu svežeg voća generalno postoje veliko interesovanje potrošača za kupovinom bezsemenih plodova, što pravi veliki pritisak na uzgajivače voća da u voćnjacima u potpunosti zamenjuju semene kultivare sa bezsemenim. Ovaj trend je naročito izražen u proizvodnji grožđa i lubenica pa se npr. u SAD semeni kultivari ovih vrsta više uopšte ne sreću u prodavnicama. Situacija sa citrusnim voćem je slična što se tiče zahteva potrošača, međutim usled nedostatka velikog broja bezsemenih kultivara koji sazrevaju u različito vreme a kojima bi mogla u potpunosti da se zadovolji godišnja potražnja potrošača za takvim plodovima, u prodavnicama se i dalje često sreću semeni kultivari. Drugim rečima, semeni kultivari citrusa služe samo za dopunu asortimana kada nema bezsemenih plodova. Ovo je naročito izraženo u grupi mandarina (Ollitrault *et al.* 2008). Iz navedenog se vidi zašto je proizvodnja novih kultivara sa bezsemenim plodovima postala primarni cilj genetičkog oplemenjivanja mandarina i uopšteno citrusnih voćnih vrsta (Grosser & Gmitter 2011).

Na diploidnom nivou, bezsemenost tj. sterilnost ploda koja postoji spontano u prirodi može biti posledica tri pojave: 1. ženske (♀) / muške (♂) sterilnosti, 2. nemogućnosti samooprašivanja (usled nekljanja polena na sopstvenom stubiću), i 3. ranog abortiranja embriona (Ali *et al.* 2013). Bezsemenost kao posledica ženske (♀) / muške (♂) sterilnosti je dobro poznata kod ‘Mexican’ lajma, ‘Satsuma’ i ‘Encore’

mandarine, ‘Washington Navel’, ‘Hamlin’ i ‘Valencia’ slatke pomorandže. Gametofitna bezsemenost je posledica nemogućnosti samooprašivanja poznata npr. kod izvesnih mandarina i njihovih hibrida (‘Clementine’, ‘Fortune’ i ‘W. Murcott’), a takođe i kod mnogih kultivara pamela (Yamamoto *et al.* 1992; Iwamasa & Oba 1980). U slučajevima muške (♂) sterilnosti i nemogućnosti samooprašivanja međutim biljke daju plodove sa mnogo semena ukoliko se ne drže izolovane tj. ukoliko se mešaju sa dugim kompatibilnim polinatorima pa dolazi do njihovog “ukrštenog” oplodjenja.

Osnova bezsemenosti može biti posledica genetičkih faktora kao što su: **a)** triploidnost (gde postoji neparan broj hromozomskih garnitura čime se narušava normalna mejoza i nastaju hromozomski nebalansirane gameti), **b)** postojanje jednog ili više ”sterilnih” gena i/ili **c)** hromozomske abnormalnosti (aberracije, recipročne translokacije kao npr. kod ‘Valencia’ pomorandže i inverzije kao npr. kod ‘Mexican’ lajma) kojima se onemogućava proces oplodjenja i/ili stvaranja semena (Ali *et al.* 2013). Stvaranje bezsemenih plodova kod citrusa je moguće i zahvaljujući postojanju fenomena partenokarije (stvaranje ploda bez oplodjenja). Za razliku od citrusa, neke druge biljne grupacije koje imaju (♀) / (♂) sterilnost nemaju u isto vreme i partenokariju pa samim tim ne mogu da stvaraju bezsemene plodove.

Zbog velike potražnje za bezsemenim kultivarima na tržištu svežeg voća, u procesu oplemenjivanja citrusa u svetu su se paralelno razvile 3 glavna pravca istraživanja kojima se postiže ova karakteristika ploda:

- 1) Stvaranje kultivara čija je glavna karakteristika nemogućnost samooprašivanja (s tim ciljem su stvorene mandarine: ‘Clementine’, ‘Fortune’ i ‘W. Murcott’ koje da bi davale isključivo bezsemene plodove moraju da se drže izolovane i što dalje od drugih kompatibilnih kultivara citrusa).
- 2) Indukcija mutageneze kod semenih kultivara i stvaranje bezsemenih mutanata (to bi bio primer ‘Mor’ tangora stvorenog zračenjem ‘Murcott’ tangora u Izraelu i ‘Tango’ tangora takođe stvorenog zračenjem ‘Murcott’-a ali u Kaliforniji, kao i mnogi drugi primeri u drugim zemljama) (Spiegel-Roy *et al.* 1985; Chen *et al.* 1991; Froneman *et al.* 1996). Jedina mana ove metode je što bezsemeni mutanti daju značajno manje plodove u odnosu na roditeljske kultivare od kojih su potekli.

- 3) Manipulacija ploidnosti (uspostavljanje poliploidnosti) u cilju stvaranja bezsemenih triploidnih kultivara koji gotovo uvek poseduju žensku (♀)/ mušku (♂) sterilnosti. Ovaj pravac u istraživanju je zbog naglog razvoja novih biotehnoloških metoda u poslednje dve decenije postao najznačajniji u odnosu na prethodno spomenute i to u svim grupama u svetu koje se ozbiljno bave oplemenjivanjem citrusa: Španija, Italija, Francuska, SAD, Brazil, Japan i Kina (Grosser & Gmitter 2011; Ollitrault *et al.* 2008; Wu *et al.* 2005; Navarro *et al.* 2004).

1.7. Pojava spontane poliploidnosti kod citrusa

Većina vrsta roda *Citrus* i njegovih srodnih rodova je diploidna ($2x$) sa osnovnim brojem hromozoma $x=9$ (Krug 1943) pri čemu postoji i nekoliko poznatijih kultivara nastalih spontanom poliploidizacijom u prirodi. To su npr tetraploidni ‘Hongkong’ divlji kumkvat (*Fortunella hindsii* Swing.) (Longley 1925), triploidni ‘Tahiti’ lajm (Jackson & Sharman 1975), tetraploidni *Clausena excavata* Burm. (Froelicher *et al.* 2000), heksaploidni *Glycosmis pentaphylla* (Froelicher 1999) itd. Dakle, poliploidni (tri-, tetra-, penta-, heksa-, i okto-ploidni) citrus može spontano da se javlja u prirodi. Generalno, postoje dva osnovna mehanizma koji dovode do spontane poliploidizacije kod citrusa 1) stvaranje neredukovanih ($2n$) gameta (kao posledica restitucije nukleusa tokom mejoze megaspore) koji stvaraju triploide u ($2x \times 2x$) a alotetraploide u ($2x \times 4x$) hibridizaciji; i 2) duplikacija hromozoma bez ćelijske deobe u nucelarnom tkivu što dovodi do stvaranja autotetraploida (Ollitrault *et al.* 2008).

Spontani **triploidi** ($3x$) citrusa mogu da nastanu u prirodi kao rezultat seksualnog ukrštanja dva diploida ($2x \times 2x$) gde majka biljka ima prirodnu tendenciju stvaranja neredukovanih $2n$ gameta (Luro *et al.* 2004) pa dolazi do njihovog spajanja sa očevim redukovanim haploidnim gametom. Frekvencija dupliranja genetičkog materijala u ženskim gametima varira od 1-20% (Soost 1987) a njen uzrok je restitucija nukleusa posle prve mejotičke deobe (kod npr. pomorandže) (Chen *et al.* 2008c) mada može da se javlja i kao posledica zaustavljanja druge mejotičke deobe megaspore (kod npr. ‘Clementine’) (Esen *et al.* 1979; Luro *et al.* 2000). Spontani triploidi se javljaju kada je ženski roditelj monoembriogen (pretežno u malim i abnormalnim semenima) ali isto tako kada je i poliembriogen a učestalost ove pojave u semenima zavisi od

kultivara. Tako je kod monoembriogenih mandarina ‘Clementine’ učestalost 1% dok je kod ‘King’ ona 6-7% (Geraci *et al.* 1975). Kod nekoliko kultivara slatke pomorandže i njihovih hibrida Oiyama *et al.* (1980) su pronašli vrlo visoku učestalost pojave spontanih triploida od 8-33% dok je ona iznosila 0-11.5% kod različitih kultivara limuna (Geraci 1978). Autori su zaključili da postoji genetička kontrola formiranja triploidnih embriona ali isto tako i uticaj sredinskih faktora obzirom da isti kultivar može imati različite stope stvaranja triploidnih hibrida u različitim godinama (Geraci *et al.* 1977). Citogenetičke studije su pokazale da su spontani triploidni embrioni u semenima nastali iz ukrštanja dva diploida ($2x \times 2x$) okruženi pentaploidnim endospermom (odnos ploidnosti embriona i endosperma je 3:5) (Esen *et al.* 1979) pa semena iako su mala mogu spontano da klijaju u zemlji i da daju biljčice bez primene *in vitro* metode ”spašavanja” embriona (Aleza *et al.* 2010a).

Što se tiče gametske vijabilnosti 3x hibrida, ona je znatno smanjena jer postoji problem hromozomskog sparivanja (stvaraju se multivalentne hromozomske asocijacije) u toku mejoze (metafaze I) mikro/megasporegeneze. Posledica abnormalnog hromozomskog komplementa kod npr. megaspora je proizvodnja aneuploidnih gameta zbog čega dolazi do zaustavljanja megasporogeneze i stvaranja bezsemenih plodova (Fatta del Bosco *et al.* 1992). Ipak, triploidi mogu da stvaraju haploidne, diploidne i triploidne gamete u vrlo niskoj stopi što može dovesti do stvaranja diploidnog, triploidnog i tetraploidnog potomstva (Otto & Whitton 2000).

Identifikacija triploidnih biljaka zahvaljujući specifičnim morfološkim karakteristikama (tj. njihova selekcija kad se nalaze u populaciji sa 2x biljčicama) nije moguća zato što imaju visoku varijabilnost. Visoka varijabilnost kod 3x biljaka postoji zahvaljujući njihovom zigotskom nastanku (Cameron & Frost, 1968). Starrantino (1992) je uočio da indukovani 3x hibridi proistekli iz ($2x \times 4x$) hibridizacije imaju dobar vigor i plodove slične po karakteristikama muškom roditelju (koji daje 2n gamet) a da se jedino razlikuju od 2x i 4x roditelja po tome što su bezsemeni.

Spontani **tetraploidi** (4x) citrusa mogu da nastanu u prirodi kao rezultat udvajanja hromozoma u nucelarnom tkivu i kao takvi se javljaju samo u semenima poliembrionih kultivara citrusa (Aleza *et al.* 2011). Jedina genetička razlika između ovih tetraploida i njihovih sestrinskih nucelarnih apomiktičnih diploida (sa kojima se pronalaze u isto vreme u semenu) jeste njihov udvojeni broj hromozoma zbog čega se i

zovu autotetraploidi (Cameron & Frost 1968). Oni naravno u slučaju seksualnog ukrštanja (za razliku od zigotskih diploidnih embriona) ne pokazuju osobine polenskog roditelja što je i dokazano u izoenzimskim studijama kod *C. volkameriana* (Ollitrault & Jacquemond 1994).

Kao i u slučaju pojave spontanih triploida i ovde postoji genetička kontrola formiranja embriona ali isto tako i veliki uticaj sredinskih faktora (npr. izlaganje niskim temperaturama dovodi do indukcije spontane tetraploidizacije) (Cameron & Frost 1968; Hutchison & Barrett 1981). Što se tiče genetičke kontrole, Cameron & Frost (1968) su pronašli da je 2.5% od 3600 nucelarnih biljaka kod raznih kultivara citrusa bilo autotetraploidno dok su Hutchison & Barrett (1981) utvrdili da je frekvencija njihovog spontanog javljanja kod podloge 'Troyer' citrandž (hibrid slatke i trolisne pomorandže) iznosila 3% a kod 'Carrizo' 2.5%. Za razliku od spontanih autotetraploida, indukovani (nespontani) autotetraploidi nastaju u eksperimentima sa kolhicinom te ovom metodom mogu da se dobiju tetraploidi i kod poli- i kod monoembriogenh kultivara citrusa.

Što se tiče gametske vijabilnosti autotetraploida, ona je znatno smanjena jer postoji problem hromozomskog sparivanja (stvaraju se multivalentne hromozomske asocijacije) u toku mejoze (metafaze I). Posledica toga je degeneracija polenske majke ćelije tj. proizvodnja malog broja polenovih zrna sa normalnim hromozomskim komplementom (Ollitrault *et al.* 2008).

Za razliku od autotetraploida, gametska vijabilnosti alotetraploida je normalna jer se u toku mejoze hromozomi lepo sparuju u bivalentne hromozomske asocijacije što vodi stvaranju ekvilibrisanih dizomskih segregacija. Alotetraploidi inače nastaju u procesu fuzije ($2x + 2x$) ali i kao nusproizvod seksualne hibridizacije ($2x \times 4x$) pri čemu su u ovom drugom slučaju oni rezultat spajanja neredukovanih ($2n$) ženskih gameta sa diploidnim polenom (Aleza *et al.* 2010b).

Zajedničko za sve tetraploide je da sporije rastu, sporije cvetaju i da su manje plodonosni. Takođe, tetraploidi najčešće daju plodove koji nisu primamljivi za potrošače zbog svoje debele kore i jake opne na unutrašnjim segmentima. Manji su po veličini i generalno imaju povišenu kiselost (Grosser *et al.* 1998). Obzirom da zbog nabrojanog nemaju važnost za masovnu proizvodnju, najčešće se koriste kao $4x$ roditelji u ukrštanju sa $2x$ roditeljima u cilju dobijanja bezsemenih triploida (Grosser & Gmitter 2011). Pored sporijeg rasta, spontani tetraploidi imaju i drugačije morfološke

karakteristike listova (širi su, deblji, tamnije boje i sa krupnijim stomama) i korenova (kraći su, deblji i imaju manje lateralnih korenova) u odnosu na diploide pa ih je uz pomoć ovih karakteristika i lakše selekcionisati kad se nalaze u populaciji sa drugim nucelarnim biljčicama (Khan *et al.* 1992).

1.8. Promena nivoa ploidnosti u cilju stvaranja triploidnih bezsemenih kultivara

Većina kultivara citrusa gajenih u današnje vreme, nisu nastali kao rezultat klasičnog programa za oplemenjivanje već slučajno u procesu odabira zdravih klijanaca i/ili zahvaljujući pojavi prirodnih mutacija pupoljaka (Grosser & Gmitter 1990). Ograničena uloga klasičnog programa u pogledu razvoja novih kultivara je posledica njegove zasnovanosti na seksualnoj hibridizaciji isključivo filogenetski srodnih kultivara/vrsta zbog nemogućnosti da se prevaziđu problemi vezani za reproduktivnu biologiju: seksualna nekompatibilnost, heterozigotnost i inbriding depresija, sterilitet polena/jajne ćelije i nucelarna poliembrionija (apomikisija). Na listu problema treba staviti i dugačku juvenilnu fazu citrusa jer u mnogome vremenski usporava proces oplemenjivanja.

Krajem XX veka su razvijene nove biotehnološke metode za manipulaciju ploidnosti biljaka jer se pokazalo da je uspostavljanje poliploidnosti neophodna etapa u mnogim protokolima za oplemenjivanje citrusa. Tako je u delu programa za oplemenjivanje citrusa koji se bavi stvaranjem triploidnih bezsemenih kultivara došlo do razvijanja nekoliko strategija. Neke od njih su bile usmerene na iskorišćavanje prirodnih pojava kao što su npr. spontana poliploidnost (stvaranje neredukovanih-2n gameta kao posledica restitucije nukleusa tokom mejoze megaspore i/ili duplikacija hromozoma bez ćelijske deobe u nucelarnom tkivu) dok su se druge bavile haplometodama (androgeneza i indukovana ginogeneza) a treće somatskom hibridizacijom praćenom sa interploidnom seksualnom hibridizacijom (Ollitrault *et al.* 2008).

1.8.1. Selekcija spontanih triploida u $2x \times 2x$ seksualnom ukrštanju

Selekcija triploidnih hibrida nastalih iz neredukovane 2n megagametofite je prvi put opisano u ranim 70-tim godinama (Esen & Soost 1973b; Geraci *et al.* 1975). Kasnije su ovakvi hibridi dobijeni iz malih semena kod monoembriogenih kultivara koji su imali visoku stopu stvaranja 2n megagametofita kao što su npr. 'Temple' 'Wiling' i

‘Fortune’ mandarine (Esen & Soost 1977; Soost 1987). U to vreme je ova metoda bila jako neefikasna jer se ploidnost utvrđivala klasičnim citogenetskim brojanjem hromozoma. Međutim, pronalaženjem novih tehnika: *in vitro* ”spasavanja” embriona i testiranja ploidnosti uz pomoć ‘flow’ citometrije (Ollitrault & Michaux-Ferriere 1992) metoda selekcije triploidnih hibrida iz $2x \times 2x$ seksualnog ukrštanja je postala mnogo efikasnija pa je bilo moguće primeniti je i kod kultivara sa izuzetno niskom stopom stvaranja neredukovnih $2n$ megagametofita kakva je npr. ‘Clementine’ mandarina (1%) (Aleza *et al.* 2010a). U malim semenima poliembrigenih kultivara je takođe pronađeno postojanje triploidnih zigotskih hibrida ali su oni bili vrlo limitirani poliembrionijom. Ni sama primena tehnike *in vitro* “spašavanja” embriona nije pomogla da ova metoda zauzme bilo kakvo značajno mesto u oplemenjivanju poliembrigenih kultivara (Ollitrault *et al.* 2008).

Citogenetičke studije ranih 80-tih godina su pokazale da su triploidni embrioni u semenima nastali iz ukrštanja dva diploida ($2x \times 2x$) okruženi pentaploidnim endospermom (Esen *et al.* 1979). Iz ovih studija je upravo i proistekla hipoteza koja objašnjava normalni razvitak semena i vijabilnost embriona dobrim odnosom ploidnosti embriona i endosperma od 3:5. Semena iz $2x \times 2x$ ukrštanja koja nose triploide u sebi iako mala po veličini (u odnosu na semena koja nose diploide) mogu spontano da klijaju u zemlji i da daju biljčice bez primene *in vitro* metode “spašavanja”. Ipak i u slučaju spontanog stvaranja triploidnih embriona iz $2x \times 2x$ ukrštanja preporučljivo je korišćenje ove metode jer se time pospešuje efikasnost klijanja (Aleza *et al.* 2010a).

Postoji i druga tzv. “Endosperm Balance Number” (EBN) hipoteza kojom se tumači (ab)normalan razvitak semena u intra- i interspecijskom ukrštanju. EBN-hipoteza je bazirana na pretpostavci da svaka vrsta ima genom-specifičnu ”efikasnu” ploidnost u endospermu i da je za njegov normalan razvitak potrebno da ima odnos maternalnih-paternalnih gena 2:1 (ovaj odnos nije u korelaciji sa stvarnom hromozomskom ploidnošću endosperma koja po ovoj hipotezi nema uticaja na uspešnost interploidnog ukrštanja). Tako je u seksualnom ukrštanju dva diploida ($2x \times 2x$) po EBN-hipotezi, odnos maternalnih-paternalnih gena u endospermu 2:1 pa dolazi do normalnog razvitka endosperma a samim tim i embriona. Da je taj odnos drugačiji ne bi bilo moguće razvijanje endosperma i dolazilo bi do abortiranja embriona (Johnson *et al.* 1980).

1.8.2. Stvaranje haploida u cilju fuzionisanja sa diploidnim protoplastima

Haploidne biljke citrusa je moguće dobiti pomoću androgeneze (kulture antera) ili indukovane ginogeneze. Prva kultura antera kod citrusa je bila uspostavljena još 1975 (Drira & Benbadis) kod limuna ali se uspelo samo sa dobijanjem haploidnog kalusa. Kasnije su dobijene haploidne biljke kod *Poncirus* (Hidaka *et al.* 1979), *C. microcarpa* (Chen *et al.* 1980), ‘Trovita’ slatke pomorandže (Hidaka & Kajiura 1989), ‘Clementine’ mandarine (Germanà *et al.* 1994), limuna (Germanà *et al.* 1991) i ‘Mapo’ tangela (Germana & Reforgiato 1997). Oiyama i Kobayashi (1993) su dobili 2% haploidnih biljaka iz semena poteklih iz ukrštanja monoembriogenih diploida (‘Clementine’ i ‘Lee’ mandarine) sa 3x polenom. Sličnu indukciju ginogeneze su postigli Toolapong *et al.* (1996) koji su dobili haploidne biljke iz $2x \times 2x$ ukrštanja gde je monoembriogeni ‘Banpeiyu’ pamelio bio oprašen sa polenom od ‘RubyRed’ grejpfruta. Indukovana ginogeneza uz pomoć ozračenog polena se pokazala vrlo efikasnom kod mnogih monoembriogenih vrsta: ‘Clementine’ mandarine, bezsemenih kultivara *C. maxima* (Ollitrault *et al.* 1996) kao i kod mnogih drugih *C. reticulata* tangor kultivara (Froelicher *et al.* 2007).

Generalna odlika haploidnih biljaka je da su vrlo slabe i da moraju da budu kalemljene na neku podlogu da bi mogle da rastu. One biljke koje uspeju da cvetaju daju slabo fertilna polenova semena sa redukovanim brojem hromozoma ($n=9$) koja mogu da se ukrste sa 2x kultivarima i daju 2x potomstvo (Ollitrault *et al.* 2008). Haploidne biljke mogu da se koriste kao značajan izvor 1x protoplasta iz listova koji potom mogu da se fuzionišu sa 2x protoplastima poreklom iz nucelnog kalusa (ovde su 2x protoplasti uvek poreklom iz poliembriogenih kultivara). U ovom slučaju je proizvod fuzije uvek 3x. Nasuprot tome, ukoliko se u fuziji koriste protoplasti iz 1x kalusa da bi se fuzionisali sa 2x protoplastima poreklom iz nucelnog kalusa onda je moguće da se pored 3x hibrida kao proizvodi fuzije sreću 4x i 5x hibridi. Razlog ovome je ploidna nestabilnost haploidnog kalusa (Ollitrault *et al.* 2000). Primenjivost ove metode u procesu oplemenjivanja citrusa je zapravo mala jer postoji samo nekoliko haploidnih linija citrusa u svetu.

1.8.3. Somatska hibridizacija i interploidna seksualna hibridizacija kao metode u procesu oplemenjivanja citrusa

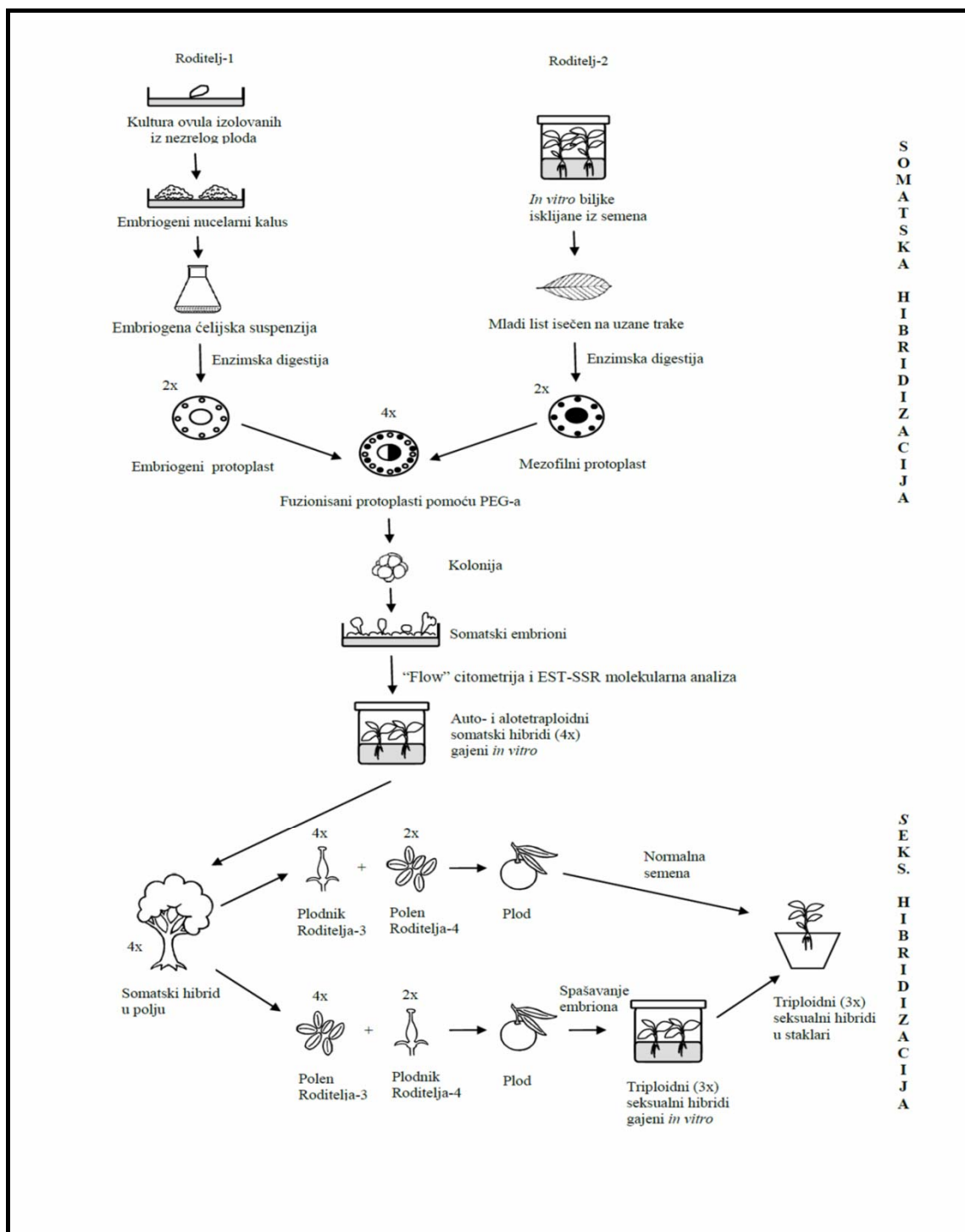
Na **Slici 2** je predstavljen šematski prikaz svih postupaka somatske i interploidne seksualne hibridizacije koje se koriste u oplemenjivanju i dobijanju novih kultivara roda *Citrus*. Somatska hibridizacija je jedna od najvažnijih metoda za manipulaciju ploidnosti kojom se u *in vitro* uslovima fuzionišu dve somatske ćelije i kao rezultat dobijaju hibridne biljke sa novim auto(alo)tetraploidnim genetskim sastavom ($2n=4x=36$) (Grosser & Gmitter 1990). Somatskom hibridizacijom se potpomaže i ubrzava klasični program za oplemenjivanje tj. prevazilaze se problemi vezani za reproduktivnu biologiju obzirom da je ovom metodom moguće fuzionisati protoplaste poreklom i iz dva nesrodna kultivara i to na mnogim različitim nivoima: interspecijskom, intergenskom i/ili interfamilijarnom. Kao krajnji proizvodi fuzije se dobijaju heterokaroni koji se umnožavaju *in vitro* i formiraju somatske embrione i dalje regenerišu u tetraploidne hibridne biljke. Na ovaj način je klasični program za oplemenjivanje citrusa ponovo zaživeo tek pre 30-tak godina sa otkrićem da somatska hibridizacija (inače prvi put urađena na ćelijama duvana; Carlson *et al.* 1972) može značajno da doprinosi oplemenjivanju različitih kultivara i vrsta citrusa putem zaobilazjenja spomenutih problema reproduktivne biologije citrusa (Ohgawara *et al.* 1985).

Pored prevazilaženja problema vezanih za reproduktivnu biologiju citrusa, somatska hibridizacija daje mogućnost da se u kratkom vremenskom roku proizvede veliki broj biljaka što može da omogući njihovu ranu selekciju i testiranje i time znatno smanji vremenski period za dobijanje novih kultivara. Ovo je jako važno u slučaju citrusa kome je potrebno dugo vremena za razvoj u juvenilnom periodu.

Prvi primer uspešne somatske hibridizacije kod citrusa je zabeležen 1985. godine kad su Ohgawara & Kobayashi proizveli intergenetski alotetraploidni hibrid koristeći protoplaste iz embriogenog kalusa 'Trovita' slatke pomorandže (*C. sinensis*) i protoplaste iz lista srodne trolisne pomorandže (*Poncirus trifoliata*). Tri godine kasnije, Grosser *et al.* (1988a) su proizvodnjom somatskog hibrida između dve intergenetske seksualno nekompatibilne vrste *C. sinensis* ('Hamlin' slatka pomorandža) i *Severinia disticha* pokazali važnost ove metode u programu oplemenjivanja. Naime, ovde je došla

do izražaja prva aplikacija somatske hibridizacije u procesu oplemenjivanja citrusa – mogućnost prenosa gena (tj. važnih agronomskih karakteristika) iz divljih, seksualno nekompatibilnih srodnika citrusa u gajene kultivare i time obogaćivanje njihovog genetičkog pula. Do tada je bilo nezamislivo da se to postigne klasičnim metodama. Potom su usledili i mnogi drugi autori sa svojim izveštajima o uspešnoj somatskoj hibridizaciji na interspecijskom i intergenomskom nivou bilo da se radilo o seksualno kompatibilnim ili nekompatibilnim kultivarima (Kobayashi *et al.* 1988; Kobayashi *et al.* 1997; Saito *et al.* 1991; Ohgawara *et al.* 1989; Grosser *et al.* 1988b; Grosser & Gmitter 1990; Grosser *et al.* 1996a; Grosser *et al.* 2000). Ove somatske hibridizacije su imale nekoliko zajedničkih karakteristika. U gotovo svim proizvodima fuzije, jedan od dva roditelja je bio poreklom iz embriogene suspenzije/kalusa, dok je drugi bio poreklom iz ne-embriogenog izvora, najčešće lista. Za sam proces fuzionisanja protoplasta korišćen je polietilen glikol (PEG) tj. fuzija je bila hemijske prirode a broj hromozoma je uvek bio očekivan $2n=4x=36$ jer se radilo o tzv. simetričnoj fuziji. Simetrični hibridi, dakle, sadrže kompletni nuklearni genom oba roditelja.

S druge strane, postoje radovi o asimetričnoj (donor-recipient) fuziji gde se sjedinjuje nuklearni genom jednog roditelja sa mitohondrijalnim i/ili hloroplastnim genomom drugog roditelja i dobijaju se citoplazmatski hibridi tzv. cibridi (Grosser *et al.* 2010b). U prvim experimentima tog tipa se kod donornog protoplasta zaustavila nuklearna deoba pomoću x- ili γ -zračenja dok je kod recipientnog protoplasta inhibirana metabolička aktivnost uz pomoć jod-acetata i dobijeni su prvi cibridi: ['Poorman' grejpfrut $\times$ *P. trifoliata* (donor) sa 'Villafranca' limunom (recipient)], ['Poorman' grejpfrut $\times$ *P. trifoliata* (donor) sa kiselom narandžom (recipient)] i [kisela pomorandža (donor) sa 'Villafranca' limunom (recipient)] (Vardi *et al.* 1987). Nakon toga su usledili i mnogi drugi autori sa svojim izveštajima o uspešnoj somatskoj cibridizaciji uz pomoć zračenja/jodoacetata (Vardi & Galun 1989). S druge strane, Saito *et al.* (1993) su primetili da cibridizacija može da se desi i spontano kao nus-produkt simetrične hibridizacije. Grosser *et al.* su (1996b) pokušali da objasne uslove pod kojima nastaju cibridi (slični mezofilnom neembriogenom tj. netotipotentnom roditelju) u toku procesa somatske fuzije. Jedno od objašnjenja je da cibridne ćelije potiču od uspešne fuzije protoplasta nakon koje se desila neuspešna nuklearna fuzija i gubitak jedra embriogenog roditelja. Po drugom objašnjenju je došlo do nepotpune fuzije gde je došlo do pucanja



Slika 2. Šematski prikaz metoda somatske i seksualne hibridizacije u programu oplemenjivanja mandarina (*Citrus reticulata* Blanco) sa ciljem promene nivoa njihove ploidnosti i dobijanja novih bezsemenih kultivara.

protoplasta od embriogenog roditelja u toku fuzije i tako je samo delimično preneo se citoplazmatski sadržaj ne uključujući jedro u proizvod fuzije.

Prema Smith -u (1989), jako je važno proučavati prenos citoplazmatskih osobina iz jednog genotipa u nuklearnu pozadinu drugog genotipa u toku somatske hibridizacije, specijalno u slučajevima gde je nemoguća seksualna hibridizacija između dva genotipa. Smatra se da se u toku fuzije hloroplasti najčešće nasleđuju od jednog dok se mtDNA nasleđuje od oba roditelja (Landgren & Glimelius 1994; Earle 1995). Po istim autorima bi direktan prenos mitohondrijalno kodirane osobine kao što je citoplazmatska muška sterilnost (CMS) ili prenos hloroplasno kodirane osobine kao što je herbicidna tolerantnost iz jednog genotipa u drugi predstavljao primer praktične primene somatske fuzije u procesu oplemenjivanja kultivara citrusa. Yamamoto & Kobayashi (1995) su objavili proizvodnju cibrida koji je imao nuklearni genom *C. sinensis* i citoplazmatski genom *C. unshiu*. Ovaj cibrid je imao mušku sterilnost nasleđenu od *C. unshiu* što je veoma poželjna osobina u procesu dobijanja bezsemenih plodova mandarina.

Za poslednje tri decenije, preko 500 intergenetskih i interspecijskih somatskih hibrida citrusa je stvoreno u svetu (Grosser & Gmitter 2011). Od toga je najviše (~300) proizvedeno u istraživačkom centru Citrus Research and Educational Center (CREC) u Lake Alfred-u na Floridi koji ima 100-godišnju tradiciju u gajenju/oplemenjivanju citrusa a pripada University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences. Razlog ovako velike uspešnosti razvijanja tehnologije somatske hibridizacije kod citrusa leži u tome što je ona tokom vremena postala značajan sastavni deo programa za oplemenjivanje citrusa. Poređenja radi, kod drugih važnih biljnih vrsta iz ljudske ishrane (pirinča, uljane repice, paradajza i krompira) somatsku hibridizaciju su iz programa za oplemenjivanje potisnule metode molekularne biologije, ponajviše genetička transformacija (Johnson & Veilleux 2001; Orczyk *et al.* 2003).

Tetraploidni somatski hibridi, nastali u procesu fuzije, mogu i sami da imaju plodove dobrog kvaliteta i/ili da imaju druge dobre karakteristike vezane za sredinske faktore i otpornost na parazite i da kao takvi budu proizvedeni u nove kultivare. Ovo je moguće jer je fuzija aditivan proces bez segregacije, pa dobre osobine oba roditelja, kontrolisane od strane dominantnih i ko-dominantnih gena, mogu istovremeno da se ispolje u tetraploidnom potomstvu. Tako su npr. dominantne i ko-dominantno kontrolisane osobine: otpornost na niske temperature, mono/poliembrionija, otpornost

na patogene (“foot rot” gljiva *Phytophthora parasitica*, “citrus blight”, tristeza virus, nematoda *Tylenchulus semipenetrans* i dr.) (Hutchinson 1985). Stvaranje tetraploidnih somatskih hibrida sa potencijalom novih kultivara je moguća ali retka pojava, specijalno u programima unapređenja mandarina i kiselih pomorandži (Guo *et al.* 2004a). Ipak je najveća praktična vrednost somatske hibridizacije u mogućnosti korišćenja tetraploidnih somatskih hibrida kao visokokvalitetnih roditelja u interploidnom seksualnom ukrštanju sa krajnjim ciljem dobijanja triploidnih hibrida. Ovo je naročito korisno u programima oplemenjivanja plemki obzirom da je triploidnost uvek vezana za bezsemenost a današnje tržište svežeg voća sve više teži ka isključivanju semenih kultivara iz ponude potrošačima bez obzira na ostale dobre karakteristike njihovog ploda. Inače, pored interploidnog seksualnog ukrštanja između diploidnog i tetraploidnog roditelja u oba pravca ($2x \times 4x$; $4x \times 2x$), bezsemene triploidne hibride je, kao što je spomenuto u **Poglavlju 1.7.** moguće dobiti u retkim slučajevima i kao rezultat seksualnog ukrštanja dva diploida ($2x \times 2x$) ukoliko majka biljka ima prirodnu tendenciju stvaranja neredukovanih $2n$ megagametofita (Luro *et al.* 2004). Postoje i drugi ne mnogo uspešni pokušaji dobijanja triploidnih biljaka iz *in vitro* gajenog kalusa poreklom iz endosperma (Gmitter *et al.* 1990) odnosno putem izazivanja mutacija upotrebom gama zračenja (Hearn 1984).

Do sada se pokazalo da je ($4x \times 2x$) tip interploidnog seksualnog ukrštanja uspešniji od recipročnog ($2x \times 4x$) u smislu stope oporavka tj. samostalnog klijanja triploidnih zigotskih embriona iz semena. Semena dobijena u ($4x \times 2x$) ukrštanju su generalno manja ali u njima ne dolazi do degeneracije endosperma kao u slučaju recipročnog ($2x \times 4x$) ukrštanja pa je moguće da embrioni iz njih nesmetano kličaju. Naravno, kao i u klasičnom ukrštanju, najidealnije je kad je majka biljka monoembriogena zato što u tom slučaju u semenima novonastalog ploda nema nucelarnih embriona već su svi zigotski triploidni embrioni (u slučaju kad je $4x$ majka biljka poliembriogena onda u semenima ima malo ili ni malo triploidnog zigotskog potomstva a sve ostalo su nucelarni embrioni koji su genetička kopija majke). Na žalost, broj visokokvalitetnih monoembriogenih tetraploidnih majčinskih biljaka proisteklih iz fuzije protoplasta je izuzetno mali jer ih je jako teško proizvesti (Grosser & Gmitter 2011). Poređenja radi, čak je i broj visokokvalitetnih monoembriogenih diploidnih majčinskih biljaka koje se koriste u klasičnom ukrštanju izuzetno ograničen i to su npr.:

‘Clementine’ selekcije, ‘Fallglo’, ‘Fortune’ i ‘Temple’ i odnedavno ‘Sugar Belle’ (LB8-9). Razlog tome je što su u celom rodu *Citrus* samo nekoliko kultivara mandarina, pamelu i citron monoembriogeni a u svim ostalim vrstama dominira poliembrionija.

U recipročnom ($2x \times 4x$) ukrštanju, dobijena semena su smežurana / nedovoljno razvijena i ukoliko nisu prazna onda sadrže abortirani zakržljali $3x$ (ili ponekad $4x$ embrion) a endosperma gotovo i da nema (on degeneriše 7-10 nedelja nakon oplodjenja). Stopa abortiranja embriona se uglavnom kreće od 92-99% (Esen & Soost 1973a) a stopa njihovog oporavka jo gotovo ravna nuli i zato se moraju spašavati *in vitro* metodom 12-15 nedelja nakon polinacije (Viloria *et al.* 2005). Uzrok ove smanjene vijabilnosti embriona kao posledice nerazvijenosti endosperma (Esen & Soost 1977), po prethodno spomenutoj hipotezi koja se bavi odnosom ploidnosti embriona i endosperma, leži u $3:4$ odnosu ploidnosti embriona i endosperma (Soost & Roose 1996). S druge strane, normalni razvitak semena i dobra vijabilnost embriona u ($4x \times 2x$) tipu interploidnog ukrštanja se objašnjava dobrim odnosom ploidnosti embriona i endosperma od $3:5$. Po drugoj EBN-hipotezi, u interploidnom ($4x \times 2x$) ukrštanju je odnos materlnih-paterlnih gena u endospermu $4:1$ pa konsekvntno dolazi do normalnog razvitka endosperma a samim tim i embriona (seme je normalnog izgleda samo malo manje u odnosu na nehibridno seme) dok je u recipročnom ($2x \times 4x$) ukrštanju taj odnos $1:1$. Odnos maternalnih-paternalnih gena od $1:1$ ne dozvoljava razvijanje endosperma što rezultira abortiranjem embriona (Johnson *et al.* 1980).

1.8.4. Primena somatske i interploidne seksualne hibridizacije u procesu oplemenjivanja plemki citrusa

Istraživanja širom sveta se pokazala da je unapređivanje plemki citrusa na triploidnom nivou uz pomoć interploidnog ukrštanja ($2x \times 4x$; $4x \times 2x$) ekonomski i vremenski najisplativije u pogledu dobijanja bezsemenih biljaka. Osnova ove bezsemenosti je postojanje neparnog broja hromozomskih garnitura čime se narušava normalna mejoza i nastaju hromozomski nebalansirane gameti. Tako je npr. u istraživačkom centru citrusa - CREC (Lake Alfred, Florida) u zadnje tri decenije proizvedeno više od 12000 triploidnih hibrida od čega je nekoliko hiljada začeto u ($2x \times 4x$) ukrštanju gde je polen bio poreklom od somatskih hibrida nastalih fuzijom protoplasta (Grosser & Gmitter 2005; Viloria & Grosser 2005; Grosser *et al.* 2000, 2006). Većina triploidnih hibrida je

zasađena na oglednim poljima ovog centra i trenutno nekolicina njih izlazi iz dugog juvenilnog perioda (5-7 god) i počinje da rađa bezsemene plodove. Analiza fizičkih i hemijskih svojstava ovih plodova će biti urađena u nekoliko narednih godina čime će se utvrditi njihov kvalitet i mogući plasman na tržištu. Detaljna lista korišćenih polinatora tj. visoko kvalitetnih tetraploidnih hibridnih roditelja dostupnih za interploidno ukrštanje prikazana je u revijskim radovima Grosser *et al.* (2000) i Grosser & Gmitter (2011). Uočljivo je da su tetraploidni hibridni roditelji pretežno poliembriogeni, a samo nekolicina je monoembriogena a razlog tome je što je proizvodnja monoembriogenih biljaka teška. Naime, u fuziji je potrebno koristiti embriogeni kalus koji daje totipotentnost i spaja se sa neembriogenim protoplastima lista a do današnjeg dana se nije uspelo sa proizvodnjom kalusa iz monoembriogenih vrsta/kultivara. Zato je najnoviji način dobijanja monoembriogenih somatskih hibrida da se u fuziji kombinuje nucelarni kalus poliembriogenog kalusa sa listom monoembriogenog kultivara i da se očekuje da neki od hibrida ipak nasledi monoembriogenost od oca. Za sada su u CREC kolekciji, monoembriogena samo tri hibrida ['Succari' slatka pomorandža + 'Hirado Buntan Pink' zigotski pamelio] ['Nova' tangelo + 'Hirado Buntan Pink' zigotski pamelio] i ['Murcott' tangor + 'Hirado Buntan Pink' zigotski pamelio] (Grosser & Gmitter 2011) i oni se trenutno koriste kao monoembriogene majke biljke u interploidnom seksualnom ukrštanju.

Kod mandarina, pored bezsemenosti kao primarnog cilja oplemenjivanja postoje i drugi ciljevi kao npr: lako ljuštenje, dobra (tamno-pomorandžasta) boja kore i srži, dobar ukus, produženje sezone rađanja plodova (stvaranje kultivara koji rano tj. kasno sazrevaju u sezoni), dobijanje otpornosti na bolesti/štetočine i povećanje postojanosti u toku transportovanja tj. stajanja na policama prodavnica. U programu oplemenjivanja mandarina su do sada u interploidnom ukrštanju pretežno korišćeni visoko kvalitetni tetraploidni hibridni roditelji nastali fuzijom mandarine i pomorandže. Razlog postojanja izuzetno malog broja čisto mandarinskih tetraploidnih hibrida leži u lakoći indukovanja embriogenog nucelnog kalusa iz ovula slatkih pomorandži (u odnosu na mandarine) i njegovim lakim fuzionisanjem sa protoplastima iz lista mandarine. Na žalost, pokazalo se da veliki procenat triploida zasađenih u polju a proizašlih iz interploidnog ukrštanja u kome su korišćeni (pomorandža + mandarina) somatski hibridi rađaju plodove koji se teško ljušte. U cilju stvaranja novih tetraploidnih

somatskih hibrida sa čistijim mandarinskim poreklom koji bi potencijalno mogli da u interploidnom ukrštanju daju triploidno potomstvo sa lako-ljuštećim plodovima nedavno su proizvedena 9 alo- i 5 auto-tetraploidna somatska hibrida (Grosser *et al.* 2010a). Ovi hibridi su nastali u fuzijama koje su obuhvatale diploidne roditelje iz grupe mandarina koji su pored svojstva lakog ljuštenja imali i vrhunski kvalitet ploda. Treba napomenuti i rad iz 2004b (Guo *et al.*) gde je sa istim ciljem (korišćenja tetraploidnih somatskih hibrida kao visokokvalitetnih roditelja u interploidnom ukrštanju) proizvedeno sedam novih somatskih hibrida od kojih neki već daju plodove koji su i sami izuzetnog kvaliteta. Da somatski hibridi daju plodove koji su i sami izuzetnog kvaliteta bila je retka pojava a najčešće se dešava upravo u programima za oplemenjivanje mandarina i kiselih pomorandži.

U grupi kiselih citrusa (lajm/limun), pored bezsemenosti kao primarnog cilja oplemenjivanja postoje i drugi ciljevi kao npr: visok nivo kiselosti, dobijanje otpornosti na niske temperature, dobijanje otpornosti na bolesti ("mall secco" gljivu [*Phoma tracheiphila*], citrus "canker" [*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*], CTV- citrus tristeza virus i "witches' broom" [*Phytoplasma aurantifolia*]) i povećanje količine/kvaliteta esencijalnih ulja u kori. Tako je u oplemenjivanju lajma već pokazano da prirodna rezistentnost na citrus "canker" poreklom iz kumkuata može da se prenese na triploidno potomstvo ukoliko se u interploidnom ukrštanju kao majka biljka koristi 'Lakeland' lajmkuat (diploidni intergenerički hibrid 'Mexican' lajm (*C.aurantifolia*) × kumkuat (*Fortunella japonica*) (Viloria *et al.* 2004). Takođe, Viloria & Grosser (2005) su u cilju dobijanja bezsemenih kiselih citrusa sa povećanom otpornošću na niske temperature i bolesti, u periodu od 2000-2002 god proizveli oko 650 triploidnih hibrida začelih u (2x × 4x) ukrštanju gde su majke biljke ('Key' lajm, 'Lakeland' lajmkuat, palestinski slatki lajm, 'Etrog' citron, 'Lisbon' i 'Todo el Ano' limun) bile oprašene sa polenom poreklom od dva alotetraploidna somatska hibrida ('Key' lajm × 'Valencia' slatka pomorandža i 'Milam' limun × 'Femminello' limun) kao i dva autotetraploida ('Giant Key' lajm i 4x 'Femminello' limun). Većina proizvedenih triploidnih hibrida iz ovih eksprimenata su zasađeni na oglednim poljima i u fazi su kada počinju da rađaju bezsemene plodove i u nekoliko narednih godina će se pokazati kakva im je otpornost na hladnoćunske temperature i bolesti. Očekuje se da ove nove genetske kombinacije budu od velikog značaja za oplemenjivanje lajma i limuna.

Kod grejpfruta/pamela pored bezsemenosti kao primarnog cilja oplemenjivanja postoje i drugi ciljevi kao npr: dobra boja kore i srži, dobar ukus, produženje sezone rađanja plodova (stvaranje kultivara koji rano tj. kasno sazrevaju u sezoni), otpornost na bolesti (specijalno tzv. citrus “canker“) i smanjivanje količine furanokumarina u plodu (sek. metaboliti koji pojačavaju dejstva nekih lekova i stoga ne smeju da se konzumiraju u isto vreme). Još su krajem pedesetih godina Cameron & Soost na Kalifornijskom univerzitetu (Riverside, SAD) klasičnim interploidnim ukrštanjem diploidnog slatkog pamela i tetraploidnog višesemenog belog ‘Marsh’ grejpfruta dobili bezsemene triploidne hibride od kojih su dva ispoljila superiorne karakteristike oba roditelja - morfološke karakteristike grejpfruta ali s druge strane dobar slatki ukus ploda nasleđen od slatkog pamela. Triploidni bezsemeni hibridi su nazvani ‘Oroblanco’ (Soost & Cameron 1980) i ‘Melogold’ (Soost & Cameron 1985) a tek nakon 20-25 godina od svog nastanka su pušteni u komercijalno gajenje. U novijim eksperimentima oplemenjivanja grejpfruta se radilo na promeni koncentracije furanokumarina u plodu grejpfruta. Tako je pokazano da u interploidnom ukrštanju može da se dobije triploidno potomstvo sa svim karakteristikama grejpfruta ali sa malo ili ni malo furanokumarina u plodu ukoliko se diploidni grejpfrut oprašuje sa ‘Succari’ narandžom + ‘Hirado Buntan’ pamelo somatskim hibridom. Drugi slučaj je ako se diploidni ‘Low Acid’ pamelo oprašuje sa tetraploidnim ‘Walters’ grejpfrutom i/ili tetraploidnim ‘Succari’ narandžom + ‘Hirado Buntan’ pamelo somatskim hibridom (Chen *et al.* 2011).

1.8.5. Primena somatske i interploidne seksualne hibridizacije u procesu oplemenjivanja podloga citrusa

Primarni ciljevi oplemenjivanja podloga citrusa su: povećanje produktivnosti plemki koje su naklemljene na njih, proširivanje adaptabilnosti na različite vrste zemljišta, dobijanje otpornosti na bolesti/štetočine (npr citrus “blight“ [nepoznat uzročnik], citrus tristeza virus, *Diaprepes* “root weevil“, gljivu koja napada koren [*Phytophthora nicotianae*]) i postizanje kontrole visine drveta (Grosser & Gmitter 2011).

Kada se u poslednjoj deceniji XX veka u istraživačkom centru citrusa - CREC (Lake Alfred, Florida) počinjalo sa proizvodnjom alotetraploidnih somatskih hibrida podloge, birani su visoko-kvalitetni diploidni roditelji iz celokupne grupe citrusa koji su međusobno fuzionisani. Na taj način je u kratkom roku stvoreno oko 100 različitih

kombinacija tih genotipova. Mnogi od njih su odmah bili zasađeni u oglednim poljima i testirani na različite bolesti i tipove zemljišta, specijalno onih koja dominiraju na Floridi (peskovita zemlja bogata kalcifikovanim materijama i sa visokim pH). Pokazalo se da većina tetraploidnih somatskih hibrida podloge poseduje kontrolu visine drveta (u odnosu na komercijalne podloge koji su već decenijama u upotrebi) tj. da je plemka koja je nakalemljena na tu podlogu manja rastom. Želja svakog uzgajivača citrusa je da ima nisko drveće jer se time smanjuju troškovi branja i uvećava efikasnost mera zaštite od niskih temperatura a takođe povećava efikasnost mera zaštite od bolesti kao što su citrus “canker“ i HLB (tzv. “greening” koga izaziva Huanglongbing bakterija) (Grosser & Gmitter 2011). Zbog potražnje za niskim drvećem, u CREC-u se odmah krenulo sa analizom dobijenih alotetraploidnih somatskih hibrida podloge u oglednim poljima sa ciljem njihovog uvođenja u masovnu proizvodnju. Da bi se potencijalni kandidat uveo u masovnu proizvodnju mora da poseduje nekoliko osnovnih karakteristika: u plodu mora da ima puno semena (>30) a embrioni u tim semenima moraju da budu nucelarnog porekla (tj. da budu identični majci biljci). Ove dve karakteristike su od ključne važnosti za brzu propagaciju podloga (putem semena) u odgajivačnicama gde se kalemi citrus. Na žalost, nekoliko hibridnih podloga koje su pokazivale odlične osobine u polju u smislu visoke produktivnosti i kontrole visine drveta su imale druge važne karakteristike loše. Npr. svi somatski hibridi koji su u sebi imali Cleopatra mandarinu za roditelja su proizvodili neadekvatan broj semena za propagaciju dok je hibrid [‘Hamlin’ kisela pomorandža + ‘Flying Dragon’ patuljasta trolisna pomorandža] pokazao lošu adaptaciju na zemljište u izvesnim lokalitetima Floride. Takođe, hibrid [kisela pomorandža + ‘Rangpur’ lemandarin] koji je proizvodio plodove sa dovoljnim brojem semena i imao druge dobre karakteristike u polju je davao isključivo zigotske embrione u plodu.

Danas se mnogo pažljivije biraju roditelji koji se fuzionišu za potrebe proizvodnje hibridnih podloga. Tako u novijoj CREC kolekciji ima već nekoliko važnih somatskih hibrida koji prolaze kroz proces patentiranja i proglašavanja u nove kultivare jer istovremeno poseduju: izvrsnu produktivnost ploda, odličnu adaptaciju na peskovito zemljište (sa visokim pH) i adekvatni broj poliembriogenih semena za njihovu propagaciju u odgajivačnicama. To su npr: [‘Changsha’ mandarina + ‘50-7’], [‘Changsha’ mandarina + ‘Benton’ citrandž], [kisela pomorandža + ‘Carrizo’ citrandž],

[beli grejpfrut + '50-7'] pri čemu je '50-7' selekcija trolisne pomorandže *Poncirus trifoliata* sa boljom rezistentnošću na *Phytophthora nicotianae*.

Pored rezultata u unapređivanju podloga citrusa dobijenih iz ukrštanja na triploidnom nivou uz pomoć interploidnog ukrštanja ($2x \times 4x$; $4x \times 2x$) nedavno se pokazalo da od velikog značaja (specijalno za unapređenje otpornosti na bolesti/štetočine) može biti i na tetraploidnom nivou gde se koristi klasično poliploidno ($4x \times 4x$) ukrštanje selekcionisanih somatskih hibrida (Grosser *et al.* 2003). Rekombinacijom alela iz četiri različite diploidne podloge, na ovaj način se do maksimuma podstiče genetski diverzitet u zigotskom potomstvu. Novo potomstvo je opet tetrazigotno pa je za njega uveden novi termin 'tetrazyg' da bi se razlikovao od svojih roditelja – alotetraploidnih somatskih hibrida. Od 1999. godine do sada je u CREC-u proizvedeno oko 600 genetički različitih 'tetrazyg' biljaka koje se trenutno nalaze na evaluaciji otpornosti na razne bolesti koje napadaju podloge citrusa. U experimentima iz 2003. i 2007. godine, Grosser *et al.* su izabrali nekoliko kvalitetnih 'tetrazyg' biljke i nazvali ih: *Orange* [(('Nova' tangelo + 'Hirado Buntan Pink' zigotski pamel) $\times$ ('Cleopatra' mandarina + 'Argentine' trolisna pomorandža)], *White* [(('Nova' tangelo + 'Hirado Buntan Pink' zigotski pamel) $\times$ ('Succari' slatka pomorandža + 'Argentine' trolisna pomorandža)], *Green* [(('Nova' tangelo + 'Hirado Buntan Pink' zigotski pamel) $\times$ (kisela pomorandža + 'Carrizo' citrandž)], *Purple* [(('Nova' tangelo + 'Hirado Buntan Pink' zigotski pamel) $\times$ ('Cleopatra' mandarina + kisela narandza)] i *Blue* [(('Nova' tangelo + 'Hirado Buntan Pink' zigotski pamel) $\times$ ('Cleopatra' mandarina + 'Palestine' slatki lajm)]. Semena iz ovih ($4x \times 4x$) ukrštanja su isključavana direktno na peskovitoj zemlji bogatoj kalcifikovanim materijama i inficiranom sa sporama gljive koja napada koren citrusa [*Phytophthora nicotianae*] i jajima nematode *Diaprepes* "root weevil" a istovremeno je ova zemlja imala visoki pH.

2. CILJ RADA

Osnovni cilj ove doktorske disertacije je uspostavljanje i primena model-sistema za proizvodnju novih visoko-kvalitetnih (triploidnih), bezsemenih kultivara mandarina (**Slika 2**). Za realizaciju datog cilja planirano je ostvarenje nekoliko zadataka:

- Razvoj i optimizaciju efikasnih protokola somatske hibridizacije za dobijanje tetraploidnih hibrida sa većinskim mandarinskim poreklom. Dobijeni somatski hibridi bi se dalje koristili kao visoko-kvalitetni kultivari i/ili kao roditelji u daljim ukrštanjima koja mogu da dovedu do stvaranja novih triploidnih bezsemenih kultivara.
- Primena biotehnoloških metoda u cilju utvrđivanja prirode novonastalih somatskih hibrida: a) utvrđivanje nivoa ploidnosti metodom “flow” citometrije i b) molekularnom metodom EST-SSR, primenom molekularnih markera.
- Analiza morfoloških i komercijalnih osobina odabranih hibrida dobijenih somatskom hibridizacijom.
- Primena klasičnih metoda ukrštanja (seksualna hibridizacija) sa odabranim hibridima u cilju dobijanja novih triploidnih bezsemenih hibrida mandarina.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Somatska hibridizacija (fuzija protoplasta)

Svi eksperimenti somatske hibridizacije su izvedeni prema protokolu prikazanom na Slici 2. Primenjene su metode kulture tkiva *in vitro* i pre svega tehnika kulture protoplasta koji su bili izolovani iz dva izvora: 1. nucelnog kalusa dobijenog od jednog roditelja i 2. mezofila lista poreklom od drugog roditelja (**Slika 2**). U sledećem koraku protoplasti su međusobno fuzionisani u cilju proizvodnje somatskih hibrida i dalje potpune regeneracije biljaka koji predstavljaju visoko-kvalitetne tetraploidne roditelje neophodne za upotrebu u sledećoj fazi oplemenjivanja mandarina.

3.1.1. Uspostavljanje i gajenje embriogenih kultura (nucelnog kalusa i ćelijskih suspenzija)

Kao početni biljni materijal za eksperimente korišćeni su nezreli plodovi četiri kultivara: 'Ponkan' mandarina (**Slika 4.a**), 'Page' tangelo (**Slika 4.e**), 'Murcott' (**Slika 5.f**), i 'W. Murcott' tangora (**Slike 5.g,h**) starosti 3-5 meseci (od polinacije) koji su bili ubrani sa drveća gajenih na dve lokacije u centralnoj Floridi. Prva lokacija je Banka gena citrusa (Florida Citrus Arboretum) koja postoji u okviru Odeljenja za biljnu industriju (Department of Plant Industry - DPI) u Winter Haven, Univerzitet na Floridi i predstavlja ogranak američkog saveznog Ministarstva za poljoprivredu (USDA). Druga lokacija su ogledna polja istraživačkog centra Citrus Research and Educational Center (CREC) u Lake Alfred koji ima 100-godišnju tradiciju u gajenju i oplemenjivanju citrusnih voćnih vrsta a pripada državnom univerzitetu Floride (University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences).

Plodovi su sterilisani u 20% rastvoru varikine (početne koncentracije 5.25% NaOCl) 30 minuta. Sterilisani plodovi su zatim otvoreni u aseptičnim uslovima tako što je hirurškim nožem napravljen dubok (1-2 cm) ekvatorijalni rez a polulopte plodova su razdvojene okretanjem, jedne u odnosu na drugu, u suprotnom smeru. Ovule su izvađene sterilnom pincetom i stavljene na hranljivu podlogu za indukciju kalusa. Izolovane ovule su inkubirane u mraku na $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ a svake 2-3 nedelje su prenešene na novu hranljivu podlogu sve do pojave embriogenog (žutog i rastresitog) kalusa nucelnog porekla.

Efikasna indukcija kalusogeneze je testirana na 0.146M EME hranljivoj podlozi (**Tabela 1**) sa 50 g/l saharoze uz prisustvo 0, 0.5 i 10.0 mg/l kinetina. Svaki tretman je imao tri ponavljanja sa ukupnim brojem od 190 – 610 ovula po tretmanu. Sa utvrđivanjem kalusogenog potencijala se počelo u avgustu a zatim je jednom mesečno (sve do aprila sledeće godine) beležen broj ovula koje kalusiraju i koje proizvode nucelarne (somatske) embrione (embriogeni potencijal). Oba parametra (kalusogeni i embriogeni potencijal) su praćena u toku devet meseci od postavljanja ovula na indukcionu hranljivu podlogu. Za statističku analizu efekta genotipa ili tipa regulatora rastjenja na kalusogeni potencijal i embriogeni potencijal, korišćen je Duncan test (Duncan 1955) sa nivoom poverenja od 95 % ili većim.

Tabela 1. Sastav osnovne 0.146M EME hranljive podloge.

Komponenta	Koncentracija (mg/l)
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
KH ₂ PO ₄	150
K ₂ HPO ₄	20
MgSO ₄ ×7H ₂ O	370
CaCl ₂ ×2H ₂ O	440
Na ₂ EDTA	37.3
FeSO ₄ ×7H ₂ O	27.8
MnSO ₄ ×H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ ×7H ₂ O	8.6
H ₃ BO ₃	6.2
KI	0.83
Na ₂ MoO ₄ ×2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ ×5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ ×6H ₂ O	0.025
Tiamin-HCl	10
Piridoksin-HCl	10
Mio-inozitol	100
Nikotinska kiselina	1
Maltozni ekstrakt	500
Agar	8000

Indukovani embriogeni kalus nucelarnog porekla je dalje gajen i održavan na čvrstoj H+H hranljivoj podlozi (**Tabela 2**). Prenošenje kalusa na svežu hranljivu podlogu je vršeno svake 4 nedelje tako što kalusi dobijeni iz individualnih ovula nisu međusobno mešani već su dalje gajeni kao zasebne kalusne linije.

Tabela 2. Sastav osnovne čvrste H+H hranljive podloge.

Komponenta	Koncentracija (mg/l)
NH ₄ NO ₃	825
KNO ₃	950
KCl	750
KH ₂ PO ₄	150
K ₂ HPO ₄	20
MgSO ₄ ×7H ₂ O	370
CaCl ₂ ×2H ₂ O	440
Na ₂ EDTA	37.3
FeSO ₄ ×7H ₂ O	27.8
MnSO ₄ ×H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ ×7H ₂ O	8.6
H ₃ BO ₃	6.2
KI	0.83
Na ₂ MoO ₄ ×2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ ×5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ ×6H ₂ O	0.025
Tiamin-HCl	10
Piridoksin-HCl	10
Mio-inozitol	100
Nikotinska kiselina	1
Maltozni ekstrakt	500
Glutamin	1550
Saharoza	50000
Agar	8000

Obzirom da nucelarni kalus ima izuzetno visok embriogeni kapacitet, u cilju njegovog održavanja u nediferenciranom stanju vršena je, prilikom svakog prenosa, vizuelna selekcija i za dalje gajenje korišćen je samo svetlo žuti rastresiti tip kalusa, uz odbacivanje diferenciranih delova sa organizovanim tkivima.

Za inicijaciju ćelijskih suspenzija, uzimano je približno 2 g nucelarnog kalusa gajenog na čvrstoj H+H hranljivoj podlozi i prenošeno u Erlenmajere od 125 ml koji su sadržali 20 ml H+H tečne hranljive podloge sa 35g/l saharoze. Erlenmajeri sa ćelijskim

suspenzijama su dalje gajeni na horizontalnom obrtnom šejkeru (125 rpm) pri temperaturi od $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ i fotoperiodu 16 h svetlosti / 8 h mraka (intenzitet svetla = $70 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{sec}$). Posle dve nedelje, dodavano je 20 ml nove H+H tečne hranljive podloge u pojedinačne Erlenmajere. Ovako uspostavljene ćelijske suspenzije su održavane kroz subkulturu na svake dve nedelje.

3.1.2. Priprema i enzimski tretman ćelija iz embriogenih kultura suspenzija

Ćelijske suspenzije, uspostavljene iz nucelnog kalusa različitih kultivara mandarina, su korišćene za izolacije embriogenih protoplasta. Iz 5-12 dana stare suspenzije (iz 2-nedeljnog ciklusa subkulture) je uzeto, pipetom širokog prečnika, približno 2 ml zapremine (~ 1 g sveže težine) i prenešeno u Petri šolju (60×15 mm). Višak tečnosti iz Petri šolje je uklanjao pomoću Pasterove pipete. Ćelijski agregati su tretirani smešom 2.5 ml 0.6M BH3 tečne hranljive podloge (**Tabela 3**) i 1.5 ml enzimskog rastvora različitih formulacija (sastav A, B, i C enzimskih rastvora je prikazan u **Poglavlju 3.1.4**).

Tabela 3. Sastav 0.6M BH3 hranljive podloge.

Komponenta	Koncentracija (mg/l)
KCl	1500
KH_2PO_4	150
K_2HPO_4	20
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	370
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	440
Na_2EDTA	37.3
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	27.8
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	22.3
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
H_3BO_3	6.2
KI	0.83
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0.25

Tabela 3. (nastavak)

Komponenta	Koncentracija (mg/l)
CuSO ₄ ×5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ ×6H ₂ O	0.025
Mio-inozitol	100
Nikotinska kiselina	1
Maltozni ekstrakt	500
Glutamin	3100
Kazein hidrolizat	250
Manitol	81900
Saharoza	51350
Kokosovo mleko	20ml/l
Fruktoza	250
Riboza	250
Ksiloza	250
Manoza	250
Ramnoza	250
Celobioza	250
Galaktoza	250
Glukoza	250
Natrijum piruvat	20
Limunska kiselina	40
Jabučna kiselina	40
Fumarna kiselina	40
Vitamin B ₁₂	0.02
Kalcijum pantotenat	1
Askorbinska kiselina	2
Holin hlorid	1
p-aminobenzoična kiselina	0.02
Folna kiselina	0.4
Riboflavin	0.2
Biotin	0.01
Vitamin A	0.01
Vitamin D ₃	0.01

Petri šolje su zatvarane Nescofilm-om (Azwell, Osaka, Japan) i inkubirane 17-20 h na horizontalnom obrtnom šejkeru (50 rpm) u mraku na 28±2°C.

3.1.3. Priprema i enzimski tretman tkiva iz listova

Kao izvori neembriogenih mezofilnih protoplasta korišćene su pretežno listovi biljaka koje su isklijavane iz semena i gajene 2-6 meseci u uslovima *in vitro* na RMAN hranljivoj podlozi (**Tabeli 4**).

Tabela 4. Sastav RMAN hranljive podloge.

Komponenta	Koncentracija (mg/l)
NH ₄ NO ₃	825
KNO ₃	950
KH ₂ PO ₄	75
K ₂ HPO ₄	10
MgSO ₄ ×7H ₂ O	185
CaCl ₂ ×2H ₂ O	440
Na ₂ EDTA	37.3
FeSO ₄ ×7H ₂ O	27.8
MnSO ₄ ×H ₂ O	11.15
ZnSO ₄ ×7H ₂ O	4.3
H ₃ BO ₃	3.1
KI	0.42
Na ₂ MoO ₄ ×2H ₂ O	0.13
CuSO ₄ ×5H ₂ O	0.013
CoCl ₂ ×6H ₂ O	0.013
Tiamin-HCl	5
Piridoksin-HCl	5
Mio-inozitol	50
Nikotinska kiselina	0.5
Saharoza	25000
Agar	8000
Aktivni ugalj	500
Naftilsirćetna kiselina (NAA)	0.02

Sa biljaka je, da bi se obezbedio visok prinos prečišćenih protoplasta ($5-10 \times 10^6$ protoplasta po Erlenmajeru), uzimano 10 - 15 listova (1-2 g sveže mase) koji su u aseptičnim uslovima sečeni na uzane trake širine 1 - 2 mm. Ovako isečeni listovi su prebačeni u Erlenmajere i tretirani smešom od 8 ml 0.6M BH3 tečne hranljive podloge i

3 ml enzimskog rastvora različitih formulacija (sastav A-C enzimskih rastvora videti u **Poglavlju 3.1.4**). Na eksplantate je primenjen vakuum (50 kPa) u trajanju 20-30 min da bi se olakšala infiltracija enzima u tkivo lista tj. da bi se povećao efekat enzimske aktivnosti. Uslovi i dužina inkubiranja listova na obrtnom šejkeru su bili isti kao i u slučaju tretmana ćelija embriogene suspenzije.

U retkim slučajevima su kao izvor eksplantata korišćene biljke gajene u staklari na niskom intenzitetu svetlosti. Pre inkubacije u enzimskom rastvoru, listovi *ex vitro* gajenih biljaka su sterilisani potapanjem u 20% rastvor varikine 25 minuta nakon čega je usledilo ispiranje tri puta u sterilisanoj dejonizovanoj H₂O.

Kultivari mandarina čiji su listovi korišćeni za izolaciju neembriogenih mezofilnih protoplasta su bili: 'Willowleaf' mandarina (**Slika 4.i**), 'Snack' tangor (**Slika 5.I**), 'Ponkan' mandarina (**Slika 4.a**), 'Kinnow' mandarina (**Slika 4.j**), 'Osceola' tangelo (**Slika 4.m**) i 'W.Murcott' tangor (**Slika 5.g,h**).

3.1.4. Određivanje efikasnosti enzimskih smesa za izolovanje protoplasta iz embriogenih kultura suspenzija i neembriogenih mezofilnih ćelija

Tri enzimske smese koje su testirane su sadržale:

- A. 1% celulaze*, 1% maceraze*, 0.2% pektoliaz*, 0.7 M manitola, 24 mM CaCl₂×2H₂O, 6.15 mM MES pufera, 0.92 mM NaH₂PO₄, pH=5.6).
- B. 1% celulaze*, 1% maceraze*, 0.7 M manitola, 24 mM CaCl₂×2H₂O, 6.15 mM MES pufera, 0.92 mM NaH₂PO₄, pH=5.6).
- C. 2% celulaze*, 2% maceraze*, 0.7 M manitola, 24 mM CaCl₂×2H₂O, 6.15 mM MES pufera, 0.92 mM NaH₂PO₄, pH=5.6).

*enzimi su proizvedeni u Yakult Honsha Co. Ltd., Tokyo, Japan (celulaza = Cellulase Onozuka RS; maceraza = Macerozyme R10; pektoliaz = Pectolyase Y23)

Nakon izolacija i prečišćavanja (**Poglavlje 3.1.5**), živi protoplasti su brojani uz pomoć hemocitometra (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) a njihova koncentracija je izražena kao broj protoplasta koji se dobija iz 1 g sveže težine listova tj. ćelijske suspenzije. Eksperimenti su ponovljeni tri puta.

3.1.5. Izolacija i prečišćavanje protoplasta

Nakon inkubacije, digestirane mešavine (ćelije suspenzija iz embriogenog nucelnog kalusa i tkiva lista) poreklom od dva različita roditelja (**Slika 2**) su profiltrirane kroz sterilni filter od nerđajućeg čelika sa porama veličine 45 µm (Small Parts Inc., Logansport, IN, USA). Profiltrirane suspenzije ćelija su odvojeno prikupljeni u graduisane epruvete (sa poklopcem) zapremine 15 ml (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) i centrifugirane 8 min pri brzini 900 rpm. Supernatant svakog od filtrata je uklonjen Pasterovom pipetom, a protoplasti nagomilani u talogu su prečišćeni uz pomoć saharozno-manitolnog gradijenta na sledeći način: talog je resuspendovan u 5 ml CPW 25% S (saharozne) hranljive podloge (**Tabela 5**) a na vrh ovog sloja je pažljivo, bez mešanja, nanešen drugi sloj od 2 ml CPW 13% M (manitolne) hranljive podloge (**Tabela 6**). Na mestu dodirivanja ova dva sloja je nakon ponovnog centrifugiranja (8 min, 900 rpm) formiran prsten od živih neoštećenih protoplasta debljine 1-3 mm. Protoplasti iz prstena su Pasterovom pipetom prikupljeni u novu graduisanu epruvetu sa poklopcem i resuspendovani u 10 - 13 ml 0.6 M BH3 tečne hranljive podloge. Centrifugiranjem i ponovnim resuspendovanjem u 0.6M BH3 tečnoj hranljivoj podlozi je izvršeno još jedno ispiranje protoplasta. Nakon završnog centrifugiranja, koncentracija resuspendovanih embriogenih (ćelije suspenzije) i neembriogenih (ćelije lista) protoplasta je podešena na $3-5 \times 10^6$ protoplasta/ml a onda su oni spojeni u istu epruvetu u odnosu 1:1.

Tabela 5. Sastav CPW 25% S (saharozne) hranljive podloge.

Komponenta	Koncentracija (mg/l)
MgSO ₄ ×7H ₂ O	250
KNO ₃	100
KH ₂ PO ₄	27.2
KI	0.16
CuSO ₄ ×5H ₂ O	0.00025
CaCl ₂ ×2H ₂ O	150
Saharoza	250000

Tabela 6. Sastav CPW 13% M (manitolne) hranljive podloge.

Komponenta	Koncentracija (mg/l)
MgSO ₄ ×7H ₂ O	250
KNO ₃	100
KH ₂ PO ₄	27.2
KI	0.16
CuSO ₄ ×5H ₂ O	0.00025
CaCl ₂ ×2H ₂ O	150
Manitol	250000

3.1.6. Hemijska fuzija protoplasta uz pomoć polietilen glikola (PEG)

Iz smeše embriogenih protoplasta nucelnog porekla i neembriogenih protoplasta poreklom iz mezofila lista, Pasterovom pipetom je uzeto približno 4-5 kapi (oko $0.5-1 \times 10^6$ protoplasta) i prenešeno tačno u centar 60×15 mm Petri šolje. U svakom pojedinačnom eksperimentu je bilo ukupno 6-8 Petri šolja. Eksperiment je ponovljen 3-5 puta u zavisnosti od kombinacije protoplasta. Odmah je preko svake kombinacije smeše protoplasta dodato 4-5 kapi 40% PEG rastvora različite molekulske mase MM = 1500, 6000 i 8000 da bi se testiralo da li postoje razlike u njihovom uticaju na konačan broj dobijenih somatskih hibrida. Pored PEG u rastvoru za hemijsku fuziju protoplasta je bila i 0.3M glukoza i 66 mM CaCl₂ (**Tabela 7**).

Tabela 7. Sadržaj i koncentracije sastojaka u PEG smeši za fuziju protoplasta.

Komponenta	Koncentracija (g/100ml)
Glukoza	5.4
CaCl ₂	0.97
40% rastvor PEG-a	40 mL/100mL
pH = 6.0	

PEG je dodat direktno u centar protoplasne smeše, što je omogućilo njegovo lakše prodiranje između samih protoplasta. Posle 10-15 min, u svaku Petri šolju su dodate 4 kapi visoko alkalnog (pH=10.5) **A + B** rastvora (pomešanih u odnosu 9: 1 v: v) (**Tabele 8, 9**), ali ovaj put pažljivo na periferiju smeše protoplasta da bi se sprečilo narušavanje vrlo osetljivih struktura sačinjenih od protoplasta koji se nalaze u procesu fuzije.

Tabela 8. Sadržaj i koncentracije sastojaka u 100 ml rastvora **A** korišćenog za fuziju protoplasta.

Komponenta	Koncentracija (g/100ml)
Glukoza	7.2
CaCl ₂	0.97
DMSO	10 mL/100mL
pH = 6.0	

Tabela 9. Sadržaj i koncentracije sastojaka u 100 ml rastvora **B** korišćenog za fuziju protoplasta.

Komponenta	Koncentracija (g/100ml)
Glicin	2.2
pH = 10.5	

Nakon perioda inkubacije od 10-15 min, pažljivo je dodato 15-20 kapi 0.6 M BH3 hranljive podloge, opet na periferiju smeše protoplasta. Uklanjanjem ovih kapi (pažljivo, izbegavajući gubitak protoplasta) i dodavanjem novih kapi u istom broju su izvršena još dva ispiranja sa 0.6 M BH3 hranljive podloge, čime su potpuno uklonjeni PEG i A + B rastvor. Nakon poslednjeg ispiranja, preko protoplasta je dodato 1.5 – 2.0 ml mešavine tečne hranljive podloge 0.6 M BH3 (**Tabela 3**) i 0.6 M EME u odnosu 1:1. Hranljiva podloga pod nazivom 0.6 M EME predstavlja modifikovanu EME podlogu (**Tabela 1**) koja je sadržala 205.38 g/l saharoze. Petri šolje su zatim bile zatvorene Nescofilm-om i blagim cirkularnim pokretima, suspenzije protoplasta su razlivene po celoj površini Petri šolja i u tankom sloju inkubirane u mraku na 28± 2°C sledećih 4-6 nedelja.

3.1.7. Regeneracija biljaka iz fuzionisanih protoplasta

Posle 3-6 nedelja inkubacije, kulture fuzionisanih protoplasta sa već vidljivim nezrelim kolonijama su gajene sa tečnim hranljivim podlogama koji su sadržale smanjen osmotikum radi pospešivanja sazrevanja kolonija. To je obavljeno dodavanjem u svaku Petri šolju po 10 - 12 kapi mešavine 0.6 M BH3, 0.6 M EME i 0.15 M EME tečnih podloga u odnosu 1:1:1 (v:v:v). Kulture su dalje inkubirane, sve do pojave zrelih kolonija pri slabom osvetljenju (20 µE/m²/sec intenzitet) na fotoperiodu 16 h svetlosti/8

h mraka i na $28\pm 2^{\circ}\text{C}$. Nakon sazrevanja kolonija, obavljen je njihov transfer na hranljive podloge uz dodatno smanjenje osmotikuma radi indukcije somatske embriogeneze. To je urađeno na sledeći način: u svaku Petri šolju sa kolonijama je dodato 2 ml 1:2 (v:v) mešavine 0.6 M BH3 (**Tabela 3**) i 0.15 M EME-malt tečnih hranljivih podloga i odmah je ceo sadržaj prebačen na površinu agarne 0.15 M EME-malt podloge (Tomaz *et al.* 2001), a zatim blagim cirkularnim pokretima, tečni sloj je razliven po celoj kontaktnoj površini sa agarnim slojem. Hranljiva podloga 0.15 M EME-malt je modifikovana EME podloga sa 50 g/l maltoze (**Tabela 1**).

Tabela 10. Sastav B+ hranljive podloge.

Komponenta	Koncentracija (mg/l)
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
KH ₂ PO ₄	150
K ₂ HPO ₄	20
MgSO ₄ ×7H ₂ O	370
CaCl ₂ ×2H ₂ O	440
Na ₂ EDTA	37.3
FeSO ₄ ×7H ₂ O	27.8
MnSO ₄ ×H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ ×7H ₂ O	8.6
H ₃ BO ₃	6.2
KI	0.83
Na ₂ MoO ₄ ×2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ ×5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ ×6H ₂ O	0.025
Tiamin-HCl	10
Piridoksin-HCl	10
Mio-inozitol	100
Nikotinska kiselina	1
Kokosovo mleko	20mL/l
Naftilsirćetna kiselina (NAA)	0.02
Giberelna kiselina (GA ₃)	1
Saharoza	25000
Agar	8000

Kulture su inkubirane na 16 h fotoperiodu ($70 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{sec}$ intenzitet svetla) i na $28 \pm 2^\circ\text{C}$, a ovakvi uslovi u sobi za gajenje *in vitro* kultura su ostali nepromenjeni sve do mikro-kalemljenja somatskih hibrida na biljne podloge (**Poglavlje 3.1.9**). Sve tečne hranljive podloge su sterilisane metodom filter-sterilizacije korišćenjem filtera ($0.22 \mu\text{m}$ veličina pora) za jednokratnu upotrebu (Thermo Fisher Scientific Inc., USA).

Tabela 11. Sastav DBA3 hranljive podloge.

Komponenta	Koncentracija (mg/l)
NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
KH_2PO_4	150
K_2HPO_4	20
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	370
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	440
Na_2EDTA	37.3
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	27.8
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	22.3
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
H_3BO_3	6.2
KI	0.83
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
Tiamin-HCl	10
Piridoksin-HCl	10
Mio-inozitol	100
Nikotinska kiselina	1
Kokosovo mleko	20mL/l
Maltozni ekstrakt	1500
2,4-D	0.01
Benzilaminopurin (BAP)	3
Saharoza	25000
Agar	8000

Odmah nakon pojave regenerisanih somatskih embriona, vršen je njihov prenos na novu 0.15 M EME-malt agarnu podlogu. Somatski embrioni manji od 3 mm nisu stavljeni direktno u podlogu već na površinu aceto-celuloznih filter papira (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) koji su bili postavljani na površinu hranljivih podloga. Mali somatski embrioni su na svakih 3-4 nedelje prenešeni na EME 1500 podlogu (modifikovana EME koja je sadržala 1500 mg/l maltoznog ekstrakta i 50 g/l saharoze, **Tabela 1**) radi njihovog daljeg sazrevanja i/ili na B+ podlogu (**Tabela 10**) radi njihovog izduživanja. Somatski embrioni koji nisu klijali i nisu se u potpunosti razvili (vrlo često neuobičajenog izgleda) su posle odstranjivanja apikalnog meristema prenešeni na DBA3 hranljivu podlogu (**Tabela 11**) radi indukcije organogeneze. Potpuno razvijene biljčice (0.5-2 cm) i/ili izdanci bez korena su se dalje razvijali i ožiljavali na RMAN hranljivoj podlozi (**Tabela 4**) u Magenta kutijama (Thermo Fisher Scientific Inc., USA).

3.1.8. Identifikacija somatskih hibrida

3.1.8.1. Utvrđivanje nivoa ploidnosti pomoću “flow” citometrije

Somatski embrioni i/ili biljčice su rano, još u toku faze gajenja u uslovima *in vitro* testirani pomoću “flow” citometrije da bi se utvrdio nivo ploidnosti. Ploidnost je utvrđena na osnovu kvantifikovanja jedarnog sadržaja DNK ćelija poreklom iz lista uz pomoć aparata citometra sa živinom HBO lampom koja emituje UV ekscitirajuću svetlost (Partec Ploidy Analyser; Partec GmbH, Munster, Germany). Jedarni sadržaj ćelija je prvo obojen fluorescentnom bojom, a potom propušten kroz uzanu kivetu citometra gde je ekscitiran UV svetlom talasne dužine $\lambda=420$ nm. Ekscitirana fluorescentna boja, sada vezana za DNK, je natrag emitovala plavu svetlost (talasne dužine između 435-500 nm) koju je čitač mašine određivao u količinu DNK u ćeliji i postavio na x-osu dobijenog histograma. Mašina pored kvantifikovanja DNK takođe broji i ćelije koje u monodisperznom nizu (flow) prolaze kroz kivetu, tako da na kraju obrade podataka se dobija histogram sa distribucijom ćelija (na x-osi) na osnovu njihovog sadržaja DNK. Dakle, u svakom od tri vrha predstavljena na histogramskoj krivi se nalaze ćelije sa istom količinom DNK (tj. sa istom ploidnošću). Osetljivost mašine (gain) je podešena tako da se diploid na x-osi detektuje na vrednosti od 100, triploid na 150 a tetraploid na 200 jedinica za kvantifikaciju DNK.

Za pripremu i merenje svakog uzorka su korišćeni ekstrakcioni pufer i DAPI (4,6-Diamidino-2-fenilindol) fluorescentna boja iz kita – Patec CyStain UV precise P High Resolution Staining Kit for Plant DNA Analysis (Partec GmbH, Munster, Germany). Za pripremu uzorka je uzet deo lista testirane biljke (0.4cm²) i zajedno sa diploidnim standardom izmacerirano žiletom u 0.5 ml hladnog (4°C) ekstrakcionog pufera. Na ovaj način su iz povređenih ćelija oslobođena jedra. Nakon filtracije kroz filter od najlona sa porama veličine 50 µm, da bi se odstranili grubi ostaci izmravljenog tkiva, u svaki profiltrirani uzorak je dodato 1.5 ml hladne (4°C) DAPI fluorescentne boje. Ova boja se selektivno vezuje za dvolančanu DNK, sa preferencijom prema sekvencama bogatim adeninom i timinom.

3.1.8.2. Utvrđivanje auto- i alotetraploidnosti somatskih hibrida pomoću EST-SSR molekularne analize

Nakon utvrđivanja nivoa ploidnosti pomoću “flow” citometrije, identitet tetraploidnih somatskih hibrida tj. njihova auto- i alotetraploidnost je određena korišćenjem molekularne metode - EST-SSR (expressed sequence tag–simple sequence repeat). Ovom metodom, koja u sebi uključuje PCR reakciju, se dobijeni su alelski profili za određene lokuse u genomu somatskog hibrida i njegovih roditelja (ženskog i muškog). Ovi profili su onda međusobno poređeni za sličnosti i razlike u alelima za iste genske lokuse. Alotetraploidnost somatskog hibrida je potvrđena ukoliko se u njegovom SSR profilu pojavljuju istovremeno aleli koji su različiti između dva roditelja (za isti ispitivani lokus). S druge strane, ukoliko se u njegovom SSR profilu pojavio alel iz samo jednog roditelja onda se radi o autotetraploidu.

Poređenje alelskog profila somatskog hibrida sa roditeljskim je rađeno u odnosu na alelske profile tzv. “majke” biljke. Pod “majkom” biljkom ženskog roditelja se podrazumevala zrela biljka gajena duži niz godina u polju sa koje su inicijalno ubrani nezreli plodovi i izolovane ovule da bi se inicirale embriogene kulture kalusa (**Poglavlje 3.1.1**). “Majka” biljka muškog roditelja je takođe biljka gajena u polju sa koje su ubrani zreli plodovi da bi se izolovala semena i iz njih inicirale kulture izdanaka za potrebe kasnijeg izolovanja neembriogenih mezofilnih protoplasta (**Poglavlje 3.1.3**).

Genomska DNK iz somatskih hibrida i “majki” biljaka je izolovana iz 0.1-0.3g listova koristeći GenElute Plant Genomic DNA Kit (Sigma, Saint Louis, MO, USA) a

svaki uzorak je testiran sa 10 prajmerskih parova koji pokazuju jasan polimorfizam kod citrusa: CX6F04, CX6F17, CX6F18, CX6F21, CX6F30, CX5F57, CX0010, CX0035, CX2007 i CX2021 čije su sekvence (**Tabela 12**) kao i čitava genotipska procedura razvijena ranije od strane Chen *et al.* (2006, 2008a). Ukratko, PCR (polymerase chain reaction) reakcija tj. reakcija lančanog umnožavanja fluorescentno obeleženih proizvoda je analizirana u aparatu za automatsko sekvenciranje Avant Genetic Analyzer 3130xl (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Ovaj aparat uz pomoć GeneMark softvera (SoftGenetics, State College, PA) daje hromatografske histograme za svaki od amplifikovanih proizvoda. Vrhovi na histogramima predstavljaju alele za određene lokuse tj. proizvode amplifikacije genomske DNK sa različitim prajmerima. Zbog kodominantne prirode EST-SSR prajmera (za razliku od npr RAPD gde je $[(Aa = AA) \neq (aa)]$, istovetni homozigotni aleli (AA, aa) će biti predstavljeni jednim dok će heterozigotni Aa biti predstavljen sa 2 vrha i tako će moći da se napravi razlika između dominantnog homozigota (AA) i heterozigota (Aa) za dati lokus.

Prajmerski parovi (forward & reverse) su sintetisani u Operon Technologies Inc. (Alameda, CA, USA). Univerzalni prajmer M13 (GTT GTA AAA CGA CGG CCA GT) (takođe sintetisan u Operon Technologies Inc.) je obeležen sa četiri različite fluorescentne boje (6FAM, VIC, NED i PET; **Tabela 12**) i dodat kao rep na 5' kraj svakog SSR 'forward' prajmera (Chen *et al.* 2006). PCR reakcija je rađena u mikro-titar pločama sa 96-polja u PCR termalnom kontroloru (i-cycler, Bio-Rad). Smeša za PCR reakciju je imala totalni volumen od 15 μ l a sastojala se od: 1 $\times$ PCR pufera (Promega, Madison, WI, USA), 2 mM MgCl₂ (Promega, USA), 200 μ M dNTPs (Idaho Technology, Salt Lake City, UT, USA), 0.3 μ M 'forward' prajmera, 0.3 μ M 'reverse' prajmera, 0.05 μ M fluorescentno obeleženog M13 prajmera, 1 U Taq polimeraze (Promega) i 25 ng izolovane genomske DNK. Amplifikacija DNK je postignuta korišćenjem sledećeg termocikličnog programa:

- 1) 1 ciklus inicijalne denaturacije DNK u trajanju od 3 min na 94°C
- 2) 10 ciklusa pri čemu se svaki sastoji od: denaturacije (30s na 94°C), vezivanja prajmera tj. "annealing" (30s na 60°C ali tako da se u svakom sledećem ciklusu temperatura smanjuje za 1°C) i sinteze lanaca DNK (45s na 72°C)
- 3) 30 ciklusa pri čemu se svaki sastoji od: denaturacije (30s na 94°C), vezivanja prajmera (30s na konstantnih 51°C) i sinteze lanaca DNK (45s na 72°C)

4) 1 ciklus finalne sinteze lanaca DNK (30 min na 72°C).

Iz svakog od osam fluorescentno obojenih PCR amplifikovanih proizvoda je uzeto po 0.5 µl uzorka i pomešano sa 6.4 µl Hi-Di formida i 0.6 µl LIZ 500 (standardi za Avant genetski analizator). Smeša je potom denaturisana na 95°C 5 min, odmah ohlađena na

Tabela 12. Lista EST-SSR prajmera kojom su korišćeni za utvrđivanje identiteta i potvrđena poliploidnost somatskih hibrida mandarina.

EST-SSR marker	Sekvence 'forward' (F) i 'reverse' (R) prajmera	Očekivani EST amplikon (bp)
CX6F04(B)	(M13 ^a F) 5'-AGTGAAGTGTCCATTGGATTTTCG-3' R 5'-GTGTTGAATCCCGACCTTCTACC-3'	155
CX6F17(B)	(M13 ^a F) 5'-GATACAAATTAGCATTGATTGAATG GA-3' R 5'-ATCGGGACTCGCATTAGGGT-3'	116
CX6F18(G)	(M13 ^a F) 5'-GTCTTCAACGAAGTTGCAGGCT-3' R 5'-TACTATTTCGAGAGAGCAGCAGCA-3'	141
CX6F21(G)	(M13 ^a F) 5'-CTACAAGTTCCCCAGTTATCCCG-3' R 5'-ACTTGACCCGCTCTAGGAGTGAC -3'	140
CX6F30(Y)	(M13 ^a F) 5'-TAGGTTCTCTTTCAACCCCTTTC-3' R 5'- CTGCTTCGGCTGTAATTGTGATT-3'	85
CX5F57(R)	(M13 ^a F) 5'-CCTCGCCAATGACCTTTGTATTTA-3' R 5'-CAATACGTTTGGGTTCTAGTTCCG-3'	143
CX0010(B)	(M13 ^a F) 5'-AACCGAAGATGGAGGGAAGT-3' R 5'-AGAGGCTATAGATCGTGGATGCAG-3'	160
CX0035(G)	(M13 ^a F) 5'-CCATTAACGAGAAAACCAAACA-3' R 5'-CAAAAAGGGGTTGCAAAGAA-3'	166
CX2007(Y)	(M13 ^a F) 5'-AAATCGGCTAGTTGCAAACG-3' R 5'-CCTTGACATTGTCGATGGTG-3'	155
CX2021(R)	(M13 ^a F) 5'-AAGGTCATGTCTTTAGCACTTTGA-3' R 5'-CAAGTTGCCAATTCAGGAGG-3'	124

^a Univerzalni M13 prajmer (5'-GTTGTAAAACGACGGCCAGT-3') je dodat kao rep na 5' kraj svakog SSR 'forward' prajmera. Ovaj prajmer je obeležen sa četiri različite fluorescentne boje: FAM plavom (B), VIC zelenom (G), NED žutom (Y) i PET crvenom (R)

4°C i ubačena u aparat za automatsko sekvenciranje. Posle toga je usledila analiza dobijenih dijagrama na gore opisan način.

Dodatna SSR-EST analiza je urađena da bi se poredili alelski profili kalusnih linija dobijenih iz individualnih ovula 'Murcott' i 'W.Murcott' tangora sa alelskim profilom njihovih "majki" biljaka. Testirano su 24 kalusne linije 'Murcott' i 18 linija 'W.Murcott' tangora. Izolovanje genomske DNK iz kalusa kao i molekularna EST-SSR analiza je urađena na identičan način kao i u slučaju dobijanja alelskih profila somatskih hibrida i njihovih "majki" biljaka. Jedina razlika je bila što su kalusne linije 'Murcott' tangora bile testirane samo sa 6 prajmera: CX6F04, CX5F57, CX0010, CX0035, CX2007 i CX2021 (Tabela 12).

3.1.9. Mikro-kalemljenje somatskih hibrida na komercijalnu biljnu podlogu i njihovo gajenje u stakleniku

Nakon rane identifikacije somatskih hibrida još u toku njihovog gajenja u *in vitro* uslovima na RMAN hranljivoj podlozi, pristupilo se njihovom kalemljenju na trolisne podloge: komercijalno dostupane 'Carrizo' citrandž – hibrid slatke i trolisne pomorandže (*C. sinensis* Osb. × *Poncirus trifoliata* Raf.) i eksperimentalne "tetrazyg" Orange #19A [('Nova' tangelo + 'Hirado Buntan Pink' zigotski pamelu) × ('Cleopatra' mandarina (*C. reticulata* Blanco) + 'Argentine' trolisne pomorandža (*Poncirus trifoliata* L. Raf.))] (Grosser *et al.* 2003). Podloge za kalemljenje su neposredno pre kalemljenja bile gajene u stakleniku u kompostu koji se nalazi u plastičnim nosačima (sa 38-kontejnera) sve dok stabla isključili biljčica iz semena nisu dosegla ~100-200 mm visine i ~3-5 mm debljine. Nakon toga su bile spremne za kalemljenje. Prvo je izvršena njihova dekapitacija tj. odstranjivanje apikalnog meristema a odmah potom je, normalno na dekapitovanu površinu, napravljen 2-3 mm duboki vertikalni urez. Urez nikada nije postavljen centralno već malo ulevo/udesno u odnosu na centralnu uzdužnu ravan stabla da bi po postavljanju plemke u njega došlo do pravilnog dodirivanja provodnih sudova oba elementa (podloge i plemke) kalemljenja i njihovog pravilnog srastanja. U suprotnom, nije obezbeđen dotok vode i mineralnih materija iz korena podloge u plemku i ona se brzo suši i umire.

Identifikovane tetraploidne biljčice (plemke) se nakon vađenja iz Magenta kutija sa RMAN hranljivom podlogom pripremaju za kalemljenje tako što im se odstrani donji

deo sa korenom a gornji deo sa apikalnim meristemom veličine 5 mm i nekoliko najmlađih listića se ubacuje u zasečeni vertikalni urez na podlozi. Donja strana plemke koja ulazi u podlogu mora biti zašiljena (uz pomoć oštrog hirurškog skalpela) u obliku slova V i takođe mora biti veličine 2-3 mm da bi totalno odgovarala vertikalnom urezu u podlozi. Dodirna površina između podloge i plemke se pažljivo obmotava sa Nescofilm-om prema proceduri opisanoj od strane Dutt *et al.* (2009), a preko apikalnog meristema se stavi plastični nastavak od automatske pipete da bi se održala visoka vlažnost i time pospešilo zarastanje kalema kao što je opisano kod Skaria (2000). Plastični nastavci su uklonjeni 2-3 nedelje nakon uspešne aklimatizacije u stakleniku gde su kalemi držani sve vreme u dubokom hladu. Nakon dodatne dve nedelje, nakalemljene biljke su izložene normalnim uslovima u stakleniku i regularnom tretiranju sa đubrivom, herbicidima i insekticidima. U međuvremenu su i apikalni meristemi plemki počinju da rastu i daju jednolisne listove a obzirom da obe podloge imaju trolisne listove lako ih je razlikovati od plemki. U ovoj fazi se odstranjuju izdanci koji isključavaju iz bočnih pupoljaka trifolijatne podloge da oni ne bi usporavali rast vršnog izdanka plemke.

3.1.10. Analiza plodova somatskih hibrida gajenih u polju

Urađena je morfološka analiza listova dobijenih somatskih hibrida mandarina kao i analiza kvaliteta soka plodova adultnih somatskih hibrida izašlih iz juvenilne faze koji su gajenih u polju u okviru istraživačkog centra CREC u Lake Alfred, na Floridi. Analiza kvaliteta iscedenog soka je vršena u toku dve uzastopne kalendarske godine (2011 i 2012). U prvoj godini je analizirano pet somatskih hibrida (u **Tabeli 13** se nalaze pod rednim brojevima 1-5). U drugoj godini je ponovljena analiza ovih pet hibrida a uključena su još dva nova (pod rednim brojevima 6 i 7).

Tabela 13. Somatski hibridi korišćeni za analizu plodova.

1) 'Page' tangelo + 'Ortanique' tangor	(Guo <i>et al.</i> 2004b)
2) 'Page' tangelo + ('Clementine' mandarin × 'Satsuma' mandarina) ..	(Guo <i>et al.</i> 2004b)
3) 'Murcott' tangor + 'LB8-8' tangelo (Clementine × Minneola)	(Guo <i>et al.</i> 2004b)
4) 'Hamlin' pomorandža + 'Dancy' mandarina	(Grosser <i>et al.</i> 1992)
5) 'Succari' pomorandža + 'Changsha' mandarina	(Grosser & Chandler 2004)
6) 'Succari' pomorandža + 'Murcott' tango	(Mourao <i>et al.</i> 1996)
7) 'Rhode Red Valencia' pomorandža + 'Dancy' mandarina	(Grosser <i>et al.</i> 1998)

Analiza plodova svakog hibrida je rađena na uzorku od 3-15 plodova koji su ubrani u vreme njihove najveće zrelosti (od novembra do aprila). Sa njih su uzeti podaci za opis izvesnih spoljašnjih i unutrašnjih karakteristika po klasifikaciji Hodgson-a iz 1967 godine.

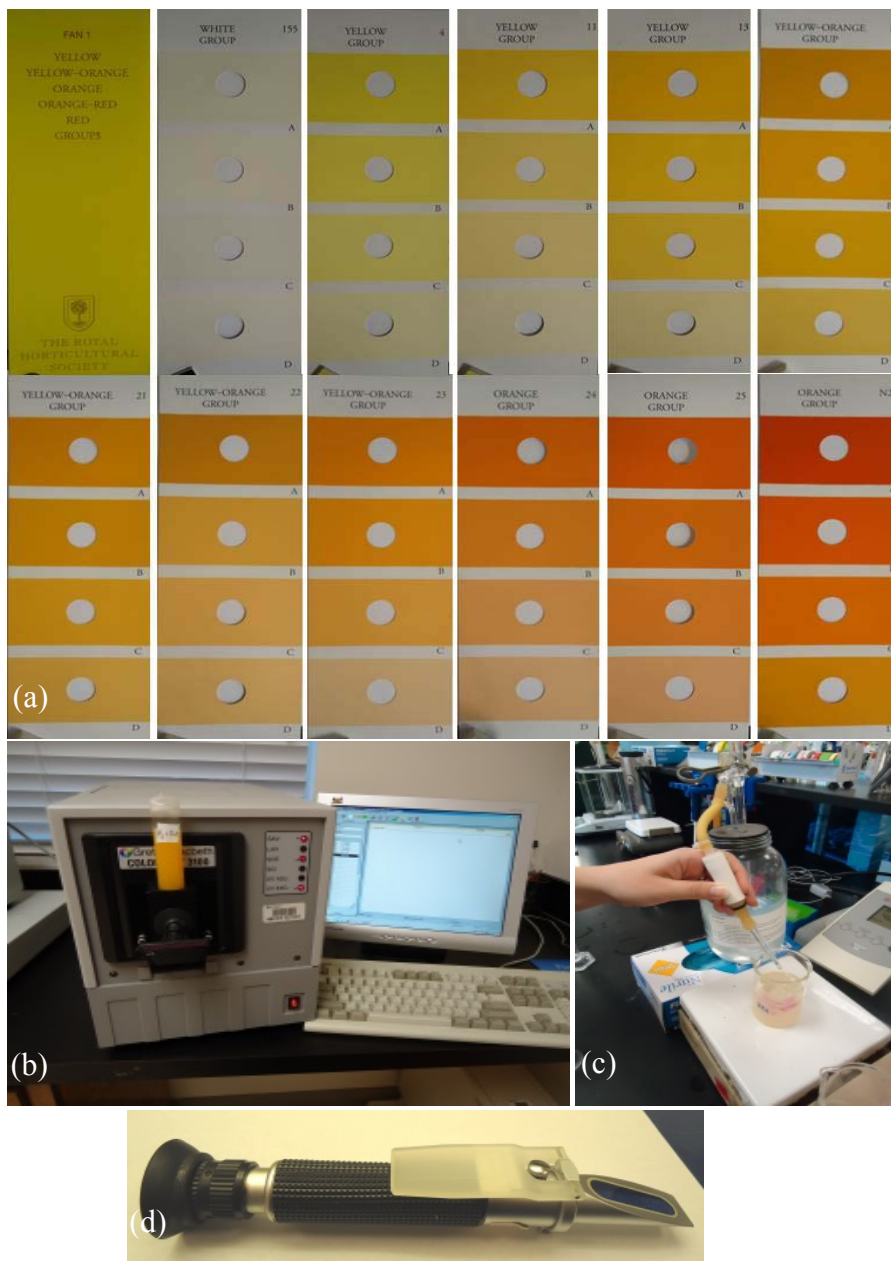
Za spoljašnje karakteristike ploda su uzeti sledeći podaci:

- veličina ploda: težina (g), prečnik (mm), visina (mm);
- oblik ploda;
- boja spoljašnje kore (egzokarpa) ploda (korišćenjem obojenih kartica izdatih od strane RHS – Royal Horticultural Society, **Slika 3.a**);
- površinska tekstura ploda;
- opis baze i apeksa.

Za unutrašnje karakteristike ploda su uzeti sledeći podaci:

- opis spoljašnje kore (egzokarpa): debljina (mm), tvrdoća, prisustvo žlezda;
- opis unutrašnje kore (albeda, mezokarpa): debljina (mm), prijanjanje uz endokarp, boja (korišćenjem RHS kartica, **Slika 3.a**);
- opis segmenata: broj, njihovo prijanjanje jednih uz druge, tvrdoća zidova;
- opis srži (endokarpa): boja (korišćenjem RHS kartica, **Slika 3.a**);
- prosečna količina iscedenog soka (ml) za izračunavanje količine soka u plodu (%) i lakoća ceđenja soka pomoću električnog sokovnika;
- boja iscedenog soka (korišćenjem elektronskog kolorimetra GretagMacbeth Color-Eye 3100, **Slika 3.b**);
- °briks (sinonim je TSS = total soluble solids) kao mera ukupne količine čvrstih materija (ponajviše šećera a takođe limunske kiseline i minerala) rastvorenih u soku (izmerena pomoću manuelnog refraktometra Bausch&Lomb Abbe-3L, **Slika 3.d**) a izražen u procentima (%);
- kiselost (sinonim je TA = total acids) utvrđena pomoću bazne titracije (0.3123N NaOH) i fenolftalein boje (**Slika 3.c**) a izražena u procentima (%);
- odnos °briks : kiselost (sinonim je TSS:TA);
- aroma (subjektivnom metodom);
- ukus (subjektivnom metodom);
- opis semena: prosečan broj, veličina (mm);

- zigotnost tj. poli/monoembriogenost je utvrđena isključivanjem semena u *in vitro* uslovima tokom gajenja na RMAN hranljivoj podlozi.



Slika 3. Utvrđivanje kvaliteta soka i boje plodova somatskih hibrida mandarina. **(a)** Korišćene obojene kartice izdate od strane RHS – Royal Horticultural Society kojima su utvrđene boje kore (egzokarpa i mezokarpa) i srži (endokarpa) testiranih plodova. **(b)** Elektronski kolorimetar GretagMacbeth Color-Eye 3100 kojim je utvrđena boja iscedenog soka. **(c)** Titracija soka pomoću baze (0.3123N NaOH) i fenolftalein boje kojom je izmerena kiselost (%) iscedenog soka. **(d)** Manuelni refraktometar Bausch&Lomb Abbe-3L kojim je izmeren °briks (%) iscedenog soka.

3.2. Interploidna i diploidna seksualna hibridizacija

3.2.1. Biljni material

Kao početni biljni materijal za eksperimente seksualne hibridizacije korišćeni su genotipovi koji se gaje u oglednim poljima istraživačkog centra CREC u Lake Alfred, na Floridi i u kolekciji citrusa floridskog Ministarstva poljoprivrede (DPI) u Winter Haven (**Tabele 14, 15 i 16**). U toku dve uzastopne kalendarske godine (2011 i 2012) su urađena tri različita tipa seksualnog ukrštanja a sve u cilju dobijanja triploidnih (3x) hibridnih bezsemenih biljaka (**Slika 2**).

Tabela 14. Genotipovi korišćeni u $2x \times 4x$ hibridizaciji.

Diploidni (2x) ženski roditelji:

‘Fortune’ mandarina, **Slika 4.g**
‘Marisol Clementine’ mandarina, **Slika 4.d**
‘Nules Clementine’ mandarina, **Slika 4.e**
‘Monreal Clementine’ mandarina, **Slika 4.f**
‘Lee’ tangelo, **Slika 4.l**
‘Sugar Belle’ tangelo, **Slika 5.a**
‘Ellendale’ tangor, **Slika 5.d**
‘Temple’ tangor, **Slika 5.k**
‘Ambersweet’ tangor, **Slika 5.c**
‘Ambersweet’ tangor zigotski hibrid
‘Fallglo’ tangelo-tangor, **Slike 5.i,j**
‘G96’ kompleksni hibrid trolisne pomorandže, mandarine i pamela

Tetraploidni (4x) muški roditelji:

‘Page’ tangelo + ‘Ortanique’ tangor, **Slika 6.d**
‘Page’ tangelo + (‘Clementine’ mand. x ‘Satsuma’ mand.), **Slika 6.c**
‘Page’ tangelo + ‘Furr’ tangor
‘Murcott’ tangor + ‘Ortanique’ tangor
‘Murcott’ tangor + ‘LB8-8’ tangelo (Clementine x Minneola), **Slika 6.a**
‘Nova’ tangelo + ‘Osceola’ tangelo, **Slika 6.b**
‘Hamlin’ pomorandža + ‘Dancy’ mandarina, **Slika, 6.e**
‘Valencia’ pomorandža + ‘Page’ tangelo
‘Valencia’ pomorandža + ‘Minneola’ tangelo, **Slika 6.j**
‘Rhode Red Valencia’ pomorandža + ‘Dancy’ mandarina, **Slika 6.k**
‘4X Succari’ autotetraploidni somatski hibrid
‘Succari’ pomorandža + ‘Page’ tangelo, **Slika 6.i**
‘Succari’ pomorandža + ‘Murcott’ tangor, **Slika 6.f**
‘Succari’ pomorandža + ‘Changsha’ mandarina, **Slika 6.h**

Istraživanja su fokusirana na interploidno ukrštanje - diploidnom $\times$ tetraploidnom ($2x \times 4x$) i recipročnom ($4x \times 2x$) a urađena je i jedna diploidna $\times$ diploidna ($2x \times 2x$) hibridizacija. U ($2x \times 4x$) hibridizaciji, svi korišćeni diploidni ($2x$) ženski roditelji su bili po prirodi monoembriogeni tj. neapomiktični (proizvodili su zigotska monoembriogena semena iz kojih klijaju biljke genetički različite u odnosu na majku biljku - “off type”). Pojava poliembriogenih semena koja u sebi pored zigotskih poseduju i nucelarne “true to type” embrione je u principu retka ali ne i nemoguća pojava kod kultivara citrusa za koje se zna da su po prirodi monoembriogeni. Korišćeni ženski roditelji u eksperimentu su pored monoembriogenosti takođe bili bez mogućnosti samooprašivanja. U ($4x \times 2x$) hibridizaciji je isti slučaj bio sa ženskim roditeljima a jedino je somatski hibrid [‘Page’ tangelo + ‘Ortanique’ tangor] poliembriogen ali tako što se među nucelarnim embrionima često pojavljuju i zigotski embrioni.

Tabela 15. Genotipovi korišćeni u $4x \times 2x$ hibridizaciji.

Tetraploidni (4x) ženski roditelji

‘Page’ tangelo + ‘Ortanique’ tangor, **Slika 6.d**

‘Murcott’ tangor + ‘LB8-8’ tangelo (Clementine $\times$ Minneola)

‘Succari’ pomorandža + ‘Hirado Buntan Pink’ zigotski pamelo

Diploidni (2x) muški roditelji:

‘Furr’ tangor

‘Page’ tangelo, **Slika 4.o**

Tabela 16. Genotipovi korišćeni u $2x \times 2x$ hibridizaciji.

Diploidni (2x) ženski roditelj:

‘Lee’ tangelo, **Slika 4.l**

Diploidni (2x) muški roditelj:

‘Page’ tangelo, **Slika 4.o**

3.2.2. Prikupljanje polena i utvrđivanje polenske vijabilnosti

Cvetovi muških roditelja su prikupljeni neposredno pred cvetanje (u prvoj polovini marta). Sa cvetova su uklanjene latice, a nakon toga su izolovane antere uz pomoć zakrivljene metalne pincete. Antere su odmah stavljene u 100×15 mm Petri šolje koje su 24-36 sati postavljene preko debelog sloja silika gela u zatvorenim plastičnim kutijama

radi dehidracije polena. Suvi polen je čuvan u Ependorf epruvetama na 4°C sve do njegove upotrebe u polju.

Vijabilnost suvog polena je utvrđena metodom histološkog bojenja uz istovremeno korišćenje dve boje: fluorescein-diacetata (FDA) i propidijum-jodida prema metodi Offord (2008) i Lee *et al.* (2008). Stok rastvor FDA boje je sveže pripremljen u koncentraciji 2 mg/ml pri čemu je kao rastvarač korišćen aceton. Iz stoka je uzeta jedna kap i rastvorena u 2 ml dejonizovane vode a potom je ovaj rastvor služio za bojenje polenovih zrna koji su se nalazili u tankom sloju na mikroskopskoj pločici. Nakon 30 minuta, u toku kojih fluorescentna boja proдре u živa polenova zrna na njih je stavljeno nekoliko kapi propidijum-jodida (u koncentraciji 0,1 mg/ml vode) koji je poslužio za brojanje mrtvih polenovih zrna. Živa (fluorescentno zelena) i mrtva (crvenobraon) polenova zrna su brojana na fluorescentnom mikroskopu (Zeiss Stemi SV 11) u tri vidna polja (200×) na dve različite mikroskopske pločice.

3.2.3. Polinacija, ubiranje plodova i ekstrakcija semena

Cvetovi ženskih roditelja su odabrani za polinaciju na osnovu njihove veličine i neposredno pred cvetanje radi postizanja njihove maksimalne fiziološke uniformnosti. Polinacija je obavljena ručno tako što su sa cvetova uklonjene latice i prašnici (urađena je emaskulacija) a potom je na stubić stavljen unapred izolovan i dehidriran polen poreklom od muškog roditelja. Oprašeni cvetovi su obeleženi plastičnim trakama pri čemu je određena boja trake reprezentovala polen poreklom od različitog muškog roditelja.

Berba nezrelih plodova se odvijala u rasponu od 90-120 dana nakon ručne polinacije. Plodovi su sterilisani u 20% (v/v) varikini (5.25% NaOCl) 30 minuta. Zatim su otvoreni u aseptičnim uslovima tako što je hirurškim nožem napravljen dubok (1-2 cm) ekvatorijalni rez a polulopte plodova su razdvojene okretanjem, jedne u odnosu na drugu, u suprotnom smeru. Izvađena semena su svrstana u tri kategorije (I, II, III) na osnovu veličine i razvijenosti endosperma u njima. Svaka kategorija je potom dalje razvrstana u dve podkategorije (a i b) na osnovu odsustva/prisustva embriona u semenu:

Ia) mala semena bez embriona i sa nepostojećim endospermom;

Ib) mala semena sa embrionom i sa nepostojećim endospermom;

IIa) srednja semena bez embriona i sa ostacima endosperma u čvrstoj ili tečnoj formi;

IIb) srednja semena sa embrionom i sa ostacima endosperma u čvrstoj ili tečnoj formi;

IIIa) srednja semena bez embriona i sa normalno razvijenim endospermom;

IIIb) velika semena sa embrionom i sa normalno razvijenim endospermom.

Za svako ukrštanje su u toku dve uzastopne godine utvrđeni sledeći parametri: ukupan broj ubranih plodova, broj semena po plodu kao i njihova veličina ($I \leq 5$ mm, $II = 5-10$ mm i $III \geq 10$ mm), broj semena sa/bez embriona (a i b) i razvojna faza embriona (A, B, i C).

3.2.4. Kultura (“spašavanje”) zigotskih embriona

Kultura (“spašavanje”) embriona je poznata pod imenom “embryo rescue“. Iz ekstrahovanih semena su u aseptičnim uslovima vrlo pažljivo, korišćenjem hirurškog skalpela i mikropincete, izvađeni zigotski embrioni koji su svrstani u tri kategorije na osnovu svoje razvojne faze:

A) globularna/srcasta/rana kotiledonarna faza

B) faza nezrelih embriona sa kotiledonima

C) faza zrelih embriona

Izolovani zigotski embrioni su odmah stavljeni na agarnu hranljivu podlogu u cilju indukcije klijanja. Embrioni su gajeni na dve različite indukcione hranljive podloge - 0.15 M EME (sa 50 g/l saharoze) i 0.15 M EME-malt (sa 50 g/l maltoze) koje predstavljaju modifikovanu osnovnu EME hranljivu podlogu (**Tabela 1**). Pored hranljivih podloga, praćen je i efekat gajenja izolovanih embriona na “vlažnom“ aceto-celuloznom filter papiru (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) postavljenog preko površine hranljive podloge. “Vlažni“ aceto-celulozni filter papir je pre postavljanja na čvrstu hranljivu podlogu natopljen sa 5-10 kapi tečne podloge istog hemijskog sastava. Testiranje efikasnosti klijanja na ova četiri tretmana (dve hranljive podloge sa ili bez aceto-celuloznog filter papira) je obavljeno samo sa zigotskim embrionima proisteklim iz eksperimenata seksualnog ukrštanja tokom 2011 godine.

Zigotski embrioni su po 1-3 meseca posle klijanja dalje gajeni na EME 1500 hranljivoj podlozi radi njihovog daljeg sazrevanja i/ili na B + hranljivoj podlozi radi njihovog izduživanja. Potpuno razvijene biljčice (0.5-2 cm) i/ili izdanci bez korena su dalje se razvijali i ožiljavali na RMAN hranljivoj podlozi u Magenta kutijama.

3.2.5. Utvrđivanje nivoa ploidnosti seksualnih hibrida pomoću “flow” citometrije

Isključivanje biljčice dobijene spašavanjem zigotskih embriona su još u toku *in vitro* faze gajenja testirane pomoću “flow” citometrije. Priprema biljnog materijala kao i metoda za utvrđivanje nivoa ploidnosti je urađena na isti način kao što je detaljno opisano u **Poglavlju 3.1.8.1.**

3.2.6. Mikro-kalemljenje seksualnih hibrida na komercijalnu biljnu podlogu i njihovo gajenje u stakleniku

Nakon identifikacije nivoa ploidnosti seksualnih hibrida, pristupilo se njihovom kalemljenju na iste trolisne podloge i na isti način kao kao što su kalemljeni somatski hibridi (**Poglavlje 3.1.7**). Nakon aklimatizacije na uslove u stakleniku i regularnog tretiranja sa đubrivom, herbicidima i insekticidima, nakalemljene triploidne biljke su zasađene na parcelu u okviru istraživačkog centra CREC u Lake Alfred, Florida na kojoj se testira skraćanje juvenilne faze i vrši brza evaluacija kvaliteta ploda citrusa tzv. Rapid Evaluation System (RES). Na ovoj parceli se mlade biljke sade pojedinačno ali gusto zbijene jedna uz drugu. Stalnim potkresivanjem njihovih bočnih grana i bodlji biljke se stimulišu da imaju samo jedno, tanko negranajuće stablo koje brzo raste u visinu. U trenutku kad ovo stablo dosegne 3 m vrh biljke se savije preko žice (postavljene na toj visini između dva stuba) i tako se stablo tera da raste na dole. Ovako gajene biljke cvetaju već u toku prve tri godine života (najranije posle 11 meseci).

3.3. Kratki opis kultivara/selekcija/hibrida korišćenih za oplemenjivanje mandarina

3.3.1. Diploidni roditelji

Ponkan pripada grupi običnih mandarina (*C. reticulata* Blanco). Klimatski najbolje uspeva u tropima gde plod postiže maksimalnu veličinu i kvalitet pa u tim oblastima nema konkurenciju drugih mandarina. Plod je veliki (~8 cm u prečniku), jako sočan i visokog kvaliteta: slatkog ukusa sa niskim nivoom kiselosti i sa vrlo malo semena (**Slika 4.a**). Jedna je od najlakših mandarina za ljuštenje, pri čemu se segmenti ploda lako odvajaju jedni od drugih. Sazreva u sredini sezone [novembar - januar] i ukoliko se

tada ne ubere brzo gubi kvalitet i omekšava tj. kora se odvaja od segmenata i unutrašnjost počinje da truli. Koristi se u prehrambenoj/farmaceutskoj industriji i kao ornamentalna biljka (Saunt 2000).

Changsha pripada grupi običnih mandarina (*C. reticulata* Blanco). Drvo je vrlo otporno na niske temperature (može da preživi i do -15°C). Plod je mali, sa korom divne narandžasto-crvene boje koja se jako lako ljušti (**Slika 4.b**). Visokog je kvaliteta: sočan i slatkog ukusa ali sa dosta semena. Sazreva u sredini sezone [novembar - januar] i ukoliko se tada ne ubere brzo gubi kvalitet i omekšava. Koristi se u citrus industriji i kao ornamentalna biljka (Saunt 2000).

Dancy pripada grupi običnih mandarina (*C. reticulata* Blanco). Ovaj kultivar je glavni u grupi tangerina što nije filogenetska grupa već samo kovanica za mandarine sa izraženom narandžasto-crvenom bojom kore. Gaji se skoro jedino u SAD - najviše na Floridi, a malo manje u Kaliforniji i Arizoni. Plod je srednje veličine sa korom divne narandžasto-crvene boje koja se jako lako ljušti (**Slika 4.c**). Izuzetno je visokog kvaliteta: sočan i slatkog, bogatog osvežavajućeg ukusa ali sa dosta semena (> 6). Sazreva u sredini sezone [novembar - januar] i tradicionalno se puno kupuje za Božić. Ukoliko se ne ubere odmah po sazrevanju, brzo gubi kvalitet i omekšava. Drvo poseduje izvesnu otpornost na niske temperature ali plod ne (zbog izuzetno tanke kore) (Saunt 2000). Generalno je otporan na bolesti. Osetljiv je na insekta "chaff scale" (*Parlatoria pergandii*) i na gljivu *Alternaria alternata* koja izaziva bolest "alternaria brown spot". Osetljivost na gljivu *Alternaria* se kao dominantna osobina prenosi na potomstvo pa je stoga lako dobijaju i 'Orlando', 'Minneola', 'Osceola', 'Lee', 'Robinson', 'Nova' i 'LB8-9', 'Fortune' (Kohmoto *et al.* 1991). Obe bolesti čine plod nepogodnim za tržište zbog indukovanih lezija i oštećenja.

Clementine pripada grupi običnih mandarina (*C. reticulata* Blanco). Ovaj kultivar je 50-ih god 20. veka postao najpopularnija i najrasprostranjenija mandarina mediteranske oblasti (specijalno Maroka i Španije). U mediteranskoj oblasti je plod mali sa glatkom korom divne narandžasto-crvene boje koja se jako lako ljušti. Izuzetno je visokog kvaliteta: sočan i slatkog (pomalo kiselkastog), aromatičnog osvežavajućeg ukusa ali sa dosta semena. Međutim, u Španiji se gaje bezsemeni plodovi tako što se drveće drži fizički izolovano od drugih citrusa te ne dolazi do fertilizacije ovula (zbog nemogućnosti samooprašivanja). A zahvaljujući partenokarpiji, plod se razvija i bez

seksualne oplodnje. Ukoliko se oplodnja (vetrom, pčelama i dr.) ipak desi, u plodu se razvije veliki broj semena što značajno smanjuje tržišnu vrednost. U SAD gde ima puno različitih citrusa teško je fizički izolovati i gajiti samo 'Clementine' mandarinu pa se ovaj kultivar pretežno uvozi iz Španije. Drugo, kvalitet ploda u mnogome zavisi od klime. Plod najbolje uspeva u Španiji jer mu pogoduju topli dani ali hladnije noći. Zato na Floridi gde noći nisu hladne plodovi 'Clementine' izgledaju veliki, omekšavaju i ne mogu da razviju lepu tamnu boju. U Kaliforniji, zbog hladnije klime u odnosu na floridsku, plod uspeva bolje i donekle može da bude konkurentan proizvodu gajenom u Španiji. Sazreva na početku sezone u toku dva meseca [novembar/decembar] samo malo kasnije od 'Satsuma' mandarine; znači za sazrevanje ploda je potreban jako nizak nivo ukupne količine toplote (Hodgson 1967). Međutim, razvoj novih subkultivara putem indukovanih mutacija je proširio ovaj period na mnogo više meseci [sredina oktobra – sredina februara]. Kasno sazrevajući hibrid 'Clementine' mandarine koji se zove 'Fortune' je doprineo da se sezona sazrevanja razvuče čak do sredine aprila u Španiji (Saunt 2000). Vrlo je otporna na gljivu *Alternaria alternata* (Kohmoto *et al.* 1991) pa je na osnovu toga u južnoj Africi već razvijen program oplemenjivanja u kome je 'Clementine' mandarina korišćena u seksualnoj hibridizaciji (Schutte 1993). Najvažniji floridski hibridi ove mandarine ukrštene sa polenom 'Orlando' tangela 1959 su: 'Robinson', 'Osceola' i 'Lee'. Zadnja dva se više ne uzgajaju već se samo koriste u oplemenjivanju.

Marisol Plod (**Slika 4.d**) sazreva početkom oktobra i u ranom novembru što znači u isto vreme kad i najranija mandarina 'Owari Satsuma'. Kad se pojavi u prodavnicama označava "prvi znak jeseni" (Hodgson, 1967; Internet stranica University of California Riverside).

Nules Kultivar je izuzetno popularan u Španiji jer je plod najsladi i najlepšeg ukusa među 'Clementine' mandarinama (**Slika 4.e**). Sazreva krajem novembra. Najznačajnija karakteristika mu je dugačak period za berbu posle sazrevanja (sve do januara) jer plod dugo zadržava dobar kvalitet. Takođe, u toku godine drvo može da cveta i do tri puta (Hodgson 1967).

Monreal Obzirom da je samooprašiv, ovaj kultivar uvek daje plodove sa jako puno semena (<20). Po pravilu, plodovi sa jako puno semena su veći i sladi u odnosu na bezsemene selekcije pa tako ovaj kultivar ima plodove koji su

najsladi u celoj familiji mandarina a usput se i najlakše ljušte (**Slika 4.f**) (Hodgson 1967; Internet stranica University of California Riverside).

Fortune je hibrid dve obične mandarine: Clementine (*C. reticulata* Blanco) × Dancy (*C. reticulata* Blanco). Ovo je monoembriogen kultivar. Plod ima divnu narandžasto-crvenu boju kore koja čvrsto prijanja za srž ali se jako lako ljušti (**Slika 4.g**). Ima dosta semena. Ako se pusti da dobro sazri na drvetu ima sladak, bogat i osvežavajući ukus sa dobrim balansom između šećera i kiselosti. Naime, nivo kiselosti u plodu u vreme sazrevanja je dosta visok pa je branje u Španiji maksimalno odloženo sve dok ovaj nivo ne padne na željeni. Međutim, na drugim lokacijama Fortune nije toliko kvalitetan kultivar zbog drugačijih klimatskih uslova i nemogućnosti da se čeka da nivo kiselosti padne na željeni nivo (u Kaliforniji, Izraelu i Svazilendu, sa odlaganjem branja plod brzo omekšava, mnogo pre nego što kiselost padne na željeni nivo). Sazreva vrlo kasno [mart-april] skoro 12 meseci nakon cvetanja zbog čega uvek postoji negativan uticaj niskih temperatura i sunca na izgled kore (Hodgson 1967; Saunt 2000). Od ‘Clementine’ mandarine je nasledio monoembriogenost i nemogućnost samooprašivanja.

Satsuma mandarine zbog svojih specifičnih karakteristika pripadaju posebnoj vrsti *C. unshiu* Marcovitch. Odraslo drvo je jako otporno na niske temperature. Može da preživi i nekoliko dana izlaganja $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ (od jestivih citrusa samo je još kumkvat otporniji na niske temperature). Druga pozitivna osobina zrelog drveta je da nema trnje (Hodgson 1967). Kao i u slučaju ‘Clementine’ mandarine, za dobar kvalitet ploda (slatkoću) su potrebni topli dani ali hladnije noći. Plod je srednje veličine sa korom pomorandžaste boje koja se jako lako ljušti (**Slika 4.h**). Izuzetno je visokog kvaliteta: sočan i slatkog, bogatog, osvežavajućeg ukusa i bez semena (što je posledica postojanja muške (σ) sterilnosti). Plod ima konstantno dobar kvalitet samo u predelima sa hladnim zimama i toplim letima (Španija, Japan, Južna Koreja, Kalifornija, Argentina, J. Afrika). U vlažnim subtropskim predelima srž sazri mnogo pre razvijanja lepe pomorandžaste boje kore pa ako se takva pojavi na tržištu zove se ‘Emerald Green Satsuma’ (Internet stranica University of Florida). Osetljive su na gljivu “scab“ (*Elsinoe fawcetti*) koja izaziva stvaranje bradavičastih lezija na listovima, grančicama i plodovima bez efekta na unutrašnji kvalitet ploda (Internet stranica University of Florida). Rano sazreva: subkultivari ‘Wase’, ‘Miyagava’, ‘Okitsu’, ‘Seto’, ‘Miho’ početkom septembra/oktobra

a ‘Owari’ sredinom novembra. Dakle, za sazrevanje ploda je potreban jako nizak nivo ukupne količine toplote (Hodgson 1967).

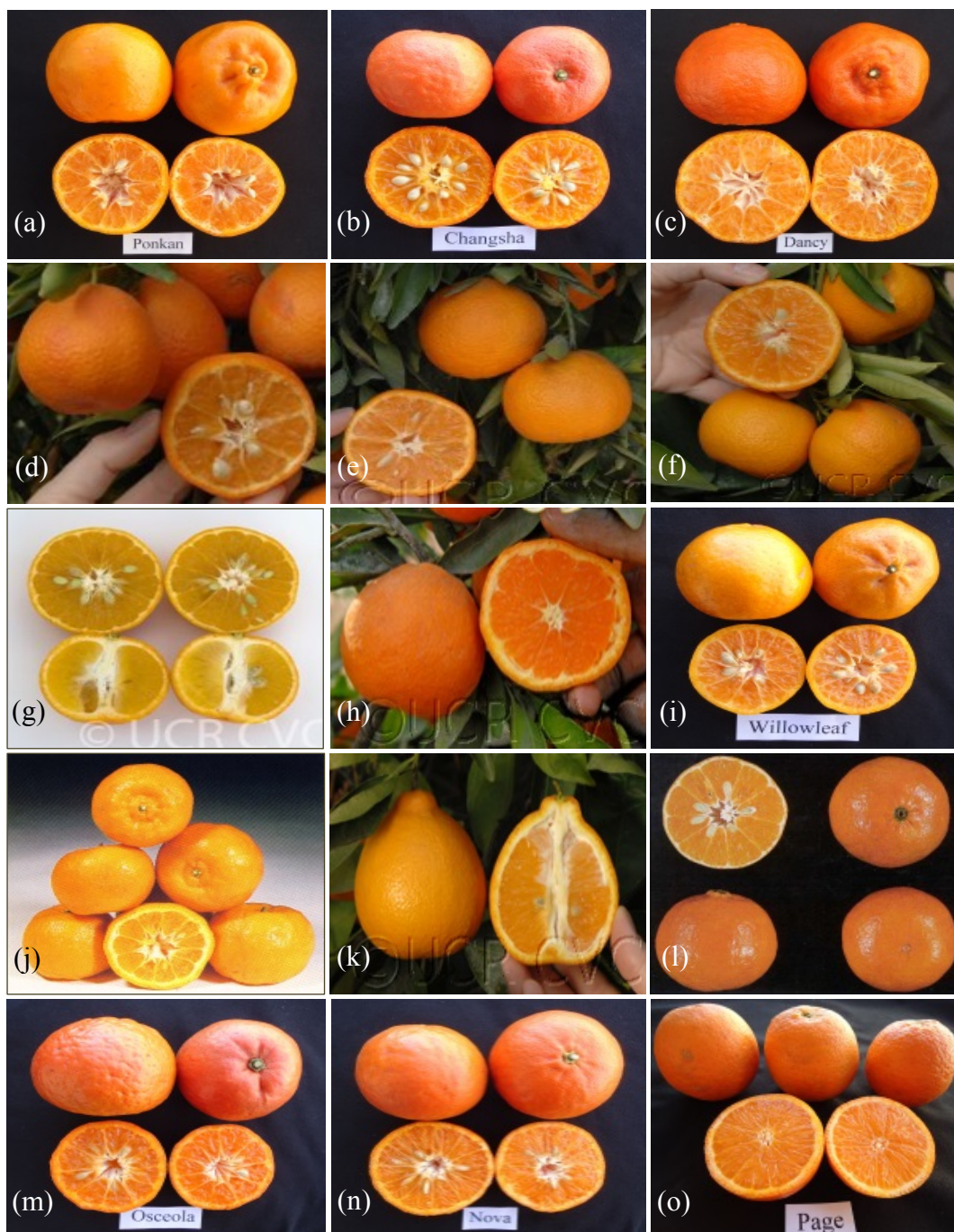
Willowleaf zbog svojih specifičnih karakteristika pripada posebnoj vrsti - Mediteranskoj mandarinu (*C. deliciosa* Tenore). Ima sledeće karakteristike:

- izgled drveta tj. grana koje se značajno savijaju ka zemlji;
- morfologija lista - mali, kopljasti, uzani;
- specifičan miris lista – što potiče od velike količine eteričnih ulja;
- specifičan miris ploda - što potiče od velike količine eteričnih ulja u kori;
- ukus soka - blag, aromatičan i vrlo prijatan;
- sferični izgled semena i visok nivo poliembriionije u njima (Hodgson 1967).

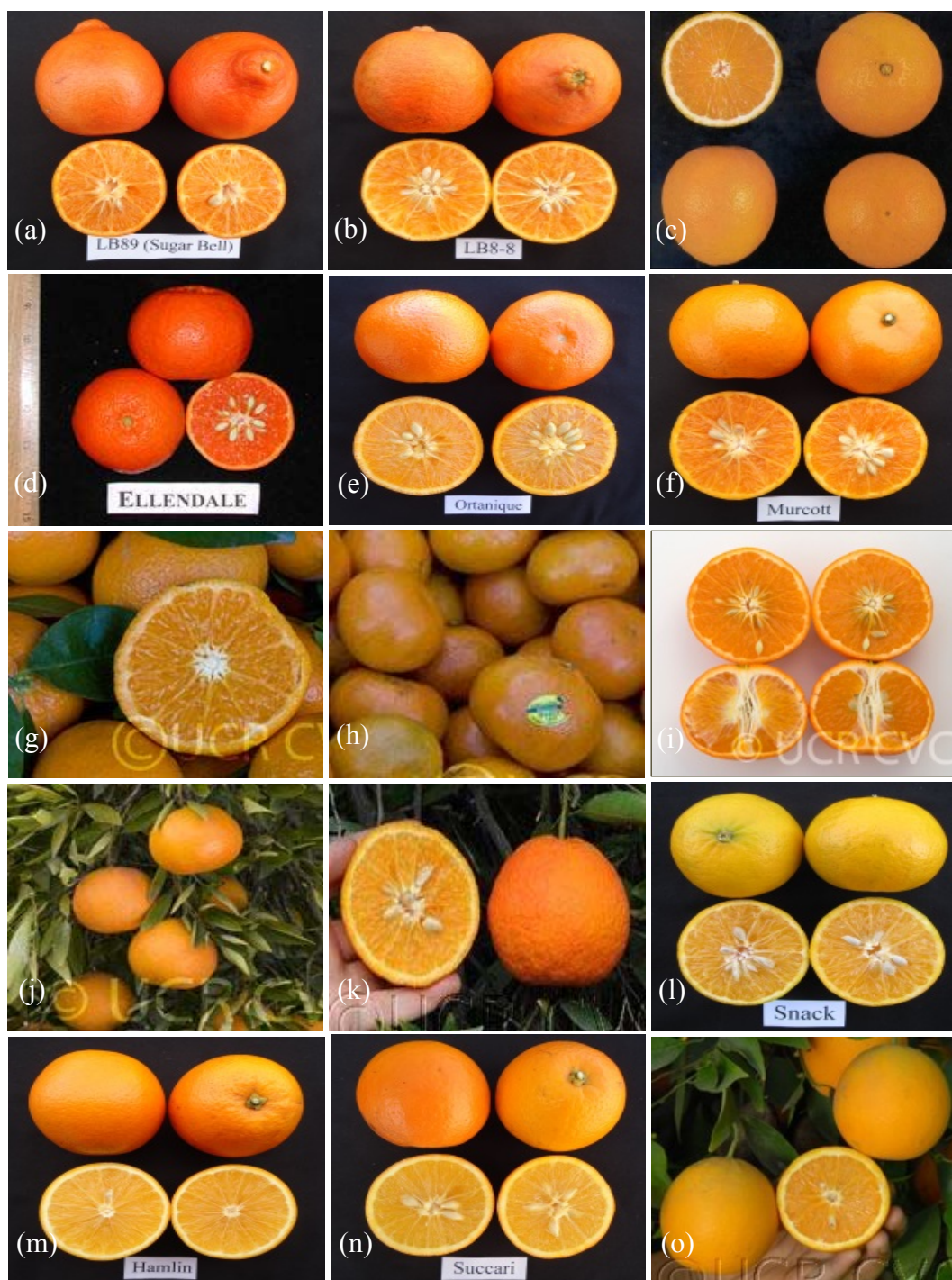
Ovaj kultivar je dobro adaptiran na toplu/suvu klimu. Plod je mali i lako se ljušti (**Slika 4.i**). Narandžasta srž ploda je jako sočna, slatkog, vrlo prijatnog i specifičnog aromatičnog ukusa sa dosta semena (15-20). Sazreva u sredini sezone (decembar, januar) pa je omiljena na Božićnoj trpezi u Evropi. Ukoliko plodovi ostanu duže na grani posle sazrevanja brzo omekšavaju i brzo gube sočnost/kiselost tj. menjaju ukus (Saunt 1990). Otporan je na na gljivu “scab“ (*Elsinoe fawcetti*). Relativno je otporan na niske temperature.

Kinnow je hibrid između tangora i vrste mandarine: ‘King’ tangor (*C. nobilis* Lour.) x ‘Willowleaf’ mandarina (*C. deliciosa* Tenore). Plod je bogatog, ekstremno slatkog, specifično aromatičnog ukusa sa korom koja se relativno lako ljušti (**Slika 4.j**). Ima puno semena. Sazreva u sredini sezone (decembar, januar) a plodovi se dobro drže na drvetu i nakon sazrevanja (Hodgson 1967).

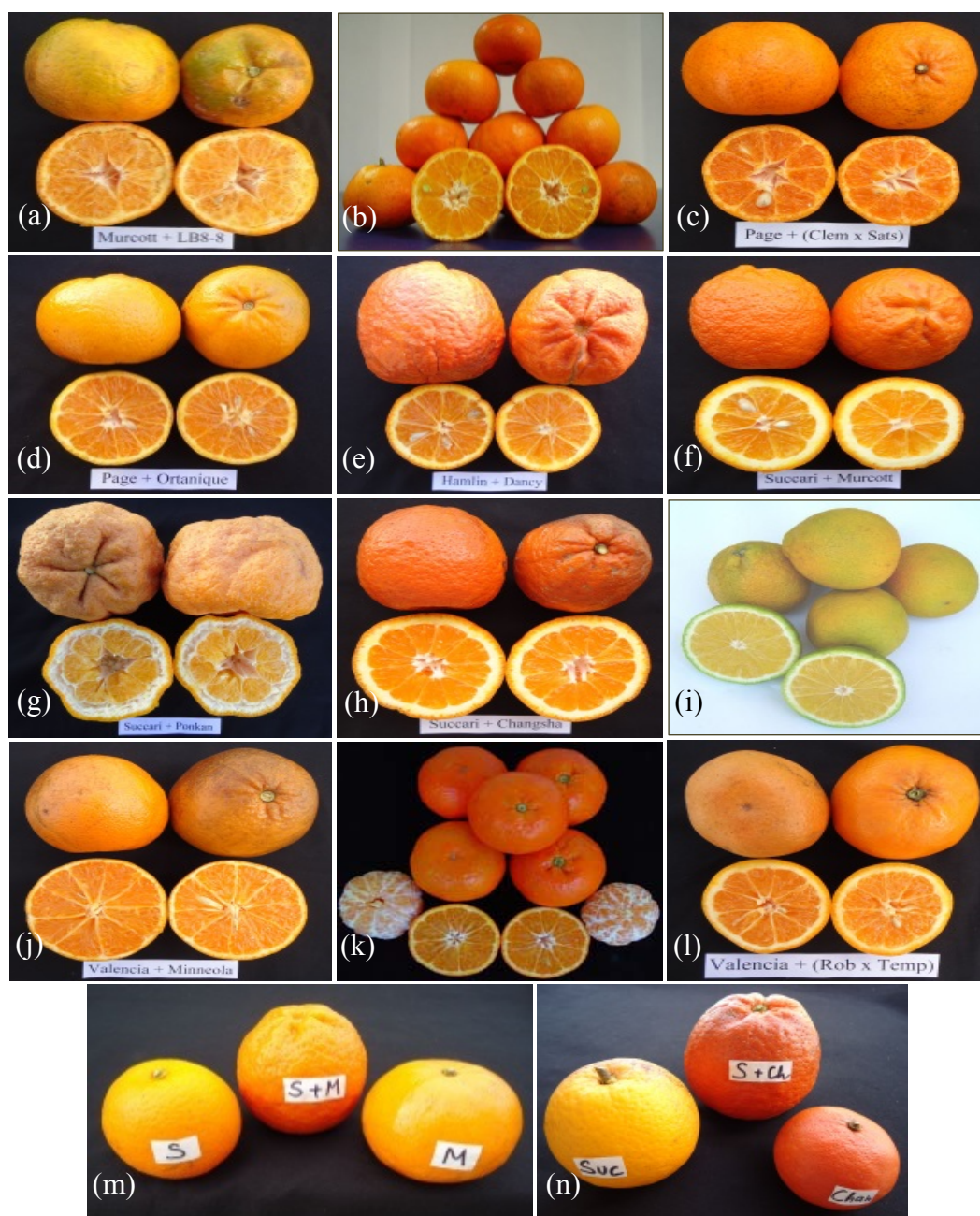
Minneola je tangelo tj. hibrid između grejpfruta i mandarine: ‘Duncan’ grapefruit (*C. paradisi* Macf.) × ‘Dancy’ mandarina (*C. reticulata* Blanco). Plod je veliki, atraktivne tamno pomorandžaste boje, izuzetno bogatog ukusa (što je nasleđeno od Dancy) pri čemu ipak malo gorči (što je nasleđeno od grejpfruta) sa malo semena (<10, bezsemena u odsustvu polinatora) i relativno lako se ljušti (**Slika 4.k**). Jako je popularan na Floridi ali nema veći komercijalni značaj. Prepoznatljiv je po specifičnom izgledu izraženog ”vrata”. Sazreva u sredini sezone (decembar, januar) a ponekad i kasnije u februaru. Obzirom da se plodovi dobro drže na drvetu beru se što kasnije da bi se dosegao željeni nivo između šećera i kiselosti (Saunt 1990). Osetljiv je na gljivu “scab“ (*Elsinoe fawcetti*).



Slika 4. Plodovi kultivara korišćenih za genetičko oplemenjivanje mandarina. **(a)** 'Ponkan' mandarina. **(b)** 'Changsha' mandarine. **(c)** 'Dancy' mandarina. **(d)** 'Marisol Clementine' mandarina. **(e)** 'Nules Clementine' mandarine. **(f)** 'Monreal Clementine' mandarina. **(g)** 'Fortune' hibrid mandarine. **(h)** 'Satsuma' mandarina. **(i)** 'Willowleaf' mandarina. **(j)** 'Kinnow' hibrid mandarine. **(k)** 'Minneola' tangelo. **(l)** 'Lee' tangelo. **(m)** 'Osceola' tangelo. **(n)** 'Nova' tangelo. **(o)** 'Page' tangelo. Izvori slika: (d,e,f,g,h,k) Internet stranica University of California Riverside; (j) Saunt, 1990; (l) Internet stranica University of Florida.



Slika 5. Plodovi kultivara korišćenih za genetičko oplemenjivanje mandarina. **(a)** ‘Sugar Belle’ tangelo. **(b)** ‘LB8-8’ tangelo. **(c)** ‘Ambersweet’ tangor. **(d)** ‘Ellendale’ tangor. **(e)** ‘Ortanique’ tangor. **(f)** ‘Murcott’ tangor. **(g,h)** ‘W.Murcott’ tangor. **(i,j)** ‘Fallglo’ tangelo-tangor. **(k)** ‘Temple’ tangor. **(l)** ‘Snack’ tangor. **(m)** ‘Hamlin’ slatka pomorandža. **(n)** ‘Succari’ slatka pomorandža. **(o)** ‘RhodeRed Valencia’ slatka pomorandža. Izvori slika: (d,g,h,i,j,k,o) Internet stranica University of California Riverside; (c) Internet stranica University of Florida.



Slika 6. Plodovi somatskih hibrida korišćenih za genetičko oplemenjivanje mandarina. **(a)** Murcott + LB8-8. **(b)** Nova + Osceola. **(c)** Page + (Clementine × Satsuma). **(d)** Page + Ortanique. **(e)** Hamlin + Dancy. **(f)** Succari + Murcott. **(g)** Succari + Ponkan. **(h)** Succari + Changsha. **(i)** Succari + Page. **(j)** Valencia + Minneola. **(k)** RhodeRed Valencia + Dancy. **(l)** Valencia + (Robinson × Temple). **(m)** Succari + Murcott u sredini slike sa svojim roditeljima postavljenim na levoj i desnoj strani. **(n)** Succari + Changsha u sredini slike sa svojim roditeljima postavljenim na levoj i desnoj strani. Izvor slika: (b,i,k) Privatna kolekcija slika JW Grosser.

Lee je hibrid između obične mandarine i tangela: 'Clementine' mandarina (*C. reticulata* Blanco) × 'Orlando' tangelo (*C. reticulata* Blanco × *C. paradisi* Macf.]. Plod je sličan 'Orlando' roditelju - srednje veličine ali kora postiže mnogo tamniju boju pri sazrevanju (**Slika 4.1**). Kora tesno prijanja uz srž ali se lako ljušti. Slatkog je i ne tako bogatog ukusa (kao npr Nova koja sazreva u isto vreme) i sa puno semena (~20). Sazreva u ranoj sredini sezone (oktobar-novembar-decembar) nešto pre muškog roditelja. Gaji se samo na Floridi (Saunt 1990).

Osceola je hibrid između obične mandarine i tangela: 'Clementine' mandarina (*C. reticulata* Blanco) × 'Orlando' tangelo (*C. reticulata* Blanco × *C. paradisi* Macf.]. Postiže pri sazrevanju izuzetno lepu tamno narandžastu/koralno-crvenu boju (slično ženskom roditelju) ali brzo omekšava i gubi kvalitet (**Slika 4.m**). Lako se ljušti. Sok ima visok nivo šećera ali u isto vreme i visoku kiselost pa je za mnoge nedopadljivog ukusa. Takođe, aromatična ulja u kori su po mnogima nedopadljivog i čudnog ukusa. Sazreva u ranoj sredini sezone (oktobar-novembar-decembar) nešto pre 'Orlando' roditelja. Drvo je bez trnja i donekle otporno na niske temperature (Saunt 1990).

Nova je hibrid između obične mandarine i tangela: 'Fina Clementine' mandarina (*C. reticulata* Blanco) × 'Orlando' tangelo (*C. reticulata* Blanco × *C. paradisi* Macf.]. Plod je srednje veličine kao 'Orlando' ali je izuzetno visokog kvaliteta kao 'Clementine': tamno-narandžaste boje, sočan, slatkog ukusa, lako se i lepo ljušti (srž ostaje bez trunke albeda) (**Slika 4.n**). Kao i kod 'Clementine' mandarine, nema samooprašivanja pa ukoliko se drži izolovana od drugih kultivara rađa bezsemene plodove. Međutim, ukoliko se oprašuje sa drugim kultivarima plodovi imaju jako puno semena. Na Floridi rano sazreva [oktobar-novembar] malo pre 'Orlando' tangela zbog čega je i potisnula ovaj roditeljski kultivar sa polja. U Španiji (gde se zove 'Clemenville') sazreva u međusezoni (od decembra na dalje), kasnije od 'Clementine' mandarine (Saunt 1990).

Page je hibrid između tangela i mandarine: 'Minneola' tangelo (*C. paradisi* Macf. × *C. reticulata* Blanco) × 'Clementine' mandarina (*C. reticulata* Blanco) – znači da je $\frac{3}{4}$ mandarina and $\frac{1}{4}$ grejpfrut. Zbog izuzetnog kvaliteta ploda (tamno-narandžasta boja ploda, sladak i vrlo bogat ukus soka, lako ljuštenje kore), kao i nepostojanje trnja na drvetu i duge sezone rađanja pogodan je za gajenje u dvorištima i voćnjacima. Jedina mana su mu mali plodovi u aridnim uslovima (u vlažnim postiže srednju veličinu pa se i preporučuje njegovo gajenje u floridskim uslovima) i veliki broj semena (~12) (**Slika**

4.o). Sazreva u sredini sezone [novembar–decembar-januar] pri čemu plodovi dugo ostaju na drvetu bez omekšavanja i gubljenja kvaliteta (Saunt 1990).

Sugar Belle (LB8-9) je hibrid između mandarine i tangela: ‘Clementine’ mandarina (*C. reticulata* Blanco) × ‘Minneola’ tangelo (*C. paradisi* Macf. × *C. reticulata* Blanco) - znači da je $\frac{3}{4}$ mandarina i $\frac{1}{4}$ grejpfrut. Od roditelja ‘Clementine’ je nasledio monoembriogenost i nemogućnost samooprašivanja. Pušten je u masovno gajenje 2009. Ima atraktivan izgleda ploda (koji po obliku potseća na plod ‘Minneola’ tangela ali je lepše tamno-narandžaste boje) i izuzetno dobrog osvežavajućeg slatko-kiselkastog ukusa sa visokim nivoom oba parametra (šećera i kiselosti) (**Slika 5.a**). Takođe, sok ima divnu aromu. Sazreva u sredini sezone ali 4-6 nedelja pre muškog roditelja, dakle na početku decembra što je važan period za Božićnu trpezu. Ima od 0-34 semena u zavisnosti od polinatora. Od ‘Clementine’ mandarine je nasledio toleranciju na gljivu *Alternaria alternata* (Internet stranica Florida Foundation Seed Producers, Inc.).

LB8-8 je hibrid između mandarine i tangela: ‘Clementine’ mandarina (*C. reticulata* Blanco) × ‘Minneola’ tangelo (*C. paradisi* Macf. x *C. reticulata* Blanco) – znači da je $\frac{3}{4}$ mandarina i $\frac{1}{4}$ grejpfrut. Od roditelja ‘Clementine’ je nasledio monoembriogenost i nemogućnost samooprašivanja. Oblik i lepa boja ploda potsećaju na plod ‘Minneola’ tangela. Plod je srednje veličine i sa dosta semena (**Slika 5.b**). Sazreva u sredini sezone. Sok je tada izuzetno sladak ali na žalost gotovo da nema nikakvu kiselost. Ovo nije dobro za kvalitet soka ali jeste, s druge strane, dobro za njegovo korišćenje u oplemenjivanju citrusa gde je potrebno dobiti potomstvo sa smanjenom kiselošću ploda (personalna komunikacija sa JW Grosser).

Ambersweet je kompleksni hibrid između (‘Clementine’ mandarina × ‘Orlando’ tangelo) hibrida i ‘Sweet’ slatke pomorandže (koja sazreva u sredini sezone) – znači da je $\frac{1}{2}$ pomorandža + $\frac{3}{8}$ mandarina + $\frac{1}{8}$ grejpfrut. Botanički se svrstava u grupu koja se zove tangor gde se nalaze mandarina × pomorandža hibridi. Po prirodi je monoembriogen i bez mogućnosti samooprašivanja. Sazreva na početku sezone (oktobar) a može da se bere sve do decembra. U poređenju sa drugim “ranim” pomorandžama, npr. Hamlin, plod ima zadovoljavajuću boju i dobar ukus soka koji podseća na Clementine (**Slika 5.c**). Velika prednost ovog hibrida je što je tolerantan na niske temperature kao i hibridi ‘Fallglo’, ‘Robinson’ i ‘Sunburst’. Još jedna prednost ploda je što se relativno lako ljušti. Takođe, kada je samooprašujući gotovo da nema

semena (usled postojanja nemogućnosti samooprašivanja) ali u prisustvu drugog oprašivača broj ide i do 30 semena po plodu (Internet stranica University of Florida; Saunt 1990).

Ambersweet Zigotski (monoembriogeni) Hibrid Proizveden putem selekcije biljaka isključivih iz semena. Ova semena su nastala iz ukrštanja ‘Ambersweet’ hibrida mandarine sa nepoznatim oprašivačem. Ova selekcija je po prirodi monoembriogena i bez mogućnosti samooprašivanja kao i ženski roditelj (personalna komunikacija sa JW Grosser).

Ellendale (*C. reticulata* Blanco × *C. sinensis* Osbeck) je australijski monoembriogeni kultivar nepoznatog porekla. Pretpostavlja se da je prirodan tangor zbog veličine ploda koji potseća na pomorandžu i zbog mnogih “mandarinskih” karakteristika. Jako je sličan kultivaru ‘Temple’ tangor (koji je takođe monoembriogen). Veoma je popularan u Australiji zbog veličine ploda, lakog ljuštenja, atraktivne tamno-narandžaste boje, slatkog soka sa bogatim ukusom i prijatne subkiselosti ali i zbog sposobnosti da dugo zadrži dobar kvalitet na policama prodavnica (**Slika 5.d**). Na drvetu brzo gubi kvalitet nakon sazrevanja. Plodovi su bezsemeni (usled postojanja nemogućnosti samooprašivanja) a u slučaju oprašivanja s drugim polinatorom ima jako puno semena. Drvo ovog kultivara je otporno na niske temperature a plodovi sazrevaju u kasnoj sezoni što predstavlja veliku prednost [januar-mart] (Internet stranica University of California Riverside).

Ortanique (*C. reticulata* Blanco × *C. sinensis* Osbeck) je tangor tj. hibrid između pomorandže i mandarine. Otuda i njegovo sintetičko ime (OR=orange TAN=tangerine IQUE=unique). Prirodni je hibrid nepoznatog porekla. Tekstura kore, izgled i kvalitet ploda u mnogome zavise od podneblja gde je drvo gajeno. Tako na Jamajci u tropskim uslovima plod ima glatku i tanku koru svetlo narandžaste boje sa izraženim vratom (kao kod ‘Dancy’ i ‘Ponkan’ mandarina) i kruškastog je oblika dok u semi-tropskim (Florida) i mediteranskim uslovima ima rapavu i debelu koru tamno narandžaste boje i bez vrata a mnogo je sferičnijeg oblika (**Slika 5.e**). I semenost zavisi od mesta gajenja – na Jamajci su plodovi gotovo bezsemeni dok u mediteranskoj klimi broj semena ide i do 10. Kora jako prijanja za srž i inicijalno se teško ljušti ali po otpočinjanju ljuštenje ide mnogo lakše. Sok je izuzetno sladak sa dobrim balansom šećera i kiselosti; bogatog je, snažnog i specifičnog ukusa. Izuzetno je lepe boje, specijalno na mestu postanka (Jamajka).

Sazreva u kasnoj sezoni što je prednost [februar-mart] u isto vreme kad i ‘Valencia’ pomorandža. Plodovi ostaju dugo dobri na drvetu (kroz ceo april) i nakon sazrevanja bez omekšavanja i gubljenja kvaliteta. Plod takođe dugo zadržava svoje dobre kvalitete i na policama prodavnica (Saunt 1990).

Murcott (*C. reticulata* Blanco × *C. sinensis* Osbeck) je tangor tj. hibrid između pomorandže i mandarine. Na Floridi i u Brazilu je omiljen kultivar (bez obzira na visoki broj semena u plodu 18-24) zbog divne pomorandžaste boje ploda/soka i zbog svog izuzetno slatkog, bogatog i specifičnog ukusa (**Slika 5.f**). Ekstremno tanka kora prijanja tesno uz srž zbog čega se ljušti kao i ostali hibridi mandarine - ne baš tako lako. Međutim, jednom oljuštena ostavlja srž potpuno slobodnu od albeda. Sazreva u kasnoj sezoni što je prednost [januar-februar] pa sve više postaje popularna u predelima u kojima ne može da uspeva ‘Clementine’ mandarina (Australija, Izrael, Kina). Drvo je relativno tolerantno na niske temperature. Plodovi zadržavaju dobar kvalitet - ne omekšavaju na drvetu i nakon sazrevanja a zadržavaju svoje dobre kvalitete i na policama prodavnica. ‘Murcott’ se proizvodi u značajnim količinama na Floridi za tržište svežeg voća obzirom da se u odnosu na ostale semene komercijalne kultivare javlja poslednji u sezoni sazrevanja mandarina. Osetljiv je na gljivu “scab“ (*Elsinoe fawcetti*) (Saunt 1990).

W.Murcott (*C. reticulata* Blanco × *C. sinensis* Osbeck) je tangor tj. hibrid između pomorandže i mandarine. Ima sledeće prednosti u odnosu na svog roditelja ‘Murcott’ tangora: plod je bezsemen (u odsustvu polinatora jer je verovatno od Clementine nasledio nemogućnost samooprašivanja), tamniju pomorandžastu boju i koru koja se lako ljušti (**Slike 5.g,h**). Sa druge strane, zadržane su sve druge odlične karakteristike svog roditelja među kojima je najvažniji sladak sok izuzetno bogatog ukusa. Sazreva u kasnoj sezoni što je prednost [januar-mart]. Plodovi ostaju dobri na drvetu i nakon sazrevanja (Internet stranica University of California Riverside).

Fallglo je kompleksni hibrid tangela i tangora: ‘Bower’ tangelo [‘Clementine’ mandarina (*C. reticulata* Blanco) × ‘Orlando’ tangelo (‘Dancy’ mandarina *C. paradisi* Macf. × ‘Duncan’ grejpfrut *C. reticulata* Blanco)] × ‘Temple’ tangor (*C. reticulata* Blanco × *C. sinensis* Osb.) – znači da je 1/4 pomorandža + 5/8 mandarina + 1/8 grejpfrut. Od roditelja ‘Temple’ je nasledio monoembriogenost i nemogućnost samooprašivanja. Za razliku od svog muškog roditelja, rezistentan je na gljivu “scab“

(*Elsinoe fawcetti*). S druge strane, osetljiv je na biljne vaši afide. Negativna osobina koju je nasledio od 'Temple' roditelja je osetljivost drveta na niske temperature. Drvo je bez trnja i sa vrlo čudnom osobinom (uzrok nepoznat) da se na pojedinim mestima krošnje suše grane i totalno odumiru. Plod po izgledu liči na mandarine (**Slike 5.i,j**). Ima lepu tamno-pomorandžastu boju sa glatkom, tankom korom koja se lako ljušti. Lepog je ukusa ali sa puno semena 20-40 . Na Floridi je ovo glavni "rani" kultivar koji se sreće u prodavnicama jer sazreva na početku sezone [septembar-novembar] pa se u toku velikog nacionalnog praznika Dana Zahvalnosti u novembru obavezno pronalazi na slavskim trpezama. Znači, za sazrevanje ploda je potreban jako nizak nivo ukupne količine toplote (Internet stranica University of Florida).

Furr je tangor tj. hibrid između mandarine i tangora: 'Clementine' mandarina (*C. reticulata* Blanco) × 'Murcott' tangor (*C. reticulata* Blanco × *C. sinensis* L. Osb.) Proizveden je ozračivanjem grana sa pupoljcima biljke pod šifrom C54-4-4 i njihovom sadnjom i selekcijom. Ono što razlikuje 'Furr' u odnosu na majku biljku i daje mu prednost jesu sledeće karakteristike:

- rezistentnost na gljivu "scab" (*Elsinoe fawcetti*);
- manje semena u plodu;
- viši °briks tj.. kvalitetniji sok;
- ranije sazrevanje plodova (u novembru) u odnosu na C54-4-4 koji sazerva u februaru (personalna komunikacija sa JW Grosser).

Temple (*C. reticulata* Blanco × *C. sinensis* Osbeck) je tangor tj. hibrid između pomorandže i mandarine. Zbog svog tropskog porekla, ovaj kultivar je jako osetljiv na niske temperature. Takođe, za postizanje dobrog kvaliteta ploda su mu neophodne visoke temperature. Za sazrevanje ploda mu je potreban i jako visok nivo ukupne količine toplote tako da sazreva kasno u sezoni [januar-april] (Internet stranica University of Florida). Zbog svega navedenog dobro uspeva na Floridi. Osetljiv je na gljivu "scab" (*Elsinoe fawcetti*). Plod ima lepu tamno-pomorandžastu boju sa rapavom, tankom korom koja se lako ljušti (**Slika 5.k**). Lepog je ukusa ali sa puno semena 15-20 (Saunt 1990).

Snack (*C. reticulata* Blanco × *C. sinensis* Osbeck) je tangor tj. hibrid između pomorandže i mandarine. Najvažnije dobre karakteristike: lep slatki ukus ploda i kora koja se lako ljušti bez obzira što tesno prijanja uz srž. Plodovi su srednje veličine (**Slika**

5.1) i sa puno semena 15-20. Sazreva na početku sezone [oktobar-novembar]. Pokazuje toleranciju na dve teške bolesti citrusa – “greening“ i “canker“ (personalna komunikacija sa JW Grosser).

Hamlin pripada grupi običnih slatkih pomorandži (*C sinensis* Osbeck). Gajenje je limitirano na Floridu i Brazil. Drvo je među pomorandžama jedno od najtolerantnijih na niske temperature. U sub-tropskim uslovima (visoke temperature i suše) Maroka i Turske, plodovi ostaju izuzetno male veličine (**Slika 5.m**), pa se zato i ne nude u supermarketima već se samo koriste za proizvodnju soka što predstavlja veliku štetu jer su plodovi slatkog ukusa i bezsemeni (posledica muške (♂) sterilnosti tj. nemogućnosti stvaranja polena) sa korom lepe tamno-narandžaste boje koja se relativno lako ljušti. U semi-tropskim uslovima (visoke temp i vlage) Brazila i Floride, skoro bezsemeni plodovi postižu zadovoljavajuću veličinu ali opet poseduju karakteristike koje i ovde limitiraju njihovu pojavu u supermarketima. To su: blede-narandžasta boja ploda, sok u kome preovlađuju lemonini i tanka kora koja se teže ljušti. Hamlin se i u semi-tropskim predelima, zbog svoje sočnosti i prijatnog ukusa, koristi u proizvodnji soka ali tako što se meša sa sokom pomorandži/mandarina koje imaju lepšu boju i slađi ukus. Najvažnija karakteristika ‘Hamlin’-a na Floridi je da prvi sazreva među pomorandžama (novembar-januar) pa je zato i omiljen kod uzgajivača citrusa jer nema bojazni od negativnog efekta niskih zimskih temperatura/mrazeva (Saunt 1990).

Succari pripada grupi šećernih/nekiselih slatkih pomorandži (*C sinensis* L. Osbeck).. Prednost mu je što rano sazreva u sezoni, u oktobru, i što po sazrevanju plodovi mogu dugo da ostanu na drvetu bez omekšavanja i gubitka kvaliteta (Saunt 1990). Plodovi imaju lepu narandžastu boju sa tankom korom koja tesno prijanja uz srž (**Slika 5.n**) i zbog toga se teško ljušti. Bez obzira na sočnost, ova pomorandža ima čudan (po mnogima neprijatan) ukus koji između ostalog dolazi i od atipičnog odnosa °briksa i nivoa kiselosti. Dok je kod većine slatkih pomorandži ovaj odnos 10/1 kod ‘Succari’ je on 10/0.1. Znači, nivo kiselosti kod ovog kultivara je samo 0.1% što nije dobro za kvalitet soka ali jeste, s druge strane, dobro za njegovo korišćenje u oplemenjivanju citrusa gde je potrebno dobiti potomstvo sa smanjenom kiselošću ploda. Još jedna njegova negativna karakteristika je da plodovi imaju dosta semena (Saunt 1990).

RhodeRed je selekcija kultivara ‘Valencia’ koji pripada grupi običnih slatkih pomorandži (*C sinensis* L. Osbeck). Ima iste vrednosti °briksa kao i ‘Valencia’ ali niži

nivo kiselosti i mnogo lepšu boju ploda/soka. Takođe, plod procentualno ima mnogo više soka. Kao i 'Valencia', sazreva najkasnije u grupi pomorandži (mart-jul) (Internet stranice University of California Riverside). Inače, 'Valencia' važi za najznačajniju pomorandžu koja se u odnosu na sve citruse najviše gaji u svetu. Plod, koji je lepe tamno-narandžaste boje (**Slika 5.o**), ima samo 2-4 semena (smatra se bezsemenim kao posledica muške (♂) sterilnosti tj. nemogućnosti stvaranja vijabilnog polena). Kora se lako ljušti a sok ima izuzetno prijatan i sladak ukus (Saunt 1990).

G96 je monoembriogeni kompleksni hibrid trifolijatne pomorandže (25%), mandarine i pamela. Ova selekcija još nije imenovana u kultivar niti je puštena u masovno gajenje ali se zbog svojih dobrih karakteristika već koristi u eksperimentima oplemenjivanja mandarina. Najvažnije dobre karakteristike su: lep slatki ukus ploda i kora koja se lako ljušti. Plodovi su srednje veličine i sa puno semena 15-20. Sazreva na početku sezone [oktobar-novembar]. Pokazuje toleranciju na tešku bolest citrusa – "greening" (personalna komunikacija sa JW Grosser).

3.3.2. Tetraploidni roditelji

Murcott + Ortanique (*C. reticulata* Blanco × *C. sinensis* Osbeck) + (*C. reticulata* Blanco × *C. sinensis* L. Osbeck) je somatski hibrid nastao fuzijom ćelija dva tangora (Grosser & Chandler 2004). Oba roditelja poseduju plod izuzetnog kvaliteta koji je lepe tamno-narandžaste boje i izuzetno slatkog, bogatog i specifičnog ukusa sa dobrim balansom šećera i kiselosti. Takođe, oba roditelja imaju prednost da sazrevaju kasno u sezoni (februar, mart) što znači da poseduju izvesnu otpornost na niske temperature. Nakon sazrevanja, plodovi dugo zadržavaju dobar kvalitet (ne omekšavaju) na drvetu a zadržavaju svoje dobre kvalitete i na policama prodavnica. Od ovog hibrida se očekuje da ima dobre karakteristike ploda, da sazreva kasno u sezoni i da je otporan na niske temperature.

Murcott + LB8-8 (**Slika 6.a**) (*C. reticulata* Blanco × *C. sinensis* L. Osb.) + [(*C. reticulata* Blanco) × (*C. paradisi* Macf. × *C. reticulata* Blanco)] je somatski hibrid nastao fuzijom ćelija tangora i tangela (Guo *et al.* 2004) od koga se očekuje da pored korišćenja u eksperimentima interploidnog ukrštanja bude i sam potencijalni kultivar sa izuzetno dobrim karakteristikama. Takođe se očekuje da sazreva u ranoj sezoni i da

poseduje izvesnu otpornost na niske temperature. Plod ima tamno-narandžastu boju, slatkog, bogatog i specifičnog ukusa je i lako se ljušti.

Nova + Osceola [(*C. reticulata* Blanco) × (*C. reticulata* Blanco × *C. paradisi* Macf.)] + [(*C. reticulata* Blanco) × (*C. reticulata* Blanco × *C. paradisi* Macf.)] je somatski hibrid nastao fuzijom ćelija dva tangela (Grosser & Chandler 2004). Od roditelja je nasledio plod izuzetno visokog kvaliteta koji je: tamno-narandžaste boje, sočan, slatkog ukusa, lako se i lepo ljušti (**Slika 6.b**). Od ovog hibrida se očekuje da pored dobrih karakteristika ploda, sazreva rano u sezoni (oktobar/novembar) i da je relativno otporan na niske temperature.

Page + (Clementine × Satsuma) [(*C. paradisi* Macf. × *C. reticulata* Blanco.) × *C. reticulata* Blanco] + [*C. reticulata* Blanco × *C. unshiu* Marcovitch seks. hibrid] je somatski hibrid nastao fuzijom ćelija tangela i visoko kvalitetnog hibrida mandarine (Guo *et al.* 2004) od koga se očekuje da pored korišćenja u eksperimentima interploidnog ukrštanja bude i sam potencijalni kultivar sa izuzetno dobrim karakteristikama - da plod bude tamno-narandžaste boje (**Slika 6.c**), slatkog, bogatog i specifičnog ukusa i da se lako ljušti. Takođe, da poseduje izvesnu otpornost na niske temperature. Bez obzira što u sebi ima gene 'Clementine' i 'Satsuma' mandarina koje sazrevaju najranije u sezoni i gene 'Page' tangela koji sazreva u srednjoj sezoni (novembar-januar), pokazalo se da ovaj hibrid sazreva u kasnoj srednjoj sezoni (januar, februar) kao i seksualni hibrid Clementine × Satsuma koji ujedno i predstavlja njegovog roditelja.

Page + Ortanique (**Slika 6.d**) [(*C. paradisi* Macf. × *C. reticulata* Blanco) × *C. reticulata* Blanco] + (*C. reticulata* Blanco × *C. sinensis* L. Osb.) je somatski hibrid nastao fuzijom ćelija tangela i tangora (Guo *et al.* 2004) od koga se očekuje da pored korišćenja u eksperimentima interploidnog ukrštanja bude i sam potencijalni kultivar sa izuzetno dobrim karakteristikama - da plod bude tamno-narandžaste boje, slatkog, bogatog i specifičnog ukusa i da se lako ljušti. Takođe, da sazreva u kasnoj srednjoj sezoni i da poseduje izvesnu otpornost na niske temperature.

Page + Furr [(*C. paradisi* Macf. × *C. reticulata* Blanco) × (*C. reticulata* Blanco)] + [(ozračena selekcija *C. reticulata* Blanco) × (*C. reticulata* Blanco × *C. sinensis* Osbeck)] je somatski hibrid nastao fuzijom ćelija tangela i tangora (personalna komunikacija sa JW Grosser) od koga se očekuje da pored korišćenja u eksperimentima

interploidnog ukrštanja bude i sam potencijalni kultivar sa izuzetno dobrim karakteristikama ploda (tamno-narandžaste boje, slatkog, bogatog i specifičnog ukusa i lakog ljuštenja). Takođe, da sazreva u sredini sezone (nov-dec) i da je relativno otporan na niske temperature. U eksperimentima interploidnog ukrštanja postoji mogućnost prenošenja rezistentnosti na gljivu koja izaziva “scab“ (*Elsinoe fawcetti*) na triploidno potomstvo.

Hamlin + Dancy (*C. sinensis* Osb.) + (*C. reticulata* Blanco) je somatski hibrid nastao fuzijom ćelija slatke pomorandže i mandarine izuzetno visokog kvaliteta (Grosser *et al.* 1992) od koga se očekuje da budućem triploidnom potomstvu (proizašlom iz interploidnog ukrštanja) prenese dobre karakteristike ploda (**Slika 6.e**) uključujući i bezsemenost. Takođe da prenese osobinu ranog sazrevanja u sezoni.

Succari + Murcott (*C. sinensis* Osbeck) + (*C. reticulata* Blanco x *C. sinensis* Osbeck) je somatski hibrid nastao fuzijom ćelija slatke pomorandže i tangora (Mourao *et al.* 1996) od koga se očekuje da budućem triploidnom potomstvu (proizašlom iz interploidnog ukrštanja) prenese dobre karakteristike ploda (**Slika 6.f**) uključujući i smanjenu kiselost ploda. Takođe, da prenese osobinu ranog sazrevanja u sezoni.

Succari + Ponkan je somatski hibrid nastao fuzijom ćelija slatke pomorandže i mandarine (Mourao *et al.* 1996) od koga se očekuje da budućem triploidnom potomstvu (proizašlom iz interploidnog ukrštanja) prenese dobre karakteristike ploda (**Slika 6.g**) a naročito smanjenu kiselost. Takođe da prenese osobinu ranog/srednjeg sazrevanja u sezoni.

Succari + Changsha (*C. sinensis* Osbeck) + (*C. reticulata* Blanco) je somatski hibrid nastao fuzijom ćelija slatke pomorandže i mandarine (Grosser & Chandler 2004) od koga se očekuje da budućem triploidnom potomstvu (proizašlom iz interploidnog ukrštanja) prenese dobre karakteristike ploda (**Slika 6.h**) a naročito smanjenu kiselost. Takođe, da sazreva u ranoj sezoni.

Succari + Page (*C. sinensis* Osbeck) + [(*C. paradisi* Macf. x *C. reticulata* Blanco) x (*C. reticulata* Blanco)] je somatski hibrid nastao fuzijom ćelija slatke pomorandže i tangela (Mourao *et al.* 1996) od koga se očekuje da budućem triploidnom potomstvu (proizašlom iz interploidnog ukrštanja) prenese dobre karakteristike ploda (**Slika 6.i**) a naročito smanjenu kiselost. Inače, plodovi, koji imaju vrlo sličan oblik kao i slatka pomorandža, su potpuno bezsemeni, sa adekvatnim sadržajem soka. Izuzetno su dobrog

ukusa i lako se ljušte. Sazrevaju u ranoj sezoni (odnos TSS:TA je veći od 12% već polovinom septembra a početkom oktobra već prevazilazi vrednost 15%). Zbog svega navedenog, od ovog hibrida se očekuje da pored korišćenja u eksperimentima interploidnog ukrštanja bude i sam potencijalni kultivar sa izuzetno dobrim karakteristikama (personalna komunikacija sa JW Grosser).

Succari + Hirado Buntan Pink (HBP) (*C. sinensis* Osbeck) + (*C. grandis* Osbeck) je somatski hibrid nastao fuzijom ćelija slatke pomorandže i pamela (Grosser *et al.* 1998). Zbog monoembriogenosti semena, koristi se intenzivno u eksperimentima interploidnog seksualnog ukrštanja ko 4xženski roditelj (Grosser & Gmitter 2011).

4X Succari je autotetraploidni somatski hibrid slatke pomorandže nastao kao nusproizvod fuzije biparentalnih ćelija (Grosser *et al.* 1992) od koga se očekuje da budućem triploidnom potomstvu (proizašlom iz interploidnog ukrštanja) prenese dobre karakteristike ploda a naročito smanjenu kiselost i osobinu sazrevanja ploda u ranoj sezoni.

Valencia + Page (*C sinensis* Osb.) + [(*C. paradisi* Macf. × *C. reticulata* Blanco) × (*C. reticulata* Blanco)] je somatski hibrid nastao fuzijom ćelija slatke pomorandže i tangela (Grosser *et al.* 1998) od koga se očekuje da pored korišćenja u eksperimentima interploidnog ukrštanja bude i sam potencijalni kultivar sa izuzetno dobrim karakteristikama ploda (tamno-narandžaste boje, slatkog, bogatog i specifičnog ukusa i lakog ljuštenja). Takođe, da sazreva u srednjoj/kasnoj sezoni i da je relativno otporan na niske temperature.

Valencia + Minneola (*C sinensis* Osb.) + (*C. paradisi* Macf. × *C. reticulata* Blanco) je somatski hibrid nastao fuzijom ćelija slatke pomorandže i tangela (Grosser *et al.* 1998) od koga se očekuje da pored korišćenja u eksperimentima interploidnog ukrštanja bude i sam potencijalni kultivar sa izuzetno dobrim karakteristikama ploda (tamno-narandžaste boje, slatkog, bogatog i specifičnog ukusa, lakog ljuštenja sa malim brojem semena; **Slika 6.j**), da sazreva kasno u sezoni i da je otporan na niske temperature.

RhodeRed Valencia + Dancy (*C. sinensis* Osbeck) + (*C. reticulata* Blanco) je somatski hibrid nastao fuzijom ćelija slatke pomorandže i mandarine (Grosser *et al.* 1998) od koga se očekuje da pored korišćenja u eksperimentima interploidnog ukrštanja bude i sam potencijalni kultivar sa izuzetno dobrim karakteristikama ploda (tamno-narandžaste

boje, slatkog, bogatog i specifičnog ukusa, lakog ljuštenja sa malim brojem semena; **Slika 6.k)** i da sazreva kasno u sezoni.

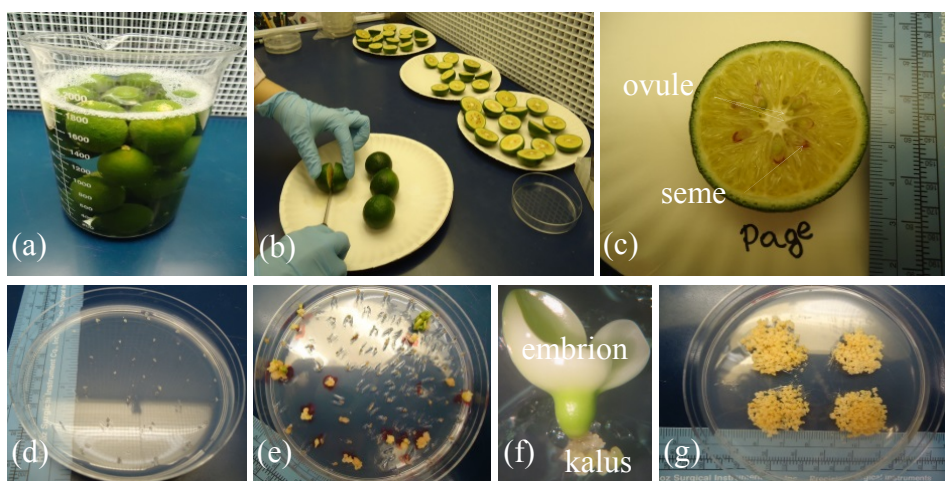
Valencia + (Robinson × Temple) je somatski hibrid nastao fuzijom ćelija slatke pomorandže i kompleksnog hibrida tangela i tangora (Grosser *et al.* 1995) od koga se očekuje da pored korišćenja u eksperimentima interploidnog ukrštanja bude i sam potencijalni kultivar sa izuzetno dobrim karakteristikama ploda (tamno-narandžaste boje, slatkog, bogatog i specifičnog ukusa, lakog ljuštenja sa malim brojem semena; **Slika 6.l)**, da sazreva u srednjoj/kasnoj sezoni i da je otporan na niske temperature.

4. REZULTATI

4.1. Somatska hibridizacija (fuzija protoplasta)

4.1.1. Uspostavljanje embriogenih kultura kalusa i ćelijskih suspenzija

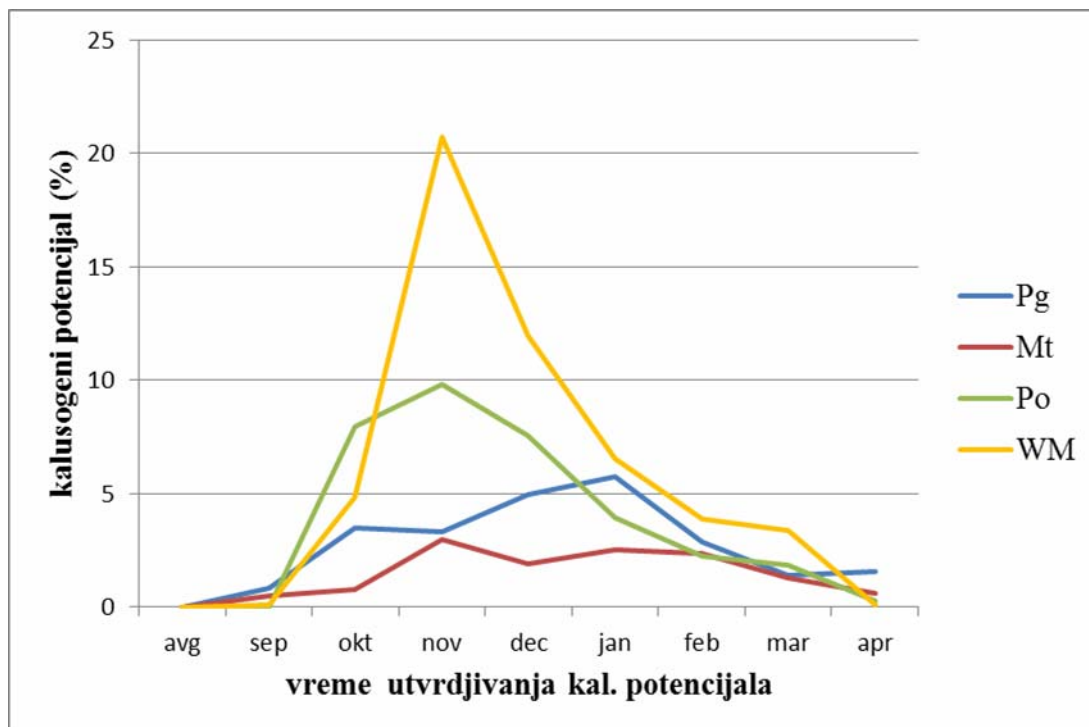
Izolovane su ovule iz nezrelih plodova mandarina (**Slike 7.a-c**) i gajene na tri hranljive podloge (**Slika 7.d**). Praćeno je formiranje kalusa i adventivnih somatskih embriona iz nucelnog sloja (**Slike 7.e-g**). Sve tri agarne hranljive podloge su se sastojale od 0.146M EME osnovne podloge (**Tabela 1**) koja je bila obogaćena sa 0, 5 ili 10 mg/l kinetina.



Slika 7. Procedura za uspostavljanja kulture embriogenog nucelnog kalusa iz ovula nezrelih plodova mandarina. **(a,b,c)** Izolovanje ovula iz nezrelih plodova. **(d)** Postavljenje izolovanih ovula na hranljivu podlogu. **(e)** Inicijacija kalusa iz nucelnog sloja ovula. **(f)** Detalj kalusa i nucelnih somatskih embriona dobijenih iz ovula. **(g)** Održavanje kalusa u nediferenciranom stanju na čvrstoj H+H hranljivoj podlozi.

Kalusogeni i embriogeni potencijal, izraženi kao procenat ovula koje daju kalus tj. somatske embrione su praćeni kod četiri kultivara koji su kasnije bili korišćeni u eksperimentima somatske hibridizacije: ‘Ponkan’ mandarine (Po), ‘Page’ tangela (Pg), ‘Murcott’ (Mt) i ‘W.Murcott’ (WM) tangora. Oba parametra su praćena tokom devet uzastopnih meseci nakon postavljanja ovula na indukcione hranljive podloge ali je samo kalusogeni potencijal prikazan u funkciji vremena (**Grafikon 1**) i to kao srednja vrednost za sva tri tretmana sa različitim koncentracijama regulatora rastjenja.

Sa **Grafikona 1** se vidi: 1) da se kalus kod sva četiri kultivara pojavljuje na ovulama tek nakon 1-2 meseca od inicijalnog postavljanja na hranljivu podlogu; 2) maksimalni broj njihovih ovula kalusira u periodu od 3-6 meseci posle čega se



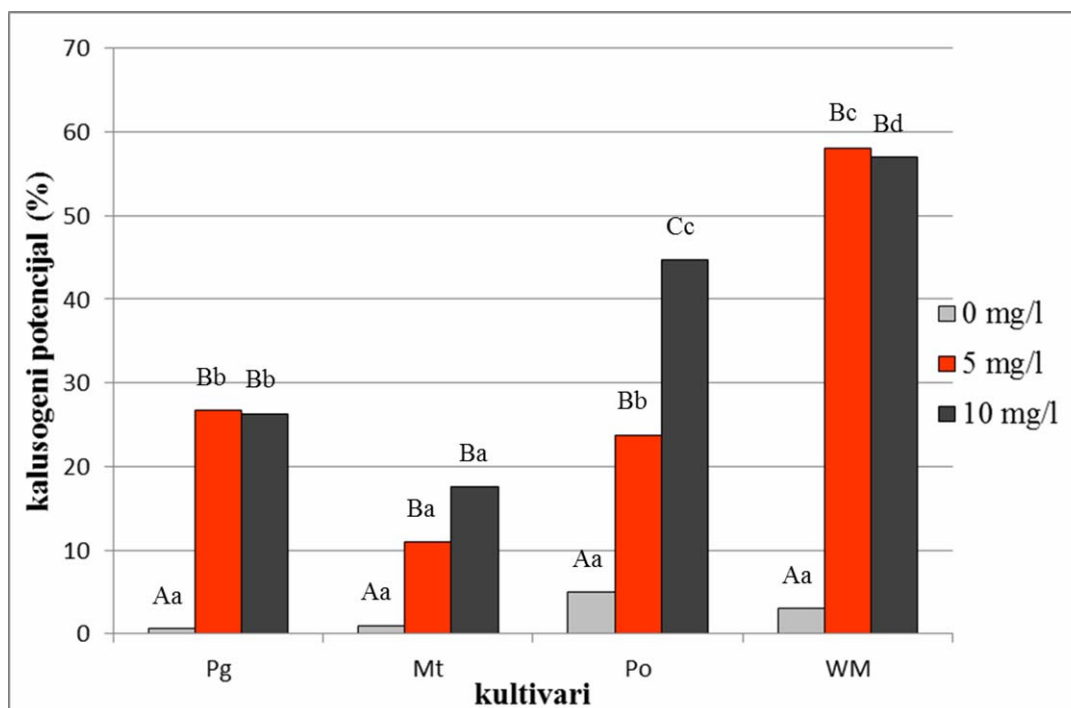
Grafikon 1. Kalusogeni potencijal (% ovula koje proizvode kalus) kod četiri kultivara: ‘Ponkan’ mandarine (Po), ‘Page’ tangela (Pg), ‘Murcott’ (Mt) i ‘W.Murcott’ (WM) tangora praćen u toku 9 meseci od postavljanja ovula na hranljivu podlogu.

kalusogeni potencijal naglo smanjuje i u devetom mesecu se skoro potpuno gubi. Sa **Grafikona 1** se takođe vidi velika genotipska razlika u formiranju kalusa pri čemu u periodu maksimalne kalusogeneze (u periodu od 3-6 meseci) kalusogeni potencijal kod kultivara ‘W.Murcott’ ide i do 20% dok kod kultivara ‘Murcott’ on jedva prelazi 3% da bi kod kultivara ‘Ponkan’ i ‘Page’ dobijen relativno mali kalusogeni potencijal od 9%, odnosno 6%.

Uticaj hranljivih podloga na indukciju kalusa (**Grafikon 2**) i somatskih embriona (**Grafikon 3**) su prikazani posebno za svaki od četiri testirana kultivara. Oba parametra su izražena kao procenat ukupnog broja ovula koje daju kalus tj. somatske embrione nakon 9 meseci gajenja na hranljivim podlogama.

Uočeno je da je za sva četiri kultivara (**Grafikon 2**) hranljiva podloga obogaćena sa kinetinom (5 mg/l i 10 mg/l) značajno efikasnija u formiranju kalusa iz ovula u odnosu na hranljivu podlogu bez ovog regulatora rastenja. Na hranljivoj podlozi

bez kinetina kalusogeneza je bila niska kod svih kultivara i nije bilo statistički značajnih razlika između kultivara. Samo kod 'Ponkan' kultivara, uočeno je da prisustvo 10 mg/l kinetina u hranljivoj podlozi dovodi do statistički veće produkcije kalusa u poređenju sa

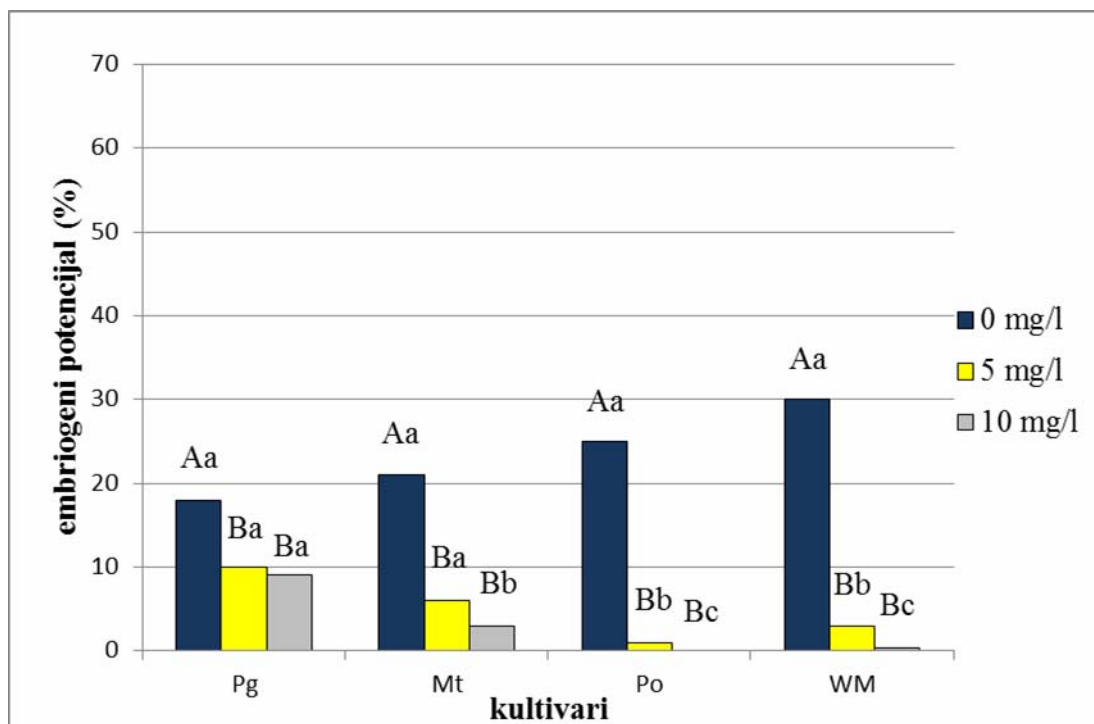


Grafikon 2. Uticaj hranljivih podloga sa različitom koncentracijom kinetina na kalusogeni potencijal (% ovula koje proizvode kalus) kod četiri kultivara: 'Ponkan' mandarine (Po), 'Page' tangela (Pg), 'Murcott' (Mt) i 'W.Murcott' (WM) tangora nakon 9 meseci gajenja u kulturi *in vitro*. Slova iznad stubića na histogramu predstavljaju rezultate Duncan testa sa nivoom poverenja od 95 %. One koje su obeležene istim (malim/velikim slovom) nisu statistički značajno različite. Velikim slovima su poredene razlike posmatranog parametra u okviru kultivara za različite koncentracije regulatora rastanja; malim slovima su poredene razlike posmatranog parametra između tih kultivara za istu koncentraciju regulatora rastanja.

tretmanom sa 5 mg/l kinetina. Kod ostala tri kultivara, pri poređenju kalusogenih potencijala na hranljivim podlogama sa različitom koncentracijom kinetina nije uočena značajna razlika pa je odlučeno da se hranljiva podloga sa 5 mg/l koristi za buduće indukovanje kalusa iz ovula svih kultivara.

Indukcija kalusa kod mandarina zavisi i od genotipa, pa tako na hranljivoj podlozi sa 5 mg/l kinetina kalusogeneza kod kultivara 'Page' i 'Ponkan' je oko 25% i statistički je značajno viša od vrednosti zabeležene za kultivar 'Murcott', dok je najveća kalusogeneza dobijena kod 'W.Murcott' kultivara (oko 60%). Kada se analiziraju rezultati dobijeni posle gajenja ovula na hranljivoj podlozi obogaćenoj sa 10 mg/l

kinetina uočava se još veća varijabilnost. Kalusogeneza na ovoj podlozi je bila najmanja kod 'Murcott' kultivara (18%), zatim sledi 'Page' (25%) pa 'Ponkan' (45%) i na kraju 'W.Murcott' sa 57%. Sve uočene razlike u kalusogenom potencijalu između kultivara su statistički značajne. Nasuprot kalusogenom potencijalu, genotipske razlike u sposobnosti formiranja nucelarnih somatskih embriona kod ova četiri ispitivana kultivara su manje (**Grafikon 3**).



Grafikon 3. Uticaj hranljivih podloga sa različitom koncentracijom kinetina na embriogeni potencijal (% ovula koje proizvode somatske embrione) kod četiri kultivara: 'Ponkan' mandarine (Po), 'Page' tangela (Pg), 'Murcott' (Mt) i 'W.Murcott' (WM) tangora nakon 9 meseci gajenja u kulturi *in vitro*. Slova iznad traka na histogramu predstavljaju rezultate Duncan testa sa nivoom poverenja od 95 %. One koje su obeležene istim (malim/velikim slovom) iznad vrednosti za embriogeni potencijal nisu statistički značajno različite. Velikim slovima su poredene razlike posmatranog parametra u okviru kultivara za različite koncentracije regulatora rastenjaa; malim slovima su poredene razlike posmatranog parametra između tih kultivara za istu koncentraciju regulatora rastenjaa.

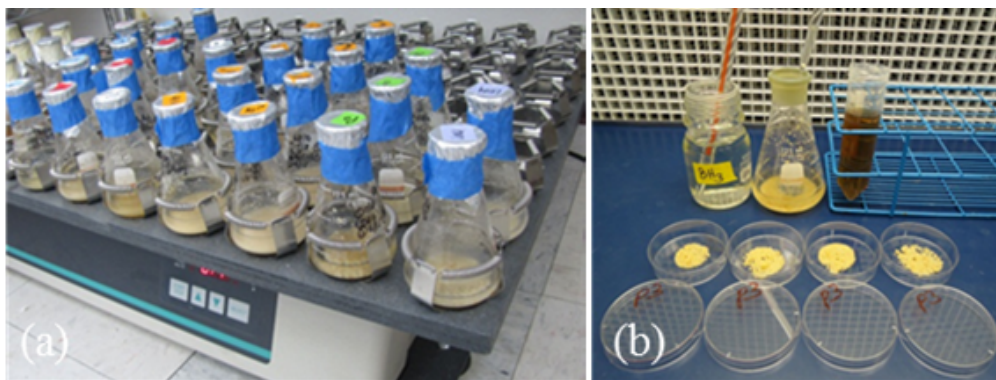
Embriogeni potencijal za sve kultivare je najveći na hranljivoj podlozi bez prisustva kinetina i iznosi 20-30%. Na hranljivoj podlozi sa 5 mg/l kinetina somatska embriogeneza ne prevazilazi 10% ali je uočen značajno veći procenat indukcije kod 'Page' i 'Murcott' kultivara u poređenju sa ostala dva kultivara. Indukcija somatske

embriogeneze na 10 mg/l kinetina je najveća kod 'Page' kultivara, niža kod 'Murcott' kultivara dok kod kultivara 'Ponkan' i 'W.Murcott' je bio zanemarljivo mali procenat indukcije na ovoj podlozi. Kod svih kultivara uočeno je da je indukcija somatske embriogeneze bila najveća na hranljivoj podlozi bez regulatora rastanja i značajno niža na hranljivim podlogama obogaćenim sa kinetinom. Na osnovu urađene statističke analize, može se zaključiti da je indukcija somatske embriogeneze iz ovula u ovim eksperimentima mnogo više zavisi od prisustva regulatora rastanja (kinetina) u hranljivoj podlozi a manje od genotipa.

4.1.2. Uspostavljanje embriogenih ćelijskih suspenzija iz kultura kalusa

Nakon utvrđivanja najbolje hranljive podloge za dobijanje embriogenog nucelnog kalusa kod četiri kultivara, izvršeno je njegovo dalje gajenje na čvrstoj H+H hranljivoj podlozi (**Tabela 2**). Kroz subkulturu na svake 4 nedelje, kalus je održavan na ovoj podlozi sve do uspostavljanja nediferenciranog stanja u kome on izgleda kao kompaktna grupa svetlo žutih rastresitih nodularnih struktura (**Slika 7.g**). U svakoj subkulturaciji je vršena vizuelna selekcija kalusa i odstranjivanje svih organizovanih tkiva, organa i embriona u njemu. Kako je prolazilo vreme u kome se embriogeni potencijal kalusa smanjivao, tako je bilo sve manje potrebno raditi vizuelnu selekciju i uklanjanje diferenciranih struktura.

Ćelijske suspenzije su potom inicirane tako što je nediferencirani kalus prenešen sa čvrste H+H hranljive podloge za njegovo održavanje na tečnu H+H hranljivu podlogu (**Slika 8.a**).



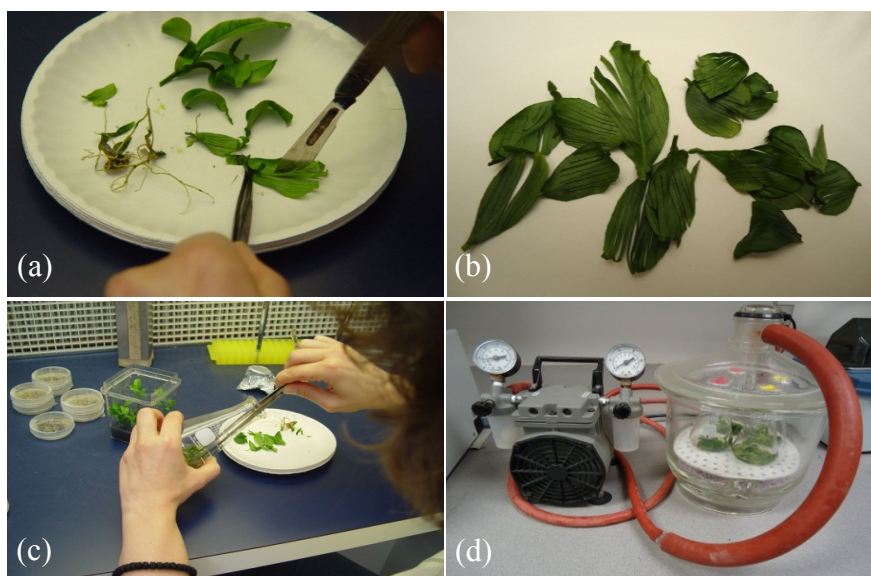
Slika 8. Ćelijske suspenzije za izolovanje protoplasta sa embriogenim potencijalom. (a) Erlenmajeri sa uspostavljenim ćelijskim suspenzijama (poreklom iz embriogenog

nucelnog kalusa) u tečnoj H+H podlozi gajene na horizontalnom obrtnom šejkeru. **(b)** Priprema pojedinačnih ćelija i ćelijskih agregata iz kultura suspenzija za inkubaciju sa enzimima.

Ovako pripremljene ćelijske suspenzije su korišćene za izolovanje protoplasta sa embriogenim potencijalom (**Slika 8.b**). Obzirom da je za izolaciju protoplasta najbolje da gajene embriogene ćelije u suspenziji budu u logaritamskoj fazi rasta, za te svrhe je uvek korišćena 5-12 dana stara suspenzija iz 2-nedeljnog ciklusa subkulture.

4.1.3. Dobijanje protoplasta iz mezofilnih ćelija lista

Listovi uzeti sa *in vitro* gajenih izdanaka tri kultivara: ‘W.Murcott’ tangora, ‘Willowleaf’ i ‘Ponkan’ mandarina su korišćeni za izolaciju mezofilnih protoplasta (**Slika 9**). Posle maceracije (**Slika 9. a-c**) i vakum filtracije (**Slika 9.d**) procedura izolacije protoplasta se obavljala paralelno sa izolacijom protoplasta iz kalusnih kultura.

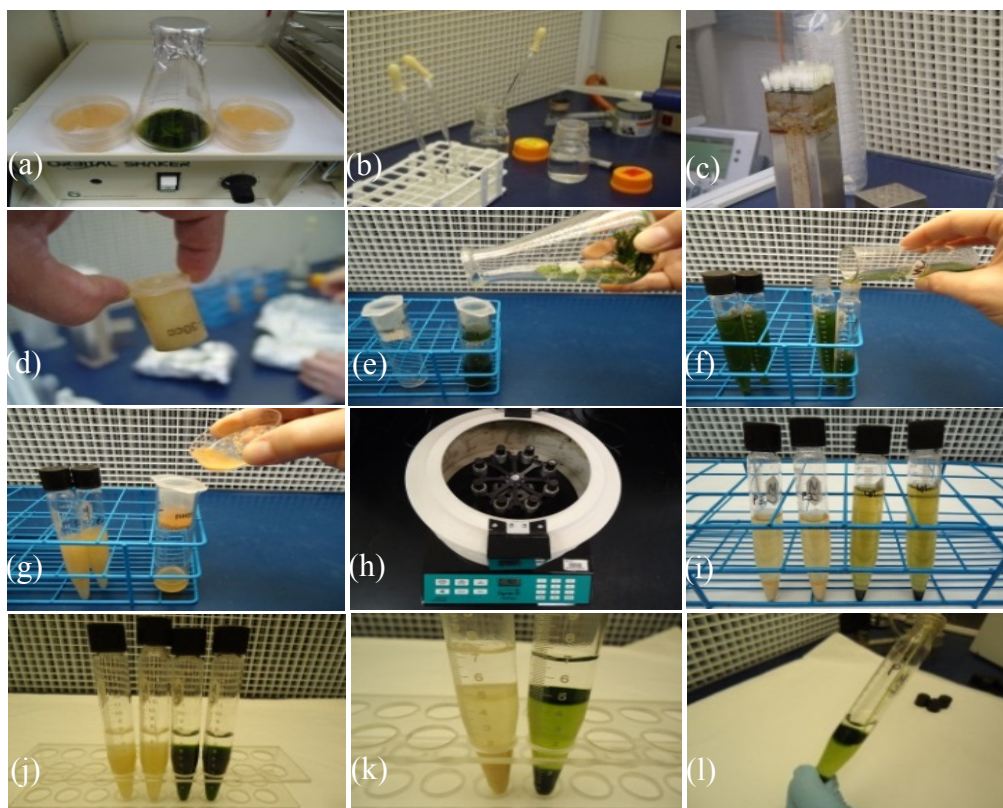


Slika 9. Prikaz korišćenja listova *in vitro* gajenih biljaka za izolovanje neembriogenih mezofilnih protoplasta. Sečenje listova *in vitro* gajenih biljaka **(a,b)** i njihova priprema za inkubaciju sa enzimima **(c, d)**.

4.1.4. Ispitivanje efikasnosti enzimske smese koja se koristi za izolovanje protoplasta iz embriogenih kultura suspenzija i neembriogenih mezofilnih ćelija

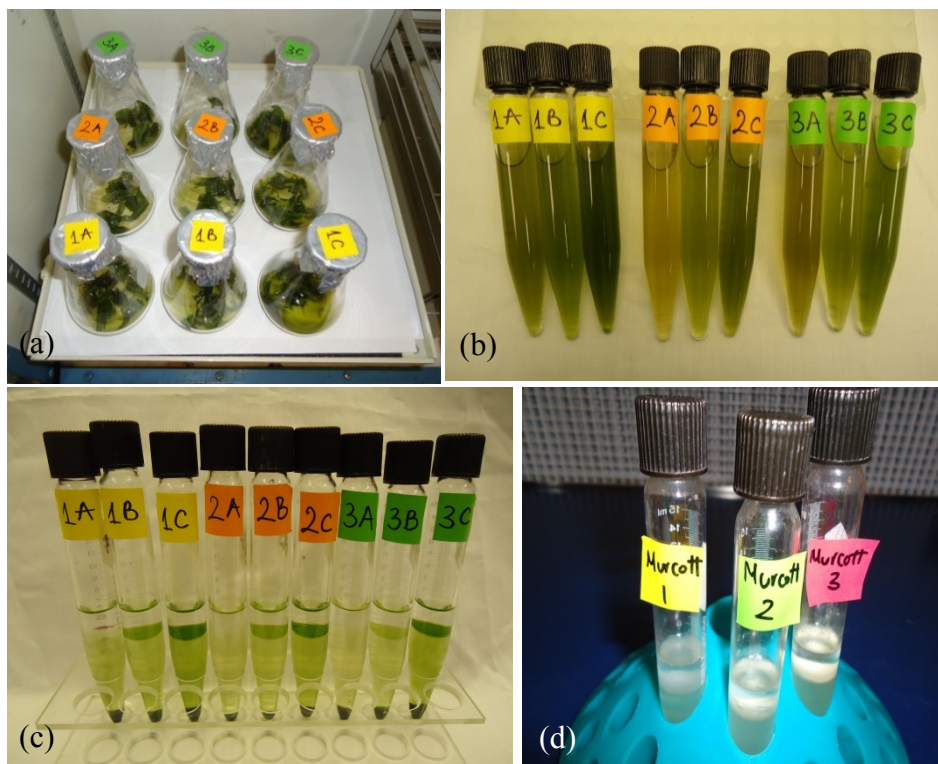
Izolovani protoplasti od oba izvora su dalje filtrirani (**Slike 10.b-g**), zatim centrifugirani (**Slika 10.h**) i izolovani pomoću saharozno-manitolnog gradijenta (**Slike**

10.i-l). Prinos protoplasta, dobijen brojanjem izolovanih protoplasta, je prikazan u **Tabeli 17**. Efikasnost tri enzimske smese A, B i C (**Poglavlje 3.1.4**) je bila ispitivana tako što je početni materijal iz oba izvora (embriogenih kultura suspenzija i neembriogenih mezofilnih ćelija) bio istovremeno inkubiran u tim smesama 17-20 sati (**Slike 10.a, 11.a**).



Slika 10. Izolaciji protoplasta iz ćelijskih suspenzija i listova *in vitro* gajenih biljaka. **(a)** Enzimska inkubacija ćelijskih suspenzija i listova poreklom od dva različita roditelja. **(b-e)** Filtriranje digestiranih mešavina kroz sterilni filter od nerđajućeg čelika. **(f)** Prikupljanje filtrata u graduisane epruvete sa poklopcem. **(h,i)** Centrifugiranje i uklanjanje supernatanta svakog od filtrata. **(j)** Prečišćavanje protoplasta nagomilanih u talogu (nakon uklanjanja supernatanta) uz pomoć saharozno-manitolnog gradijenta **(k,l)** Prikupljanje živih protoplasta iz "prstena" koji se nakon ponovnog centrifugiranja stvorio na mestu dodirivanja dva sloja, saharoze i manitola.

Enzimska smesa C se pokazala kao najefikasnija za izolaciju protoplasta iz ćelijskih suspenzija i tkiva listova korišćenih kultivara citrusa. Kod kultivara 'Willowleaf', 'Ponkan' i 'Murcott' smesa C je bila skoro dva puta efikasnija nego smesa B (**Tabela 17**). U slučaju kultivara 'W.Murcott' efikasnost smesa B i C je bila vrlo slična. Jedino je u slučaju kultivara 'Page' smesa B bila efikasnija od smese C.



Slika 11. Efikasnost delovanja tri enzimske smese A, B i C na izolaciju protoplasta embriogenih kultura suspenzija i neembriogenih mezofilnih ćelija kroz različite faze izolacije protoplasta. **(a)** Enzimska inkubacija listova tri različita kultivara mandarina: 'Willowleaf' je obeležen žutom trakom i brojem 1; 'W. Murcott' je obeležen narandžastom trakom i brojem 2; 'Ponkan' je obeležen zelenom trakom i brojem 3. **(b)** Prikupljeni filtrati u graduisanim epruvetama sa poklopcem nakon filtriranja digestiranih mešavina kroz sterilni filter od nerđajućeg čelika. **(c)** Živi protoplasti poreklom iz lista prikupljeni u regionu "prstena" dobijenog pomoću saharozno-manitolnog gradijenta. **(d)** Živi protoplasti poreklom iz ćelijske suspenzije 'Murcott' kultivara prikupljeni u regionu "prstena" dobijenog pomoću saharozno-manitolnog gradijenta: epruveta obeležena žutom trakom odgovara tretmanu sa enzimskom smesom A; epruveta obeležena zelenom trakom odgovara tretmanu sa enzimskom smesom B; epruveta obeležena crvenom trakom odgovara tretmanu sa enzimskom smesom C.

Enzimska smesa A je bila izuzetno neefikasna za izolaciju protoplasta a u u nekim slučajevima je pokazivala toksični karakter (**Slike 11.b,c**) što je dovelo do pucanja protoplasta i izlivanja ćeliskog sadržaja u hranljivu podlogu. Negativni efekat smese A se najbolje vidi na **Slikama 11.c,d** gde se na saharozno-manitolnom gradijentu ne izdvaja protoplasni prsten. Najveća efikasnost pri izolaciji protoplasta je postignuta pri korišćenju enzimske smese C i kultivara 'Willowleaf' od 13.8 miliona protoplasta po gramu sveže težine (**Tabela 17**).

Tabela 17. Ukupan broj izolovanih protoplasta u milionima/1g sveže težine nakon tretiranja sa različitim enzimskim smesama (A, B i C). Svaka vrednost u tabeli je predstavljena kao srednja vrednost iz tri ponavljanja $\pm$ standardna greška.

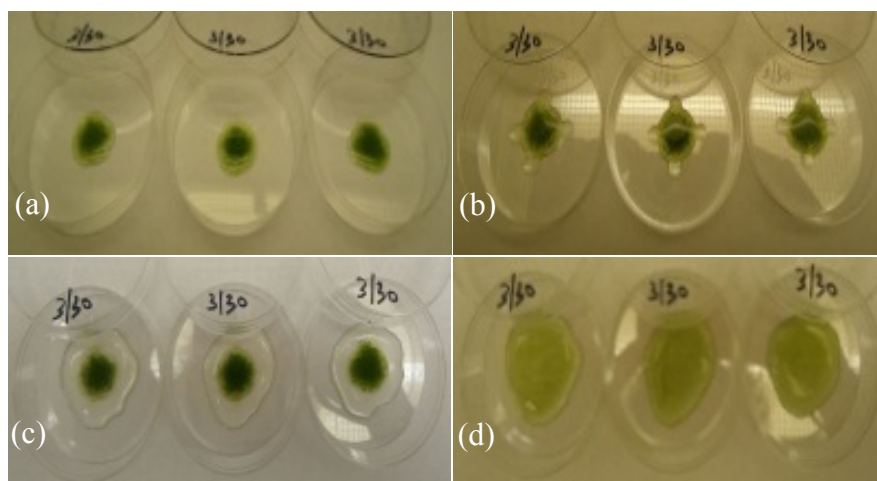
	Enzimске smese		
Kultivar	A	B	C
‘Willowleaf’	1.7 $\pm$ 0.7	7.1 $\pm$ 1.6	13.8 $\pm$ 3.9
‘W. Murcott’	0.5 $\pm$ 0.3	5.0 $\pm$ 1.1	5.6 $\pm$ 0.9
‘Ponkan’	0.1 $\pm$ 0.1	3.0 $\pm$ 1.7	6.8 $\pm$ 3.6
‘Page’	0.3 $\pm$ 0.2	9.6 $\pm$ 1.8	5.6 $\pm$ 3.7
‘Murcott’	0.3 $\pm$ 0.1	2.4 $\pm$ 1.3	4.3 $\pm$ 1.9

4.1.5. Fuzija protoplasta i ispitivanje uticaja različitih molekularnih masa PEG na efikasnost proizvodnje somatskih hibrida

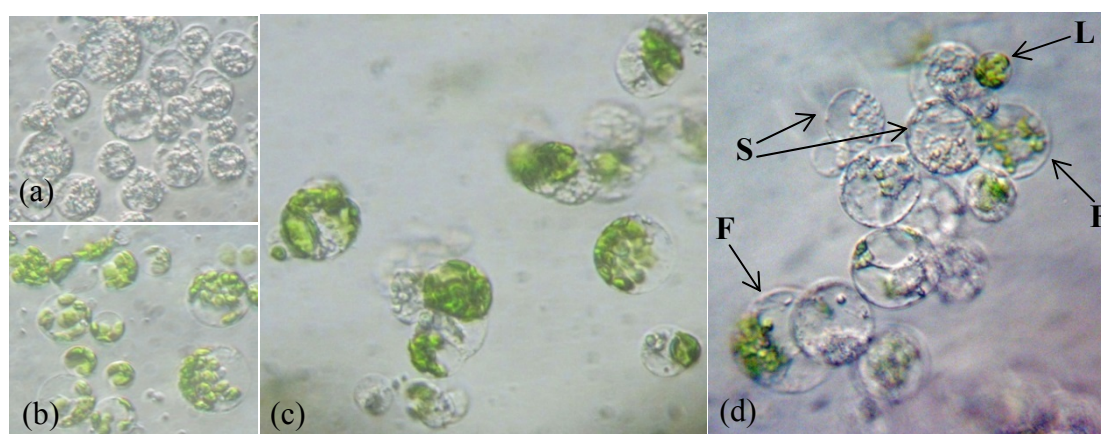
Zbog najbolje efikasnosti pri izolaciji protoplasta iz najvećeg broja testiranih kultivara (**Tabela 17**), enzimska smesa C je izabrana za izolaciju protoplasta u svim daljim eksperimentima fuzije protoplasta. Za fuziju protoplasta su korišćene ćelijske suspenzije četiri kultivara mandarina i njihovih hibrida: ‘Murcott’, ‘Page’, ‘Ponkan’ i ‘W.Murcott’ kao izvor embriogenih protoplasta i listovi šest kultivara (‘Willowleaf’, ‘Snack’, ‘Ponkan’, ‘Kinnow’, ‘Osceola’ i ‘W.Murcott’) koji su bili izvor neembriogenih protoplasta. Protoplastne smeše su, da bi se protoplasti međusobno fuzionisali, tretirane sa 40% (w/v) PEG rastvora. Neki od detalja izvođenja samog procesa hemijske fuzije protoplasta je prikazan na **Slici 12**.

Na **Slici 13** su prikazani izolovani embriogeni i neembriogeni protoplasti neposredno pre fuzije, u toku samog procesa fuzije i neposredno posle toga. Korišćene su tri različite molekulske mase (MM) PEG da bi se testiralo da li postoje razlike u njihovom uticaju na konačan broj proizvedenih somatskih hibrida.

Somatski hibridi nastaju iz fuzionisanih protoplasta tako što oni počinju da se dele već nakon 7-10 dana inkubacije u tankom sloju u tečnoj hranljivoj podlozi (**Slike 14.a-c**). Nakon 3-4 nedelje se uočavaju nezrele kolonije na kojima su još uvek vidljive pojedinačne ćelije od kojih se one sastoje (**Slika 14.d**).



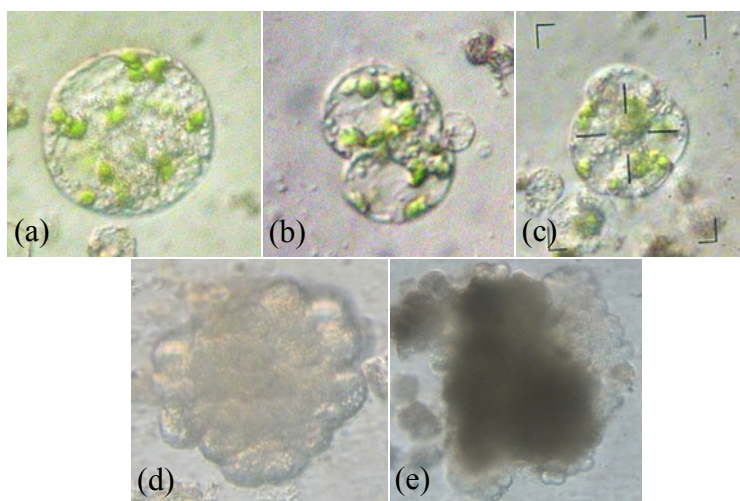
Slika 12. Prikaz faza hemijske fuzije protoplasta uz pomoć PEG: dodavanje PEG rastvora preko protoplastne smeše (a); dodavanje A+B rastvora na periferiju protoplastne smeše (b); ispiranje protoplastne smeše od PEG i A + B rastvora sa 0.6 M BH3 hranljivom podlogom (c); dodavanje hranljive podloge preko fuzionisanih protoplasta (d).



Slika 13. Hemijska fuzija protoplasta poreklom iz nucelnog kalusa i lista uz pomoć PEG (200×). (a) Izolovani embriogeni protoplasti neposredno pre fuzije. (b) Izolovani neembriogeni mezofilni protoplasti neposredno pre fuzije. (c) Proces fuzije protoplasta. (d) Sadržaj protoplastne smeše nakon fuzije: F = fuzionisani embriogeni i neembriogeni protoplasti, S = nefuzionisani embriogeni protoplasti, L = nefuzionisani mezofilni neembriogeni protoplasti.

Na **Slici 14.e** se vidi “sazrevanje” kolonije koje predstavlja fazu u kojoj sastavnih ćelija ima toliko da ih je nemoguće izbrojati pri čemu su one počele sa diferenciranjem i organizovanjem u tkiva i organe budućih somatskih embriona. Proces sazrevanja se odvija u periodu od 1-2 meseca posle prve deobe fuzionisanog protoplasta i vrlo zavisi

od kombinacije roditelja korišćenih u fuziji. Srednja vrednost veličine zrelih kolonija se kreće od 800-1300 μm .

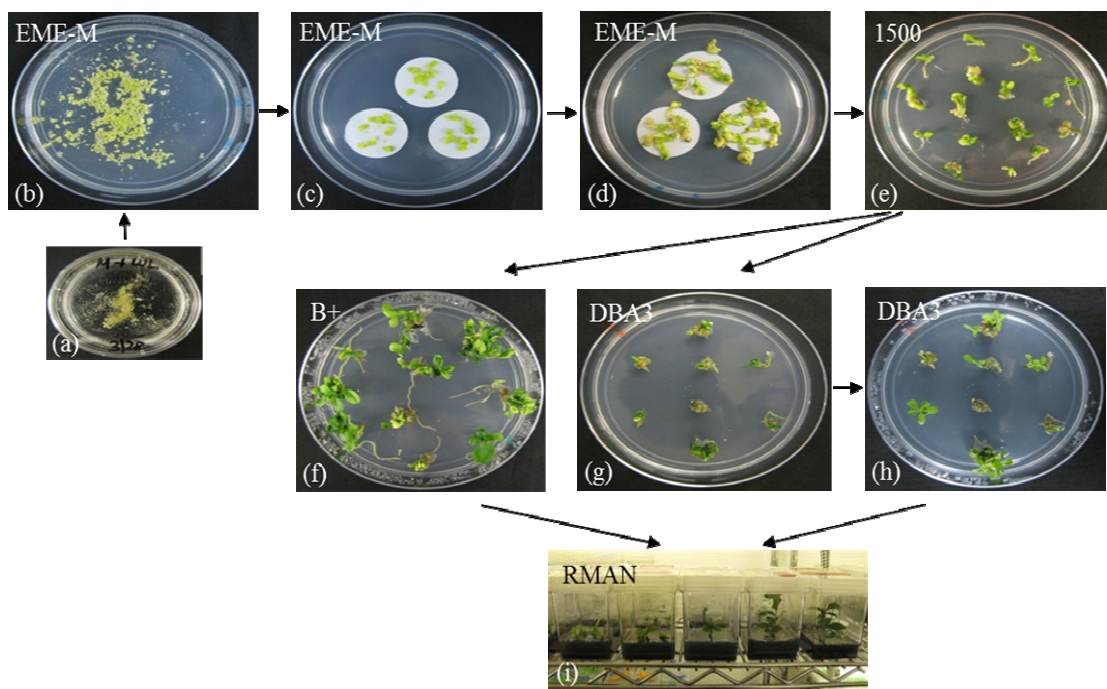


Slika 14. Deobe fuzionisanih protoplasta i stvaranje kolonija nakon hemijske fuzije protoplasta uz pomoć PEG (400 $\times$). **(a)** Fuzionisani protoplasti poreklom iz nucelarnog kalusa i lista. **(b)** Prva ćelijska deoba fuzionisanih protoplasta. **(c)** Druga ćelijska deoba fuzionisanih protoplasta. **(d)** Nezrela kolonija. **(e)** Zrela kolonija.

Mesec dana nakon transfera zrelih kolonija (**Slika 15.a**) na hranljivu podlogu sa smanjenim osmotikumom počinju da se uočavaju prvi somatski embrioni (**Slika 15.b**). Njihov prenos na novu 0.15 M EME-malt agarnu podlogu je pozitivno uticao na njihovo dalje rastenje i razviće. Dobijeni somatski embrioni koji su zaostajali u razvoju su stavljeni na površinu aceto-celuloznih filter papira koji su ležali na površini agarne hranljive podloge (**Slike 15.c,d**) jer su se po sugestijama Niedz *et al.* 2002 oni tako brže oporavljali i rasli. Dalje sazrevanje i izduživanje embriona tj. njihovo klijanje u biljčice je postignuto transferom embriona na više vrsta čvrstih hranjiva podlogaa (po opisanoj metodologiji Grosser *et al.* 2010b) što je prikazano na **Slikama 15.e-i**.

Rezultati prikazani u **Tabeli 18** pokazuju da je proces fuzije kod ovih mandarina i njihovih hibrida nakon 3-5 ponavljanja (kada se uzme u obzir ukupan broj regenerisanih embriona/biljaka na sva tri tretmana sa PEG različite MM) uspešan u 50% roditeljskih kombinacija - 6 od ukupno 12. Od preostalih šest kombinacija, u četiri (P + Sck, P + WL, P + WM, Po + Osc) nije bilo moguće dobiti regenerisane biljke, dok se kod druge dve kombinacije (M +Osc, Po + WL) uspelo sa dobijanjem regenerisanih biljaka (9 i 47) ali ni jedna biljka nije bila tetraploidna što je utvrđeno pomoću “flow” citometrije. Nasuprot tome, kod uspešnih šest kombinacija, ukupan broj dobijenih

biljaka je varirao od 86 kod WM + Kin pa sve do čitavih 1335 kod WM + WL. Ukupan broj tetraploidnih somatskih hibrida izražen kao učestalost njihovog javljanja (%) u odnosu na ukupan broj regenerisanih biljaka se kretao od 1-3% kod većine uspešnih regenerativnih kombinacija (WM + Sck, WM + Kin, WM + WL, M + WL, WM + Po) dok je kod Po + WM on iznosio čak 13%.



Slika 15. Prikaz faza kulture fuzionisanih protoplasta i regeneracije biljaka. **(a)** Pojava kolonija gajenih u tečnom sloju. **(b)** Pojava somatskih embriona nakon prenosa kolonija na agarnu 0.15 M EME-malt hranljivu podlogu. **(c,d)** Gajenje somatskih embriona na površini aceto-celuloznih filter papira koji leže na površini agarne hranljive podloge. **(e)** Sazrevanje somatskih embriona na EME 1500 hranljivoj podlozi. **(f)** Izduživanje embriona na B+ hranljiva podlogau. **(g,h)** Indukcija organogeneze kod nerazvijenih embriona na DBA3 hranljiva podlogau. **(i)** Rast i ožiljavanje biljaka (potencijalnih somatskih hibrida) na RMAN hranljiva podlogau u Magenta kutijama.

Kada se analiziraju rezultati ispitivanja uticaja različitih molekularnih masa PEG na efikasnost proizvodnje somatskih hibrida (**Tabela 18**) uočava se da sa rastom molekulske mase PEG kod 50% (6/12) roditeljskih kombinacija raste i ukupan broj regenerisanih embriona dok kod 17% (2/12) ne može da se potvrdi postojanje tog trenda. Ono što je sigurno jeste da kod svih uspešnih roditeljskih kombinacija sa rastom MM PEG raste i procenat pojave somatskih hibrida. Na različitim PEG tretmanima se međutim uočavaju izvesne genotipske razlike u efikasnosti proizvodnje somatskih hibrida. Naime, dok su sve kombinacije koje u sebi sadrže embriogeni kalus poreklom

Tabela 18. Različite roditeljske kombinacije dobijene fuzijom koja je predstavljena znakom plus (+) između embriogenih i neembriogenih protoplasta kao i broj regenerisanih biljaka (pre provere njihove ploidnosti) i broj proizvedenih somatskih hibrida. U zagradi, izraženo u procentima, se nalazi učestalost javljanja somatskih hibrida u odnosu na ukupan broj regenerisanih biljaka nakon tretiranja sa različitim molekulskim masama PEG-a (1500, 6000 i 8000). Prikazane su kumulativne vrednosti iz 3-5 ponavljanja.

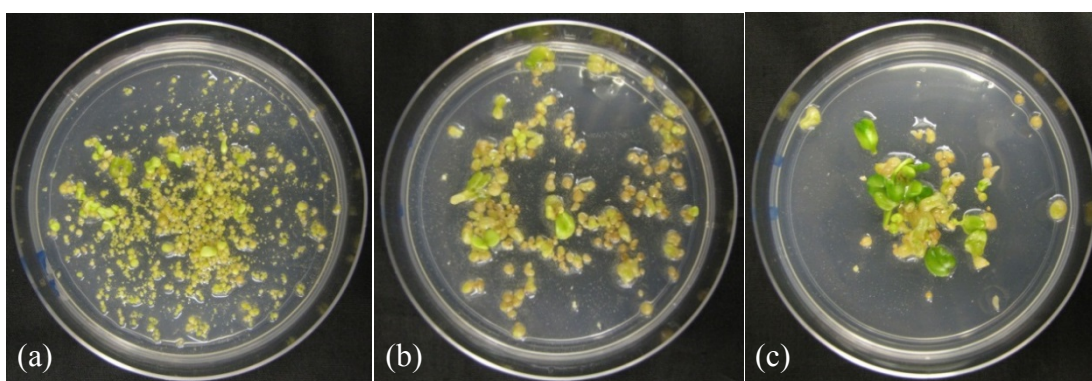
		1500 PEG	6000 PEG	8000 PEG	Ukupan br. biljaka na sva 3 tretmana
Mt + WL	Regenerisane biljke	25	152	409	586
	Somatski hibridi (%)	0 (0%)	2 (1%)	12 (3%)	14 (2%)
Mt + Osc	Regenerisane biljke	1	5	3	9
	Somatski hibridi (%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
P + Sck	Regenerisane biljke	0	0	0	0
	Somatski hibridi (%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
P + WL	Regenerisane biljke	0	0	0	0
	Somatski hibridi (%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
P + WM	Regenerisane biljke	0	0	0	0
	Somatski hibridi (%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Po + WM	Regenerisane biljke	0	20	137	157
	Somatski hibridi (%)	0 (0%)	0 (0%)	21 (15%)	21 (13%)
Po + WL	Regenerisane biljke	0	20	27	47
	Somatski hibridi (%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Po + Osc	Regenerisane biljke	0	0	0	0
	Somatski hibridi (%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Tabela 18. (nastavak)

		1500 PEG	6000 PEG	8000 PEG	Ukupan br. biljaka na sva 3 tretmana
WM + Po	Regenerisane biljke	71	66	301	438
	Somatski hibridi (%)	1 (1%)	0 (0%)	14 (5%)	15 (3%)
WM + WL	Regenerisane biljke	299	386	650	1335
	Somatski hibridi (%)	1 (0.5%)	7 (2%)	16 (2%)	24 (2%)
WM + Kin	Regenerisane biljke	44	10	32	86
	Somatski hibridi (%)	1 (2%)	0 (0%)	1 (3%)	2 (2%)
WM + Sck	Regenerisane biljke	362	17	95	474
	Somatski hibridi (%)	4 (1%)	0 (0%)	2 (2%)	6 (1%)

Legenda: slova pre tj. posle znaka plus (+) označavaju kultivar mandarine ili njenog hibrida iz koga su izolovani embriogeni tj. neembriogeni protoplasti: Mt = 'Murcott' tangor, P = 'Page' tangelo, Po = 'Ponkan' mandarina, WM = 'W.Murcott', WL = 'Willowleaf' mandarina, Osc = 'Osceola' tangelo, Sck = 'Snack' tangor, Kin = 'Kinnow' mandarina.

od kultuvara ‘W.Murcott’ regenerativne na sva tri tretmana (**Tabela 18**; **Slika 16**) i proizvode somatske hibride čak i na 1500 PEG dotle su sve ostale kombinacije gotovo totalno neregenerativne na tom tretmanu. Kod WM + Sck roditeljske kombinacije je još primećeno da se na 8000 MM PEG stvara manji broj regenerisanih embriona (**Slika 16.c**), ali da oni izgledaju veći i zdraviji u odnosu na preostala dva tretmana (**Slike 16.a,b**). Samo dve kombinacije (M + WL i WM + WL) proizvode somatske hibride na MM 6000 PEG tretmanu dok svih šest regenerativnih kombinacija to čini na MM 8000 PEG tretmanu zbog čega je i utvrđeno da je ovo najefikasniji tretman za proizvodnju somatskih hibrida iz kombinacija mandarina i njihovih hibrida.

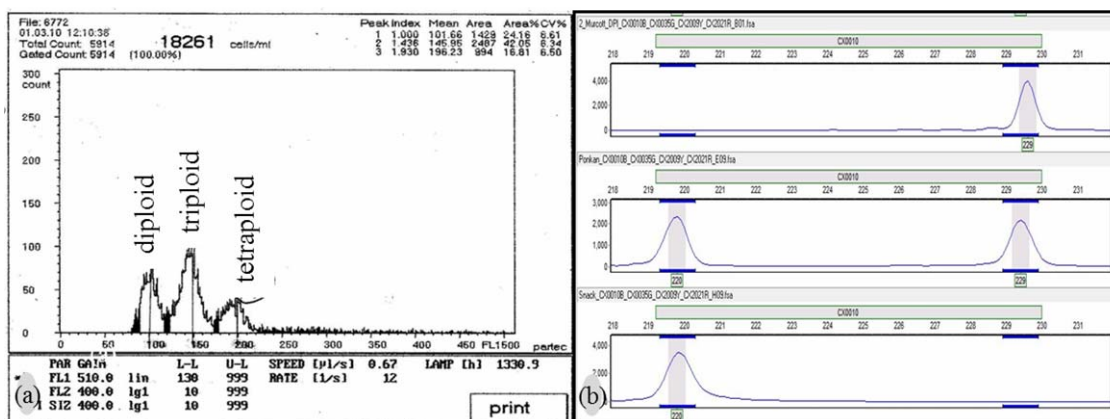


Slika 16. Regenerisani embrioni/biljke ‘WM + Sck’ roditeljske kombinacije dobijene fuzijom protoplasta nakon tretiranja sa različitim molekulskim masama PEG-a: 1500 (a), 6000 (b) i 8000 (c).

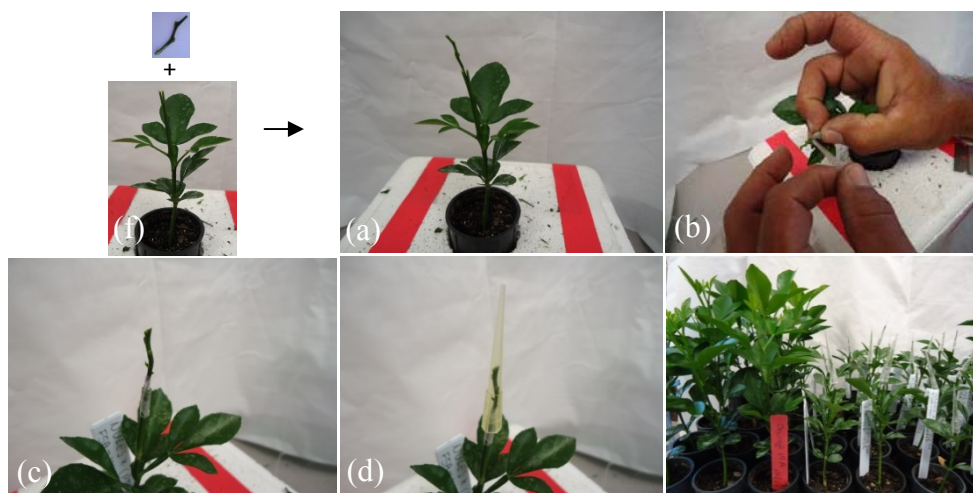
4.1.6. Analiza porekla somatskih hibrida pomoću “flow” citometrije i EST-SSR molekularne analize

Regenerisane biljke iz eksperimenata fuzije protoplasta (**Tabela 18**) su još u toku *in vitro* faze gajenja testirane pomoću “flow” citometrije i tako je određen nivo njihove ploidnosti (**Slika 17.a**). Nakon rane identifikacije, tetraploidne biljke su dalje nakalemljene metodom mikro-kalemljenja (**Slika 18**) na biljne podloge i tek onda aklimatizovane u stakleniku. Sve preživele biljke su bile potvrđene EST-SSR molekularnoj analizi (**Slika 17.b**; **Tabela 19**) radi daljeg utvrđivanja auto- tj. alotetraploidnosti njihovog genoma.

U **Tabeli 19** je prikazano da je za potrebe EST-SSR molekularne analize korišćeno deset prajmera koji su u PCR reakciji dali specifične alelske profile za određene lokuse u genomu somatskih hibrida i njihovih roditelja (poređenje se uvek vrši u odnosu na tzv. “majke” biljke; vidi **Poglavlje 3.1.8.2**). Somatski hibridi u okviru iste



Slika 17. Identifikacija hibridnih biljaka mandarine pomoću “flow” citometrije i EST-SSR molekularne analize. **(a)** Histogram “flow” citometrije pokazuje intenzitete fluorescencije nukleusa koji su ekstrahovani iz listova hibridnih biljaka. Intenzitet fluorescencije je proporcionalan količini DNK u jedru ćelija. Svaki vrh krive reprezentuje grupu ćelija sa istim nivoom ploidnosti - 2x, 3x, ili 4x. **(b)** Histogrami molekularne EST-SSR (expressed sequence tag-simple sequence repeat) analize pokazuju različite genotipove tri roditelja: ‘Murcott’, ‘Ponkan’ i ‘Snack’ mandarina (odozgo na dole). Histogrami su dobijeni pomoću GeneMark softvera nakon reakcija lančanog umnožavanja izolovane DNK sa CX0010 prajmerom koji pokazuje jasan polimorfizam za isti lokus. Svaki vrh krive reprezentuje alel za dati lokus. Tako je ‘Murcott’ tangor homozigotan za alel od 229 baznih parova, ‘Snack’ je homozigotan za alel od 220 bp dok je ‘Ponkan’ heterozigotan jer u svom SSR profilu poseduje oba ova alela.



Slika 18. Mikro-kalemljenje somatskih hibrida na trolisne komercijalne biljne podloge. **(a,b)** Ubacivanje dela izdanka *in vitro* gajenog seksualnog hibrida (plemka) u 2-3 mm duboki vertikalni urez na dekapitovanoj površini podloge. **(c,d)** Obmotavanje dodirne površine između podloge i plemke sa Nescofilm-om. **(e)** Postavljanje plastičnog nastavka od automatske pipete preko apikalnog meristema plemke. **(f)** Gajenje nakalemljenih biljaka u stakleniku.

roditeljske kombinacije i sa istim alelskim profilima su svrstani u genotipove obeležene brojevima od 1-14. Ukoliko se aleli koji su različiti između dva roditelja (za isti ispitivani lokus) pojavljuju istovremeno u profilu somatskog hibrida onda se tako potvrđuje alotetraploidnost somatskog hibrida. S druge strane, ukoliko se alel iz samo jednog roditelja pojavljuje u profilu somatskog hibrida onda se radi o autotetraploidnosti tj. zna se da somatski hibrid ima duplirani genom samo jednog od roditelja.

Zbir alela (označeni podebljanim fontom i na žutoj pozadini) koji dozvoljavaju da se biljke okarakterišu kao auto- ili alotetraploidne je pretvorena u parametar koji je nazvan - potvrđan broj markera a prikazan je u pretposlednjoj koloni **Tabele 19**. Po ovim kriterijumima su jedino Po + WM biljke alotetraploidne i to samo one koje imaju genotipove pod rednim brojem 11, 12, 13 i 14. One čine grupu od ukupno 18 biljaka. Biljke dobijene iz svih ostalih roditeljskih kombinacija plus genotip pod rednim brojem 9 iz Po + WM roditeljske kombinacije su autotetraploidne. Biljka iz genotipa pod rednim brojem 10 iz Po + WM roditeljske kombinacije je nedefinisana. U grupi alotetraploidnih genotipova nijedna od biljaka nema alelski profil koji je identičan zbiru alela koji su prisutni kod oba roditelja. U sva četiri genotipa nedostaje od jedan do tri alela na različitim lokusima. Na primer, kod genotipa broj 11 fali PCR proizvod dužine 93bp koji se nalazi u alelskom profilu 'W.Murcott' muškog roditelja. A kod genotipova broj 13 i 14 nedostaju tri PCR proizvoda (za genotip 13:93bp/163bp/183bp; za genotip 14:93bp/183bp/220bp) takođe od 'W.Murcott' muškog roditelja.

Autotetraploidni genotipovi se mogu svrstati u devet grupa. U genotipskim grupama broj 1, 2, 4 i 9 su somatski hibridi koji imaju alelski profil identičan profilu ženskog roditelja (1-'Murcott'; 2-'W.Murcott'; 4-'W.Murcott'; 9-'Ponkan'). Biljka koja predstavlja genotip broj 7 (WM + WL) ima alelski profil identičan profilu muškog roditelja. Genotipske grupe broj 3, 5, 6 i 8 nemaju nijednu biljku sa alelskim profilima koji su identični alelskom profilu određenog roditelja čiji su oni autotetraploidi. U sva četiri slučaja nedostaje alel dužine 93 bp koji pripada SSR profilu 'W.Murcott' ženskog roditelja. Biljka koja predstavlja genotip broj 10 ima najkomplikovaniji alelski profil. U njemu se za određene lokuse nalaze aleli prisutni samo u ženskom ili samo u muškom roditelju. Takođe se pojavljuju novi aleli koji ne postoje ni kod jednog roditelja. Uz

pomoć prajmera koji su korišćeni u ovoj seriji eksperimenata, nije bilo moguće utvrditi da li je ovaj hibrid auto- ili alotetraploidan.

Dodatna SSR-EST analiza je urađena da bi se poredili alelski profili kalusa dobijenih iz individualnih ‘Murcott’ i ‘W.Murcott’ ovula sa alelskim profilom njihovih majki biljaka. SSR profili dvadeset i četiri kalusne linije ‘Murcott’ tangora su bili identični alelskom profilu majke biljke dok su kod ‘W.Murcott’ tangora rezultati bili drugačiji. U **Tabeli 20** se vidi da samo četiri kalusne linije imaju alelski profil identičan profilu majke biljke. Kod 13 linija nedostaje jedan ili dva alela na različitim lokusima. U četrnaestoj liniji zapažamo nedostatak alela na dva lokusa i prisustvo jednog alela više na trećem lokusu. Ovi rezultati ukazuju na zigotsko poreklo većine linija embriogenog kalusa ‘W.Murcott’ tangora koji su korišćeni u eksperimentima somatske hibridizacije.

4.1.7. Morfologija listova somatskih hibrida

Analiza morfologije listova alotetraploidnih somatskih hibrida iz Ponkan + W.Murcott fuzije (**Slika 19.e**) pokazuje da svi oni imaju intermedijernu morfologiju u poređenju sa roditeljskim listovima (**Slike 19.a,b**). Radi se o alotetraploidima koji nemaju potpuno identičan SSR profil roditeljskim. Naime, u profilima hibrida nedostaju 1 do 3 alela različite dužine koji se sreću u profilu ženskog roditelja. Na **Slici 19.f** je prikazan list biljke čiji je genotip obeležen rednim brojem 9 u **Tabeli 19** a kome nedostaju dva alela dužine 93 i 183 bp koji inače postoje u profilu njegovog ženskog roditelja. Što se tiče autotetraploidnih biljaka, one pretežno imaju morfologiju listova onog roditelja čiji su genotipski duplikat. Tako je kod devet autotetraploida ‘W.Murcott’ tangora proizašlih iz W.Murcott + Ponkan fuzije (**Slika 19.f**) pokazano da imaju gotovo istu morfologiju lista kao i njihov ženski roditelj (**Slika 19.b**). Jedino što imaju slabo izraženu razraslu lisnu dršku koja se inače ne sreće na listovima njihovog roditelja ‘W.Murcott’ tangora. Genetički, ove autotetraploidne biljke (predstavljene kao genotip 3 u **Tabeli 19**) nemaju potpuno identičan SSR profil kao što ima njihov ženski roditelj. U odnosu na tog ženskog roditelja im nedostaje jedan alel dužine 93 bp. S druge strane, trinaest autotetraploida ‘W.Murcott’ tangora dobijenih u W.Murcott + Willowleaf fuziji (genotip 6 u **Tabeli 19**) koji takođe nemaju potpuno identičan SSR profil kao njihov ženski roditelj (i takođe im u odnosu na ženski roditeljski profil nedostaje alel dužine 93

Tabela 19. Prajmeri (predstavljani kao amplifikovani fragmenti različite dužine merljivi u bp jedinicama) koji su korišćeni u EST-SSR molekularnoj analizi i alelski profili za određene lokuse u genomu raznih kultivara mandarina. Za svaki biljni genotip su navedeni roditelji u prvom i drugom redu a trećem je proizvod njihove hibridizacije. Proizvodi PCR reakcije koji su u “masnom” fontu i na žutoj pozadini su zajednički za somatski hibrid i samo jednog od roditelja. Ovim prajmerima se potvrđuje auto- i alotetraploidnost somatskih hibrida nastalih u eksperimentima somatske hibridizacije tj. fuzije protoplasta.

Biljni genotip		PRAJMER:										Broj potvrđenih markera*	Broj biljaka**
		CX6F04	CX6F17	CX6F18	CX6F21	CX6F30	CX5F57	CX0010	CX0035	CX2007	CX2021		
1	'Murcott' tangor 'Willowleaf' mandarina Mt + WL	150 163	148	154 165	153	101 107	157 167	229	183	171 177	145 148	6	13
		150 163	138 148	154	153	93 101	157	220 229	174	172	148 150		
		150 163	148	154 165	153	101 107	157 167	229	183	171 177	145 148		
2	'W.Murcott' tangor 'Ponkan' mandarina WM + Po	150 163	148	154 165	153	93 101	157 167	220 229	174 183	171 177	145 150	4	3
		150 163	138	154 165	147 153	101 107	157 167	220 229	174	171	145 150		
		150 163	148	154 165	153	93 101	157 167	220 229	174 183	171 177	145 150		
3	'W.Murcott' tangor 'Ponkan' mandarina WM + Po	150 163	148	154 165	153	93 101	157 167	220 229	174 183	171 177	145 150	3	9
		150 163	138	154 165	147 153	101 107	157 167	220 229	174	171	145 150		
		150 163	148	154 165	153	101	157 167	220 229	174 183	171 177	145 150		
4	'W.Murcott' tangor 'Snack' tangor WM + Sck	150 163	148	154 165	153	93 101	157 167	220 229	174 183	171 177	145 150	7	1
		150	135 138	154 165	147 153	93 101	167	220	174	171	145 148		
		150 163	148	154 165	153	93 101	157 167	220 229	174 183	171 177	145 150		
5	'W.Murcott' tangor 'Snack' tangor WM + Sck	150 163	148	154 165	153	93 101	157 167	220 229	174 183	171 177	145 150	7	2
		150	135 138	154 165	147 153	93 101	167	220	174	171	145 148		
		150 163	148	154 165	153	101	157 167	220 229	174 183	171 177	145 150		
6	'W.Murcott' tangor 'Willowleaf' mandarina WM + WL	150 163	148	154 165	153	93 101	157 167	220 229	174 183	171 177	145 150	4	13
		150 163	138 148	154	153	93 101	157	220 229	174	172	148 150		
		150 163	148	154 165	153	101	157 167	220 229	174 183	171 177	145 150		
7	'W.Murcott' tangor 'Willowleaf' mandarina WM + WL	150 163	148	154 165	153	93 101	157 167	220 229	174 183	171 177	145 150	3	1
		150 163	138 148	154	153	93 101	157	220 229	174	172	148 150		
		150 163	148	154 165	153	93 101	157	220 229	174	172	148 150		
8	'W.Murcott' tangor 'Kinnow' mandarina WM + Kin	150 163	148	154 165	153	93 101	157 167	220 229	174 183	171 177	145 150	3	2
		163	148	154 165	153	101	157 167	220 229	174 183	172	148		
		150 163	148	154 165	153	101	157 167	220 229	174 183	171 177	145 150		
9	'Ponkan' mandarina 'W.Murcott' tangor Po + WM	150 163	138	154 165	147 153	101 107	157 167	220 229	174	171	145 150	4	2
		150 163	148	154 165	153	93 101	157 167	220 229	174 183	171 177	145 150		
		150 163	138	154 165	147 153	101 107	157 167	220 229	174	171	145 150		
10	'Ponkan' mandarina 'W.Murcott' tangor Po + WM	150 163	138	154 165	147 153	101 107	157 167	220 229	174	171	145 150	4	1
		150 163	148	154 165	153	93 101	157 167	220 229	174 183	171 177	145 150		
		150 163	138	160 165	147 153	101	161	220	174 183	171 177	145 150		

Tabela 19. (nastavak)

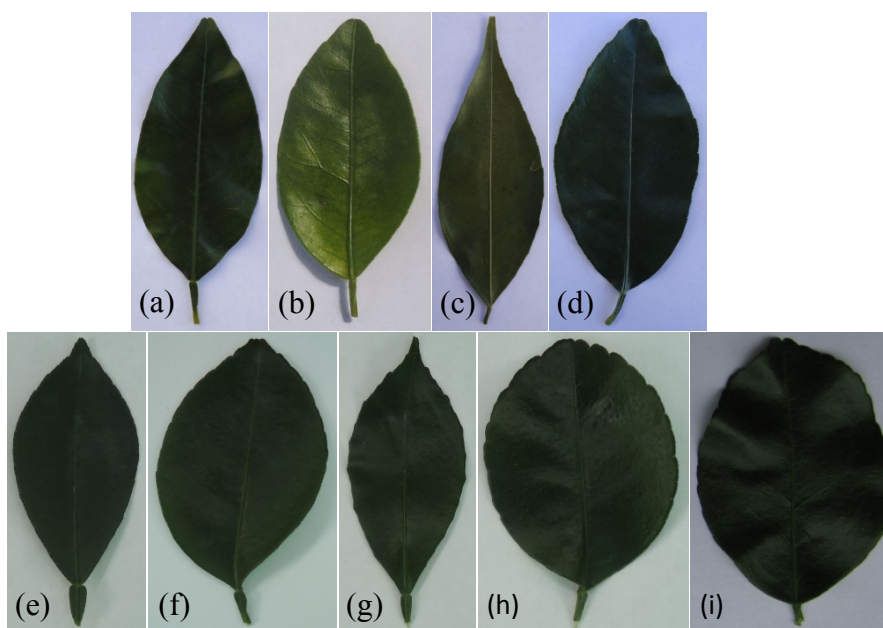
Biljni genotip		PRAJMER:										Broj potvrđenih markera*	Broj biljaka**
		CX6F04	CX6F17	CX6F18	CX6F21	CX6F30	CX5F57	CX0010	CX0035	CX2007	CX2021		
11	'Ponkan' mandarina	150 163	138	154 165	147 153	101 107	157 167	220 229	174	171	145 150		
	'W.Murcott' tangor	150 163	148	154 165	153	93 101	157 167	220 229	174 183	177	145 150		
	Po + WM	150 163	138 148	154 165	147 153	101 107	157 167	220 229	174 183	177	145 150	5	2
12	'Ponkan' mandarina	150 163	138	154 165	147 153	101 107	157 167	220 229	174	171	145 150		
	'W.Murcott' tangor	150 163	148	154 165	153	93 101	157 167	220 229	174 183	177	145 150		
	Po + WM	150 163	138 148	154 165	147 153	101 107	157 167	220 229	174	171	145 150	4	11
13	'Ponkan' mandarina	150 163	138	154 165	147 153	101 107	157 167	220 229	174	171	145 150		
	'W.Murcott' tangor	150 163	148	154 165	153	93 101	157 167	220 229	174 183	177	145 150		
	Po + WM	150 163	138 148	154 165	147 153	101 107	157 167	220 229	174	171	145 150	4	1
14	'Ponkan' mandarina	150 163	138	154 165	147 153	101 107	157 167	220 229	174	171	145 150		
	'W.Murcott' tangor	150 163	148	154 165	153	93 101	157 167	220 229	174 183	177	145 150		
	Po + WM	150 163	138 148	154 165	147 153	101 107	157 167	229	174	171	145 150	4	4

Legenda: Plus (+) simbolizuje proces somatske hibridizacije tj. fuzije protoplasta. Slovo pre tj. posle plusa označava kultivar mandarine ili njenog hibrida iz koga su potekli embriogeni tj. neembriogeni protoplasti: Mt = 'Murcott' tangor, WL = 'Willowleaf' mandarina, WM = 'W.Murcott' tangor, Po = 'Ponkan' mandarina, Sck = 'Snack' tangor, Kin = 'Kinnow' mandarina. Parametar označen zvezdom (*) označava koliko je ukupno korišćenih markera potvrdilo hibridnost proizvedenih tetraploidnih biljaka (**). Biljni genotipovi koji potiču iz iste roditeljske kombinacije su označeni istom bojom.

Tabela 20. Prajmeri koji su korišćeni u EST-SSR molekularnoj analizi i alelski profili za određene lokuse u genomu 'W.Murcott' tangora majke biljke i osamnaest različitih kalusnih linija. Ove su linije svrstane u pet različitih genotipova na osnovu njihovih različitih alelskih profila. Proizvodi PCR reakcija koji su na crvenoj pozadini su različiti tj. odsusvuju ili su ekstra prisutni u odnosu na majku biljku čime se potvrđuje njihovo zigotsko poreklo.

Biljni genotip	PRAJMER:										Br. testiranih kalusnih linija
	CX6F04	CX6F17	CX6F18	CX6F21	CX6F30	CX5F57	CX0010	CX0035	CX2007	CX2021	
'W.Murcott' majka biljka	150 163	148	154 165	153	93 101	157 167	220 229	174 183	177	145 150	-
'W.Murcott' kalus 1	150 163	148	154 165	153	93 101	157 167	220 229	174 183	177	145 150	4
'W.Murcott' kalus 2	163	148	154 165	153	93 101	157 167	220 229	174 183	177	145 150	1
'W.Murcott' kalus 3	163	148	154 165	153	101	157 167	220 229	174 183	177	145 150	1
'W.Murcott' kalus 4	150 163	148	154 165	153	101	157 167	220 229	174 183	177	145 150	11
'W.Murcott' kalus 5	150 163	138 148	154 165	153	93 101	157	220 229	174	177	145 150	1

bp) imaju istovetnu morfologiju lista kao taj roditelj (**Slika 19.h**). Biljka (list na **Slici 19.g**) nastala u W.Murcott + Willowleaf fuziji (genotip 7 u **Tabeli 19**) je autotetraploid muškog roditelja ‘Willowleaf’ mandarine (**Slika 19.c**) i u odnosu na njega ima identičan SSR profil. Zato i nije iznenađujuće da autotetraploid ima istu morfologiju lista kao ‘Willowleaf’.



Slika 19. Morfologija lista roditelja (gornji red) i somatskih hibrida (donji red). **(a)** ‘Ponkan’ madarina. **(b)** ‘W.Murcott’ tangor. **(c)** ‘Willowleaf’ mandarina. **(d)** ‘Murcott’ tangor. **(e)** Ponkan + W.Murcott alotetraploid. **(f)** Autotetraploid ‘W.Murcott’ tangora proizašao iz W.Murcott + Ponkan fuzije. **(g)** Autotetraploid ‘Willowleaf’ mandarine proizašao iz W.Murcott + Willowleaf fuzije. **(h)** Autotetraploid ‘W.Murcott’ tangora proizašao iz W.Murcott + Willowleaf fuzije. **(i)** Autotetraploid ‘Murcott’ tangora proizašao iz Murcott + Willowleaf fuzije.

Na **Slici 19.i** je list autotetraploida ‘Murcott’ tangora proizašao iz Murcott + Willowleaf fuzije koji ima identičan SSR profil ženskom roditelju (**Slika 19.d**). Svih trinaest biljaka nastalo iz ove roditeljske kombinacije (genotip 1 u **Tabeli 19**) ima istu morfologiju lista kao i ‘Murcott’. Dva somatska hibrida iz W.Murcott + Kinnow fuzije (genotip 8 u **Tabeli 19**) i tri somatska hibrida iz W.Murcott + Snack fuzije (genotipovi 4 i 5 u **Tabeli 19**) nisu preživeli gajenje u staklari pa njihova morfologija lista i ne može da se komentariše. Ostali proizvedeni somatski hibridi su nakalemljeni na komercijalnu biljnu podlogu i prenešeni u staklaru na aklimatizaciju.

4.1.8. Analiza plodova somatskih hibrida gajenih u polju

Morfološke osobine plodova i kvalitet soka somatskih hibrida (**Tabela 13**) gajenih u polju je praćen u toku dve uzastopne kalendarske godine (2011 i 2012). U ovu svrhu su uzimani podaci za opis spoljašnjih i unutrašnjih karakteristika ubranih plodova u delu sezone kada dostižu zrelost (od novembra do aprila). Utvrđeno je da je kod individualnih somatskih hibrida deset karakteristika promenljivo u toku vremena (**Tabele 21-27**) ali da su, sa druge strane, mnoge nepromenljive zbog čega su one nazvane nevarijabilnim karakteristikama. Isto tako je utvrđeno da se somatski hibridi međusobno dosta razlikuju u varijabilnim i nevarijabilnim karakteristikama tj. da one poseduju genetičku specifičnost.

Opis/vrednosti spoljašnjih i unutrašnjih nevarijabilnih karakteristika plodova kod ispitivanih somatskih hibrida:

1) 'Page' tangelo + 'Ortanique' tangor

Oblik ploda: od sferičnog do ovalnog (spljoštenog na polovima) (**Slika 6.d**)

Baza ploda: zaobljena sa kratkim (1 cm) brazdama/naborima koje se radijalno šire

Apeks ploda: zaobljen mada može biti i blago ravan sa/bez malog udubljenja

Tekstura kore: rapava i rupičasta

Prisustvo žlezda sa eteričnim uljima u kori: vrlo prisutne; miris eteričnog ulja u njima je blag i prijatan a potseća istovremeno na mandarinu i pomorandžu

Debljina spoljašnje kore (egzokarpa): 1-2 mm

Debljina unutrašnje kore (albeda, mezokarpa): 1-3 mm

Boja albeda: 11D žuta

Prijanjanje kore uz endokarp: srednje čvrsto

Ljuštenje kore: lako

Prosečan br. segmenata srži (endokarpa): 9

Međusobna povezanost segmenata: srednje jačine

Opna segmenata: srednje debljine

Cedenje soka iz ploda korišćenjem električnog sokovnika: lako; membrane segmenata pri pritiskanju ploda o cediljku lako pucaju ali i posle ceđenja ostaju povezane sa korom

Ostatak koji preostaje u levku električnog sokovnika nakon ceđenja soka: minimalan (skoro da ga i nema)

Aroma iscedenog soka zrelog ploda: prijatna, blaga, nespecifična, više miriše na mandarinu a manje na pomorandžu

Ukus iscedenog soka zrelog ploda: prijatan, blago kiselkast, više potseća na mandarinu a manje na narandžu

Prosečan br. semena u plodu: 6

Prosečna veličina semena: 17×7 mm

Poli/monoembriogenost semena: preovlađuje monoembriogenost uz prisustvo niskog nivoa poliembriogenosti (Slika 20.a)

2) 'Page' tangelo + ('Clementine' mandarin × 'Satsuma' mandarina)

Oblik ploda: ovalan (spljošten na polovima) (Slika 6.c)

Baza ploda: zaobljena sa kratkim (1cm) plitkim brazdama/naborima koje se radijalno šire

Apeks ploda: zaobljen mada može biti i zaravnjen sa malim udubljenjem

Tekstura kore: rapava i rupičasta

Prisustvo žlezda sa eteričnim uljima u kori: vrlo prisutne; miris eteričnog ulja je jak i prijatan a vrlo podseća na mandarinu

Debljina spoljašnje kore (egzokarpa): 2 mm

Debljina unutrašnje kore (albeda, mezokarpa): 1-2 mm

Boja albeda: 13D žuta

Prijanjanje kore uz endokarp: minimalno (kod mnogih plodova nepostojeće) zbog čega se vrlo lako ljušti

Ljuštenje kore: izuzetno lako

Prosečan br. segmenata srži (endokarpa): 10

Međusobna povezanost segmenata: od srednje jačine do blage povezanosti

Opna segmenata: srednje debljine

Cedenje soka iz ploda korišćenjem električnog sokovnika: lako

Ostatak koji preostaje u levku električnog sokovnika nakon cedenja soka: srednje količine

Raslojavanje soka od pulpe: nastupa odmah po cedenju soka

Aroma iscedenog soka zrelog ploda: izuzetno prijatna, jaka, vrlo specifična, potseća na mandarinu

Ukus iscedenog soka zrelog ploda: izuzetno prijatan, vrlo bogat i specifičan, potseća na mandarinu

Prosečan br. semena u plodu: 4

Prosečna veličina semena: 16×7 mm

Poli/monoembriogenost semena: poliembriogenost (Slika 20.b)

3) 'Hamlin' pomorandža + 'Dancy' mandarina

Oblik ploda: nepravilan sferičan oblik izdužen na bazi ploda (Slika 6.e)

Baza ploda: zaobljena sa izraženim naborima i dugačkim (1- 4 cm) brazdama koje se radijalno šire; na nekim plodovima postoji ispupčen "vrat"

Apeks ploda: zaobljen sa malim ili velikim udubljenjem prečnika i do 20mm

Tekstura kore: rapava, rupičasta i bubuljičava

Prisustvo žlezda sa eteričnim uljima u kori: vrlo slabo prisutne; miris eteričnog ulja je blag, prijatan i puno potseća na pomorandžu

Debljina spoljašnje kore (egzokarpa): 2-4 mm

Debljina unutrašnje kore (albeda, mezokarpa): 2-5 mm

Boja albeda: 4D žuta

Prijanjanje kore uz egzokarp: srednje čvrsto

Lakoća ljuštenja kore: izuzetno lako se ljušti

Prosečan br. segmenata srži (endokarpa): 9

Međusobna povezanost segmenata: srednje jačine

Opna segmenata: tanka zbog čega se segmenti vrlo lako zvaću

Cedenje soka iz ploda korišćenjem električnog sokovnika: nije lako
Ostatak koji preostaje u levku električnog sokovnika nakon cedenja soka: obilan
Raslojavanje soka od pulpe: sporo
Aroma iscedenog soka zrelog ploda: izuzetno prijatna, srednje jačine, nalik svom roditelju - 'Hamlin' pomorandži
Ukus iscedenog soka zrelog ploda: izuzetno prijatan, nalik svom roditelju - 'Hamlin' pomorandži
Prosečan br. semena u plodu: 4.5
Prosečna veličina semena: 19×7 mm
Poli/monoembriogenost semena: poliembriogenost (Slika 20.c)

4) 'Succari' pomorandža + 'Changsha' mandarina

Oblik ploda: nepravilan sferičan oblik (Slika 6.h)
Baza ploda: zaobljena sa izraženim naborima i kratkim (1cm) brazdama koje se radijalno šire
Apeks ploda: zaobljen mada može biti i blago ravan sa/bez malog udubljenja
Tekstura kore: rapava i rupičasta
Prisustvo žlezda sa eteričnim uljima u kori: vrlo prisutne; miris eteričnog ulja je blag, prijatan i potseća na mandarinu
Debljina spoljašnje kore (egzokarpa): 2-3 mm
Debljina unutrašnje kore (albeda, mezokarpa): 4-6 mm
Boja albeda: 11D žuta
Prijanjanje kore uz endokarp: srednje čvrsto
Lakoća ljuštenja kore: lako se ljušti
Prosečan br. segmenata srži (endokarpa): 9
Međusobna povezanost segmenata: srednje jačine
Opna segmenata: srednje debljine
Lakoća cedenja soka iz ploda korišćenjem električnog sokovnika: nije lak za cedenje
Ostatak koji preostaje u levku električnog sokovnika nakon cedenja soka: obilan
Aroma iscedenog soka zrelog ploda: izuzetno prijatna, blaga, nespecifična, potseća na mandarinu
Ukus iscedenog soka zrelog ploda: prijatan, blag, neutralnog ukusa u smislu ujednačenog odnosa šećera i kiselosti, potseća na mandarinu
Prosečan br. semena u plodu: 5
Prosečna veličina semena: 18×7 mm
Poli/monoembriogenost semena: poliembriogenost (Slika 20.d)

5) 'Succari' pomorandža + 'Murcott' tangor

Oblik ploda: sferičan (Slika 6.f)
Baza ploda: zaobljena sa kratkim (1.5 cm) izraženim brazdama/naborima koje se radijalno šire
Apeks ploda: zaobljen mada može biti i blago ravan sa/bez malog udubljenja
Tekstura kore: rapava, rupičasta i bubuljičava
Tekstura kore: rapava i rupičasta
Prisustvo žlezda sa eteričnim uljima u kori: vrlo prisutne; miris eteričnog ulja je vrlo jak i izuzetno prijatan a potseća na pomorandžu
Debljina spoljašnje kore (egzokarpa): 2-3 mm

Debljina unutrašnje kore (albeda, mezokarpa): 2-8 mm

Boja albeda: 4D žuta

Prijanjanje kore uz endokarp: čvrsto

Lakoća ljuštenja kore: ne ljušti se lako u početku ali kad se započne, ljuštenje ide dobro

Prosečan br. segmenata srži (endokarpa): 9

Međusobna povezanost segmenata: od srednje jačine do blage povezanosti

Opna segmenata: srednje debljine

Lakoća ceđenja soka iz ploda korišćenjem električnog sokovnika: izuzetno lako

Ostatak koji preostaje u levku električnog sokovnika nakon ceđenja soka: minimalan

Raslojavanje soka od pulpe: nastupa odmah po ceđenju soka

Aroma iscedenog soka zrelog ploda: izuzetno prijatna, jaka, potseća na pomorandžu

Ukus iscedenog soka zrelog ploda: izuzetno prijatan, bogatog specifičnog slatkog ukusa, potseća na pomorandžu

Prosečan br. semena u plodu: 3.5

Prosečna veličina semena: 16×8 mm

Poli/monoembriogenost semena: poliembriogenost (Slika 20.e)

6) 'Murcott' tangor + 'LB8-8' tangelo (Clementine × Minneola)

Oblik ploda: ovalan (spljošten na polovima) (Slika 6.a)

Baza ploda: zaobljena sa naborima i kratkim (1 cm) plitkim brazdama/naborima koje se radijalno šire

Apeks ploda: zaobljen mada može biti i blago ravan sa minimalnim udubljenjem

Tekstura kore: glatka

Prisustvo žlezda sa eteričnim uljima u kori: vrlo prisutne; miris eteričnog ulja je blag i prijatan i potseća na mandarinu

Debljina spoljašnje kore (epikarpa): 1-2 mm

Debljina unutrašnje kore (albeda, mezokarpa): 2 mm

Boja albeda: 11D žuta

Prijanjanje kore uz endokarp: slabo

Lakoća ljuštenja kore: izuzetno tanka kora se lako ljušti

Prosečan br. segmenata srži (endokarpa): 9.5

Međusobna povezanost segmenata: minimalna

Opna segmenata: srednje debljine

Lakoća ceđenja soka iz ploda korišćenjem električnog sokovnika: nije lak za ceđenje

Ostatak koji preostaje u levku električnog sokovnika nakon ceđenja soka: obilan

Aroma iscedenog soka zrelog ploda: prijatna, blaga, potseća na mandarinu

Ukus iscedenog soka zrelog ploda: prijatan, potseća na mandarinu

Prosečan br. semena u plodu: 2.5

Prosečna veličina semena: 12×6 mm

Poli/monoembriogenost semena: monoembriogenost (Slika 20.f)

7) 'Rhode Red Valencia' pomorandža + 'Dancy' mandarina

Oblik ploda: ovalan (spljošten na polovima) (Slika 6.k)

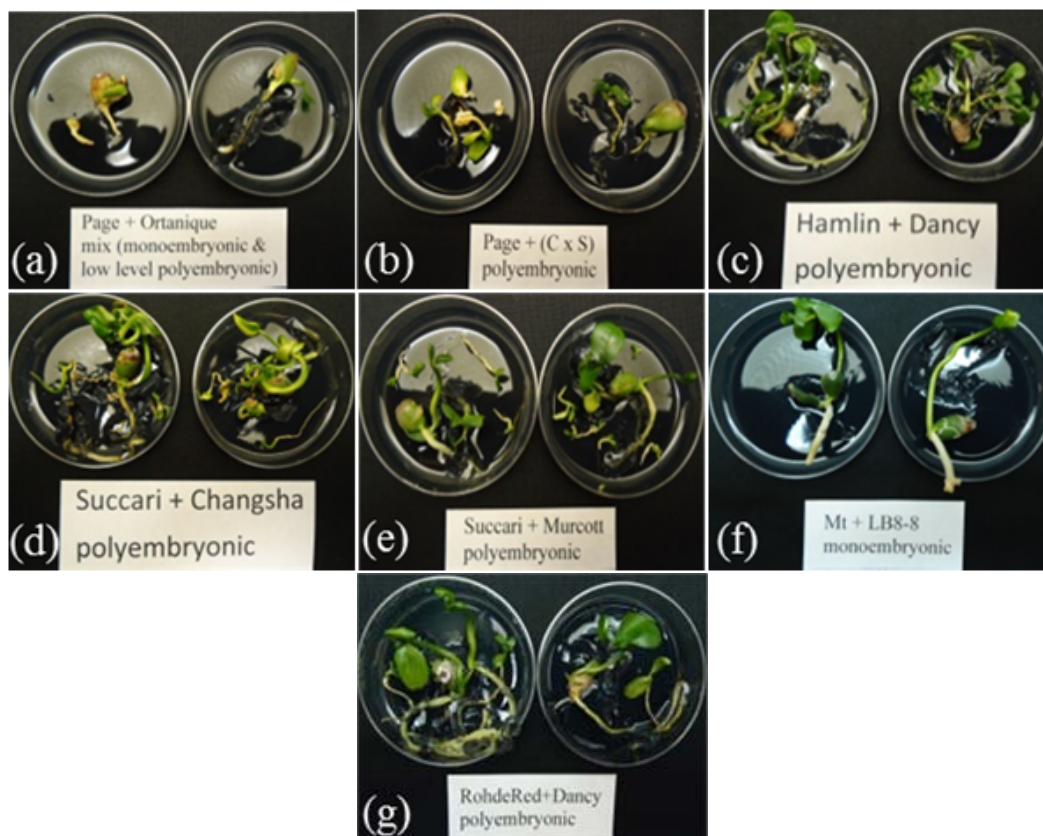
Baza ploda: zaobljena sa jedva приметnim naborima na polu

Apeks ploda: zaobljen mada može biti i blago ravan sa/bez malog udubljenja

Tekstura kore: rapava i blago rupičasta
Prisustvo žlezda sa eteričnim uljima u kori: malobrojne; kora gotovo da i ne miriše
Debljina spoljašnje kore (egzokarpa): 2-4 mm
Debljina unutrašnje kore (albeda, mezokarpa): 2 mm
Boja albeda: 11D žuta
Prijanjanje kore uz endokarp: srednje čvrsto
Lakoća ljuštenja kore: lako se ljušti
Prosečan br. segmenata srži (endokarpa): 9
Međusobna povezanost segmenata: srednje jačine
Opna segmenata: srednje debljine
Lakoća ceđenja soka iz ploda korišćenjem električnog sokovnika: lak za ceđenje
Ostatak koji preostaje u levku električnog sokovnika nakon ceđenja soka: minimalan
Raslojavanje soka od pulpe: sporo
Aroma iscedenog soka zrelog ploda: prijatna, blaga, preovladava miris mandarine
Ukus iscedenog soka zrelog ploda: prijatan, blago kiselkast, potseća na mandarine.
Prosečan br. semena u plodu: 5
Prosečna veličina semena: 19×7 mm
Poli/monoembriogenost semena: poliembriogenost (**Slika 20.g**)

Od testiranih nevarijabilnih karakteristika, za tržište svežeg voća tj. iscedenog soka pa samim tim i za process oplemenjivanja mandarina su najvažniji: lakoća ljuštenja kore; aroma i ukus iscedenog soka zrelog ploda; veličina i prosečan br. semena u plodu. Od ispitivanih somatskih hibrida, 'Page' tangelo + ('Clementine' mandarin × 'Satsuma' mandarina) i 'Hamlin' pomorandža + 'Dancy' mandarina imaju koru koja se najlakše ljušti, potom slede svi ostali dok je kod hibrida 'Succari' pomorandža + 'Murcott' tangor ljuštenje najteže u početku a onda ide lakše. Što se tiče arome i ukusa iscedenog soka, oni su vrlo prijatni kod svih sedam testiranih hibrida ali dok su kod četiri hibrida ['Succari' pomorandža + 'Murcott' tangor, 'Succari' pomorandža + 'Changsha' mandarina, 'Murcott' tangor + 'LB8-8' tangelo i 'Rhode Red Valencia' pomorandža + 'Dancy' mandarina] oni blagi i nespecifični, vrlo su jaki i specifični kod dva ['Page' tangelo + ('Clementine' mandarin × 'Satsuma' mandarina) i 'Succari' pomorandža + 'Murcott' tangor]. Sedmi hibrid 'Hamlin' pomorandža + 'Dancy' mandarina ima intermedijernu jačinu i specifičnost arome/soka.

Iako svi ispitivani hibridi imaju mali prosečan broj semena u plodu (<6), ipak se po toj karakteristici najviše ističe 'Murcott' tangor + 'LB8-8' tangelo sa samo 2.5



Slika 20. Utvrđivanje zigotnosti somatskih hibrida isklijavanjem pojedinačnih semena u Petri kutiji sa RMAN hranjivom podlogom. **(a)** Semena hibrida Page + Ortanique su monoembriogena uz prisustvo niskog nivoa poliembriogenosti. **(b)** Semena hibrida Page + (Clementine × Satsuma) su poliembriogena. **(c)** Semena hibrida Hamlin + Dancy su poliembriogena. **(d)** Semena hibrida Succari + Changsha su poliembriogena. **(e)** Semena hibrida Succari + Murcott su poliembriogena. **(f)** Semena hibrida Murcott + LB8-8 su monoembriogena. **(g)** Semena hibrida RhodeRed Valencia + Dancy su poliembriogena.

semena po plodu. Takođe, njegova semena su i najmanja 12×6 mm u odnosu na sve ostale hibride (16-19×6-8 mm). Prisustvo/odsustvo zigotskih hibrida u semenu nije samo po sebi važna karakteristika za tržište svežeg voća ali je od velike važnosti za proces oplemenjivanja mandarina pa tu treba istaći osobine dva hibrida: ‘Page’ tangelo + ‘Ortanique’ tangor kod koga u semenima preovlađuje monoembriogenost uz prisustvo niskog nivoa poliembriogenosti i ‘Murcott’ tangor + ‘LB8-8’ tangelo koji je potpuno monoembriogen.

Vrednosti spoljašnjih i unutrašnjih varijabilnih karakteristika plodova kod sedam ispitivanih somatskih hibrida u toku dve sezone sazrevanja plodova (2010/11 i 2011/12) su dati u **Tabelama 21-27**. Iz ovih tabela se vidi da su plodovi hibrida slične veličine. Ukoliko se izračunaju srednje vrednosti za težinu, visinu i prečnik ploda za pojedinačne

hibride u toku dve praćene godine sazrevanja, onda se ‘Murcott’ tangor + ‘LB8-8’ tangelo i ‘Succari’ pomorandža + ‘Changsha’ mandarina izdvajaju jedino po manjoj težini (205 g i 216 g) u odnosu na ostale hibride (250-270 g). Visina plodova kod svih sedam hibrida se kreće od 6.3 – 8.8 cm dok je prečnik 7.8 – 8.8 cm. Ovi prametri su jedino kod Hamlin + Dancy hibrida isti u različitim sezonama dok su kod ostala četiri hibrida (koji su ispitivani u obe sezone) različiti.

Po količini soka u plodu ispitivani hibridi mogu da se svrstaju u dve grupe: prva koja ima ~40-50% soka (‘Page’ tangelo + (‘Clementine’ mandarina × ‘Satsuma’, ‘Succari’ pomorandža + ‘Murcott’ tangor, ‘Rhode Red Valencia’ pomorandža + ‘Dancy’, mandarina, ‘Page’ tangelo + ‘Ortanique’ tangor) i druga koja ima samo ~20-30% soka (‘Succari’ pomorandža + ‘Changsha’ mandarina, ‘Hamlin’ pomorandža + ‘Dancy’ mandarina, ‘Murcott’ tangor + ‘LB8-8’ tangelo).



Slika 21. Uzorci iscedenog soka iz zrelih plodova nekoliko somatskih hibrida spremni za kolorimetrijsko testiranje boje pomoću elektronskog kolorimetra GretagMacbeth Color-Eye 3100.

Dobijene vrednosti za boju iscedenog soka na kolorimetru >42 spadaju u lepu tamno-pomorandžastu boju soka pri čemu vrednosti od 42-44 odgovaraju N25B&C bojama na RHS karticama dok ≥ 44 odgovara još tamnijoj šargarepa-pomorandžastoj N25A boji. Iz

Tabela 21. Varijabilne karakteristike testiranih zrelih plodova u toku dve uzastopne sezone (2010/11 & 2011/12) kod somatskog hibrida 'Page' tangelo + 'Ortanique' tangor.

P + Ort	dec 2010	jan 2011	feb 2011	mart 2011	april 2011	dec 2011	jan 2012	feb 2012	mart 2012
težina ploda (g)	213	225	235	261	258	182	360	347	338
visina (cm)	6.5	6.5	7.0	7.2	7.0	6.4	7.6	7.8	8.3
prečnik ploda (cm)	8.0	8.2	8.3	8.5	8.4	7.3	10.0	9.7	9.9
boja kore	23A	23A	24A	24A	25A	23B	23B	23A	23A
boja srži	N25D	N25C	N25B&C	N25B	N25A&B	N25D	N25C	N25C	N25B
boja soka	39.5	41.7	42.4	42.8	44.2	38.5	41.1	41.7	42.1
°briks ili TSS (%)	9	10.8	11.8	12.2	14.8	7.2	9.2	10.4	11.2
kiselost ili TA (%)	1.9	1.4	1.4	1.4	1.3	1.1	1.1	1.1	1.0
°briks/kiselost	4.7	7.7	8.4	8.7	11.4	6.5	8.4	9.5	11.2
% soka u plodu	53	48	47	47	50	46	46	48	35*

*drveće sa koga su brani plodovi za analizu soka je pretrpelo sušu

Tabela 22. Varijabilne karakteristike testiranih zrelih plodova u toku dve uzastopne sezone (2010/11 & 2011/12) kod somatskog hibrida 'Page' tangelo + ('Clementine' mandarin × 'Satsuma' mandarina).

P + (C×S)	dec 2010	jan 2011	feb 2011	mart 2011	dec 2011	jan 2012	feb 2012
težina ploda (g)	196	206	200	186	292	314	345
visina (cm)	6.5	6.1	6.0	5.8	6.3	7.9	8.7
prečnik ploda (cm)	8.1	8.5	8.0	7.9	9.3	9.6	9.9
boja kore	23A	25A	N25A	N25A	42.6	45.5	45.7
boja srži	N25C	N25A&B	N25A	N25A	24A&25A	N25A&B	N25A&B
boja soka	43.6	45.7	47.2	47.6	N25B	N25A	N25A
°briks ili TSS (%)	12	11.2	15	16	9.6	11.4	12
kiselost ili TA (%)	1.4	1.2	1.2	1.1	1.1	1.1	1.1
°briks/kiselost	8.6	9.3	12.5	14.5	8.7	10.4	10.9
% soka u plodu	38	48	46	38	46	45	36

Tabela 23. Varijabilne karakteristike testiranih zrelih plodova u toku dve uzastopne sezone (2010/11 & 2011/12) kod somatskog hibrida 'Hamlin' pomorandža + 'Dancy' mandarina.

H + D	dec 2010	jan 2011	feb 2011	nov 2011	dec 2011	jan 2012
težina ploda (g)	265	310	215	268	302	233
visina (cm)	8.4	9.2	8.2	9.0	10.1	8.0
prečnik ploda (cm)	8.5	9.0	8.0	8.9	9.7	8.0
boja kore	24A	25A&B	25A	23A	24A	24A
boja srži	23A	24A	24A	22A	23A	24A
boja soka**	37.5	38.8	40.5	35.6	35.8	37
°briks ili TAA (%)	9	9.4	11.6	10	10.2	11.4
kiselost ili TA (%)	0.75	0.76	0.70	0.65	0.65	0.60
°briks/kiselost	12	12.4	16.6	15.4	15.7	19
% soka u plodu	25	29	28	28	22*	21*

*drveće sa koga su brani plodovi za analizu soka je pretrpelo sušu

Tabela 24. Varijabilne karakteristike testiranih zrelih plodova u toku dve uzastopne sezone (2010/11 & 2011/12) kod plodova somatskog hibrida ‘Succari’ pomorandža + ‘Changsha’ mandarina.

Suc + Ch	dec 2010	jan 2011	feb 2011	nov 2011	dec 2011	jan 2012	feb 2012
težina ploda (g)	240	259	259	177	182	187	176
visina (cm)	7.5	8.1	8.2	6.7	7.1	7.1	7.0
prečnik ploda (cm)	8.2	8.4	8.3	7.4	7.5	7.4	7.4
boja kore	24A	N25A&B	N25A&B	23A	24A	25A	N25A&B
boja srži	N25D	N25B	N25A	24A&B	25A	N25B	N25B
boja soka	40.1	42.5	43.3	39.8	40.4	41.9	42.7
°briks ili TSS (%)	10.4	11.6	12.4	10.4	12.2	14	14.2
kiselost ili TA (%)	0.75	0.77	0.70	0.72	0.55	0.5	0.5
°briks/kiselost	13.9	15.1	17.7	14.4	22.2	28	28.4
% soka u plodu	17	21	23	30	27	27	23

Tabela 25. Varijabilne karakteristike testiranih zrelih plodova u toku dve uzastopne sezone (2010/11 & 2011/12) kod somatskog hibrida ‘Succari’ pomorandža + ‘Murcott’ tangor.

Suc + Mt	dec 2010	jan 2011	feb 2011	nov 2011	dec 2011	jan 2012	feb 2012
težina ploda (g)	288	291	278	231	226	213	211
visina (cm)	8.5	8.4	8.0	7.1	7.4	7.0	7.0
prečnik ploda (cm)	8.4	8.5	8.2	8.0	7.8	7.8	7.7
boja kore	N25C	N25B	N25A&B	17B&C	23A&B	24A	25A
boja srži	N25D	N25C	N25B	21A&B	21A&23A	N25C	N25B
boja soka	40.6	41.4	42.2	39.2	41.4	42.5	42.7
°briks ili TSS (%)	10.8	11.2	14	9	9.6	9.8	10
kiselost ili TA (%)	0.8	0.65	0.7	0.6	0.65	0.45	0.45
°briks/kiselost	13.5	17.2	20	15	14.8	21.8	22.2
% soka u plodu	38	37	42	43	50	47	47

Tabela 26. Varijabilne karakteristike testiranih zrelih plodova u toku druge (2011/12) sezone kod somatskog hibrida ‘Murcott’ tangor + ‘LB8-8’ tangelo (Clementine × Minneola).

Mt + LB88	nov 2011	dec 2011	jan 2012	feb 2012
težina ploda (g)	190	222	218	190
visina (cm)	6.3	6.4	6.6	6.0
prečnik ploda (cm)	8.1	8.7	8.4	8.1
boja kore	N25C	N25C	N25A&B	N25A
boja srži	24A	25B	N25B	N25B
boja soka	40.7	41.9	42.1	43.4
°briks ili TSS (%)	8.4	9	9.5	9.6
kiselost ili TA (%)	0.5	0.45	0.45	0.45
°briks/kiselost	18.6	20	21.1	21.3
% soka u plodu	28	31	35	39

Tabela 27. Varijabilne karakteristike testiranih zrelih plodova u toku druge (2011/12) sezone kod somatskog hibrida ‘Rhode Red Valencia’ pomorandža + ‘Dancy’ mandarina.

RR + D	dec 2011	jan 2012	feb 2012
težina ploda (g)	332	242	188
visina (cm)	8.1	8.1	7.1
prečnik ploda (cm)	9.1	8.0	7.7
boja kore	24A	24A	25A
boja srži	N25C	N25C&B	N25B
boja soka	40.7	41	41
°briks ili TSS (%)	8.2	8.4	8.6
kiselost ili TA (%)	1.3	1.3	1.1
°briks/kiselost	6.3	6.5	7.8
% soka u plodu	50	44	48

Tabela 21-27 se vidi da se u okviru pojedinačnih hibrida vrednosti ova tri parametra povećavaju u toku obe sezone sazrevanja plodova (2010/11 i 2011/12). To znači da obzirom da se promena boje egzokarpa, mezokarpa i iscedenog soka dešava u funkciji vremena, one postaju tamnije sa sazrevanjem plodova. Hibrid ‘Page’ tangelo + (‘Clementine’ mandarina × ‘Satsuma’ mandarina) se izdvaja od svih ostalih hibrida po tamno pomorandžastoj boji kore, srži i soka (**Slika 21**) gde skoro u svim mesecima preovlađuju boje N25A i N25B (sa najtamnije narandžaste kartice, **Slika 3.a**) a kolorimetrijska boja soka u čak 3 meseca ima vrednosti >45 (**Tabela 22**). Posle ovog hibrida, po visini vrednosti ova tri parametra se izdvajaju podjednako četiri hibrida [‘Page’ tangelo + ‘Ortanique’ tangor; ‘Succari’ pomorandža + ‘Changsha’ mandarina; ‘Succari’ pomorandža + ‘Murcott’ tangor; ‘Murcott’ tangor + ‘LB8-8’ tangelo (Clementine × Minneola); ‘Rhode Red Valencia’ pomorandža + ‘Dancy’ mandarina] kod kojih preovlađuju boje N25B&C za boju kore i srži a boja soka se kreće od 39-43 (**Tabele 21, 24-27**). Najniže vrednosti za obojenost se javljaju kod ‘Hamlin’ + ‘Dancy’ somatskog hibrida: 35.6-40.5 za boju soka; 22A -25A za boje kore i srži (**Tabela 23**). U okviru istih kultivara se uočava da u dve različite sezone sazrevanja plodova postoje razlike u sva tri parametra tako što su oni svi bili niži u drugoj sezoni (2011/12) (**Tabele 21-27**).

U sezoni sazrevanja (u obe godine) su merene još dve karakteristike koje se menjaju u toku vremena – °briks (TSS) i kiselost (TA). Za razliku od drugih merenih varijabilnih karakteristika, °briks i kiselost (kao i njihov odnos) mnogo govore o vremenu sazrevanja plodova. Iz **Tabela 21-27** se vidi da kod svakog testiranog hibrida °briks raste u toku ispitivanog perioda kao i to da kiselost opada što posledično dovodi do toga da odnos °briks/kiselost raste (TSS:TA). Ukoliko se ovi parametri porede u različitim sezonama sazrevanja u okviru istih hibrida, onda se uočava da je °briks različit u te dve uzastopne godine, da je kiselost uvek niža u drugoj sezoni (2011/12) pa je i odnos °briks/kiselost u toj sezoni viši. Tako se na osnovu ovih parametara može reći da četiri hibrida: Hamlin + Dancy, Succari + Changsha, Succari + Murcott i imaju rano dok Rhode Red Valencia + Dancy ima kasno sazrevanje plodova. Plodovi Page + (Clementine × Satsuma) i Page + Ortanique sazrevaju u sredini sezone.

4.2. Interploidna i diploidna seksualna hibridizacija

U toku dve uzastopne kalendarske godine (2011 i 2012) je pomoću tri različita tipa seksualnog ukrštanja ($2x \times 4x$; $4x \times 2x$; $2x \times 2x$) urađeno oprašivanje kod ukupno 52 roditeljske kombinacije. Genotipovi korišćeni kao muški i ženski roditelji u ovim ukrštanjima su navedeni u **Tabelama 14, 15 i 16**. Uspešne roditeljske kombinacije koje su dale plodove se nalaze u **Tabelama 29 i 31**. Cilj interploidne i diploidne seksualne hibridizacije je bio dobijanja bezsemenih triploidnih ($3x$) hibridnih biljaka (**Slika 2**).

Tabela 28. Vijabilnost polena (utvrđena bojenjem pomoću FDA i propidijum-jodida) kod muških roditelja koji su korišćeni u seksualnom ukrštanju u toku dve uzastopne kalendarske godine - 2011 i 2012.

Muški roditelj	Vijabilnost polena (%)	
	2011 god.	2012 god.
P	90	93
P + Ort	87	-
P + (C × S)	90	86
P + F	-	76
F	18	-
Mt + Ort	-	67
Mt + LB88	85	59
H + D	75	-
N + Osc	-	66
4X Suc	-	88
Suc + P	75	-
Suc + Mt	48	35
Suc + Ch	76	-
RR + D	55	-
Val + P	88	-
Val + Minn	87	-

Legenda: P = 'Page' tangelo, 4XSuc = autotetraploidni somatski hibrid 'Succari' slatka pomorandža, Ort = 'Ortanique' tangor, C = 'Clementine' mandarina, S = 'Satsuma' mandarina, H = 'Hamlin' pomorandža, D = 'Dancy' mandarina, Suc = 'Succari' pomorandža, Ch = 'Changsha' mandarina, Mt = 'Murcott' tangor, RR = 'Rhode Red Valencia' pomorandža, D = 'Dancy' mandarina, N = 'Nova' tangelo, Osc =

‘Osceola’ tangelo, Val = ‘Valencia’ pomorandža, Minn = ‘Minneola’ tangelo, F = ‘Furr’ tangor

4.2.1. Vijabilnost polena

Vijabilnost polena, koja je utvrđena histološkim bojenjem uz istovremeno korišćenje dve boje fluorescein-diacetata (FDA) i propidijum-jodida, je bila visoka kod svih polinatora u obe sezone (2011, 2012) sem kod ‘Furr’ tangora i Succar + Murcott hibrida. Kod ova dva muška roditelja vijabilnost polena je bila <50% (**Tabela 28**).

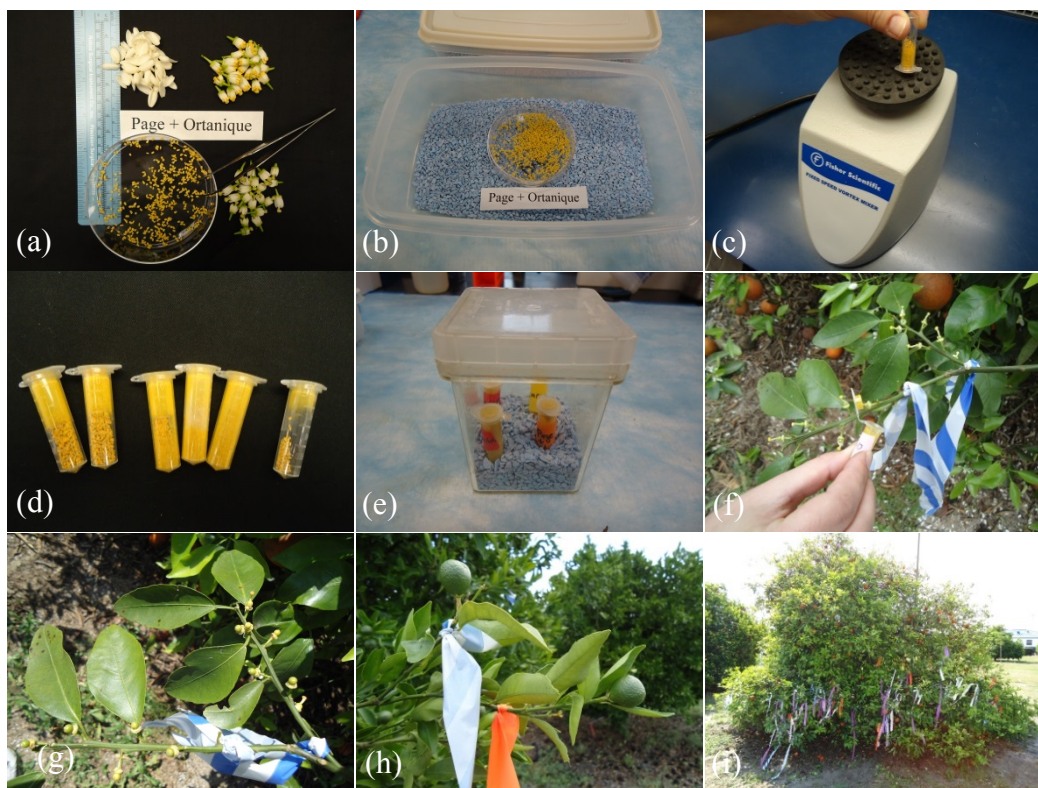
4.2.2. Utvrđivanje ukupnog broja plodova i kategorizacija semena

U 2011. godini je urađena ukupno 31 kombinacija ukrštanja tako što je polen poreklom od dva diploidna i 10 tetraploidnih muških roditelja služio za oprašivanje devet diploidnih i dva tetraploidna ženska roditelja (**Tabela 29**) (**Slike 22.a-g**). Iz ovih ukrštanja su proizašle 24 kombinacije koje su dale plodove (**Slike 22.h,i**) i sedam kombinacija koje ih nisu dale. Jedina urađena diploidna $\times$ diploidna ($2x \times 2x$) hibridizacija je bila vrlo uspešna - čak 80% oprašenih cvetova su dali plodove. Iz 28 kombinacija interploidnog ($2x \times 4x$) ukrštanja njih čak 23 su rezultirale plodovima.

Broj plodova kod ženskih roditelja koje su bile oprašene sa više od jednog muškog polinatora je zavisio upravo od vrste muškog polinatora. U tom smislu su najuspešniji ženski roditelji bili: ‘Ellendale’ (sa 5% i 8% cvetova koji su dali plodove), ‘Nules Clementine’ (36%, 38% i 46%), ‘Ambersweet’ (10%, 20% i 24%) i ‘Sugar Belle’ (34% i 40%) koje su u svakom ukrštanju davale plodove; ‘Fortune’, ‘Monreal Clementine’, ‘Lee’ i ‘Fallgo’ su ostali bez plodova u 1-2 oprašivanja. Ukoliko se pogleda uspešnost individualnih polinatora u oprašivanju nabrojanih ženskih roditelja uočava se da su P + Ort (sa 8%, 11%, 46%, 25% i 5% cvetova koji su dali plodove), P+(C $\times$ S) (23%, 9% i 40%) i M+LB88 (2%, 36%, 18%, 10%) najefikasniji jer ni jedan od ženskih roditelja koje su oni oprašili nije ostao bez plodova (za razliku od npr RR+D, H+D i Suc+Ch donora polena). Dva tetraploidna $\times$ diploidna ($4x \times 2x$) ukrštanja nisu uopšte dala plodove.

Broj semena po plodu je bio najveći kod ‘Fortune’ hibrida mandarine (10-30) i ‘Fallgo’ hibrida tangela i tangora (20-33) kod kojih i inače u plodu ima puno semena (20-40). Najmanje semena u plodu (3) je bilo kod ‘Marisol Clementine’

mandarine oprašene sa Suc+Mt. Kod drugih kombinacija je ovaj parameter varirao od 6-23 semena po plodu. Najviše semena je nađeno u plodovima proizašlim iz (2x × 2x)



Slika 22. Prikaz postipka prikupljanja polena i sprovođenje ručne polinacije u polju. **(a)** Uklanjanje latica sa cvetova i izolovanje antera uz pomoć zakrivljene metalne pincete. **(b)** Dehidratacija antera u zatvorenim plastičnim kontejnerima napunjenim sa silika gelom. **(c)** Oslobađanje polena iz antera. **(d,e)** Čuvanje dehidriranog polena u uslovima smanjene vlage. **(f)** Ručno oprašivanje emaskuliranih cvetova ženskih roditelja sa unapred izolovanim i dehidriranim polenom poreklom od muškog roditelja. **(g)** Obeležavanje oprašenih cvetova plastičnim trakama tako da specifična boja trake reprezentuje polen poreklom od različitog muškog roditelja. **(h,i)** Plodonošenje.

hibridizacije Lee × Page – 459 pri čemu je 14% njih bilo prazno tj. bez embriona. Za ova semena kategorizacija urađena po veličini (**Tabela 29**) je pokazala da su preovlađivala semena srednje veličine (5-10 mm) (II) (339/459 ili 74%). Kod 23 uspešne (2x × 4x) kombinacije su preovlađivala semena male veličine (<5mm) (I) (1533/2150 ili 71%) sem u slučaju kad su Mt+LB88 i Suc+Ch oprašili ‘Fallgo’ hibrid tangela i tangora (kod kojih je bilo najviše semena srednje veličine). U najvećem broju kombinacija gotovo i da nije bilo velikih semena (>10mm) (III) (31/2150 ili 1.4%). U svim kombinacijama je pored semena sa embrionima (b) bilo i dosta praznih (a) semena (11-83%) a njihov broj je zavisio od oba roditelja. Preračunato za sve (2x × 4x)

hibridizacije, bilo je 53% semena sa i 47% bez embriona. Desilo se da su polinatori P+Ort i P+(C×S) koji su se pokazali kao vrlo uspešni u smislu visokog procenta oprašenih cvetova koji daju plodove proizvodili veliki broj “praznih” semena. Npr. P+Ort je u oprašivanju ‘Fortune’ i ‘Fallglo’ dao 74% i 83% “praznih” semena a P+(C×S) u oprašivanju ‘Fortune’ i ‘Sugar Belle’ 74% i 67%. Polinator Mt+LB88 je u oprašivanju ‘Fortune’ doprineo vrlo niskom procentu “praznih” semena (11%) ali je zato u oprašivanju drugih taj procenat bio mnogo viši: ‘Nules Clementine’ (21%), ‘Fallglo’ (36%) i ‘Monreal Clementine’ (44%).

U 2012. godini je urađena ukupno 21 kombinacija ukrštanja - sa polenom poreklom od jednog diploidnog i sedam tetraploidnih muških roditelja je oprašeno osam diploidnih i dva tetraploidna ženska roditelja (**Tabela 31**). Kao i u prethodnoj godini, 2/3 kombinacija (14) je dalo plodove a 1/3 (7) nije. Od sedam kombinacija ukrštanja koje uopšte nisu dale plodove, čak u tri je korišćen Suc+Mt kao polinator. Jedina urađena diploidna × diploidna ($2x \times 2x$) hibridizacija je bila manje uspešna od prethodne godine pa je samo 42% oprašenih cvetova dalo plodove. Iz 18 kombinacija interploidnog ($2x \times 4x$) ukrštanja je proizašlo njih 12 sa plodovima. I ovde je zabeležen isti trend kao i u 2011. godini da je broj plodova kod ženskih roditelja koje su bile oprašene sa više od jednog muškog polinatora zavisio od vrste muškog polinatora. ‘Ambersweet’ zigotski hibrid je bio jedini ženski roditelj koji je u svim ukrštanjima (sa tri različita muška roditelja) uspešno dao plodove (18%, 25% i 40% cvetova je formiralo plodove). ‘Sugar Belle’, oprašen sa P+F, je bio najuspešniji te godine sa 63% cvetova koji su dali plodove dok je kod ‘Marisol Clementine’, ‘Fallglo’, ‘Ambersweet’ i ‘Temple’ taj parametar bio vrlo nizak i iznosio svega 0-8%. Ukoliko se analizira uspešnost individualnih polinatora u oprašivanju ženskih roditelja 2012. godine vidi se da se jedino sa polenom P+(C×S) i ‘4XSucc’ postiglo da se kod sva tri njihova oprašena ženska roditelja pojave plodovi. Za razliku od prethodne godine u kojoj je M+LB88 bio u grupi najefikasnijih polinatora, u 2012-toj nije uspeo da opraši ni jedan od dva ženska roditelja: ‘Marisol Clementine’ i ‘Temple’. Od dva tetraploidna × diploidna ($4x \times 2x$) ukrštanja samo se u jednom pojavio jedan plod koji na žalost nije imao semena.

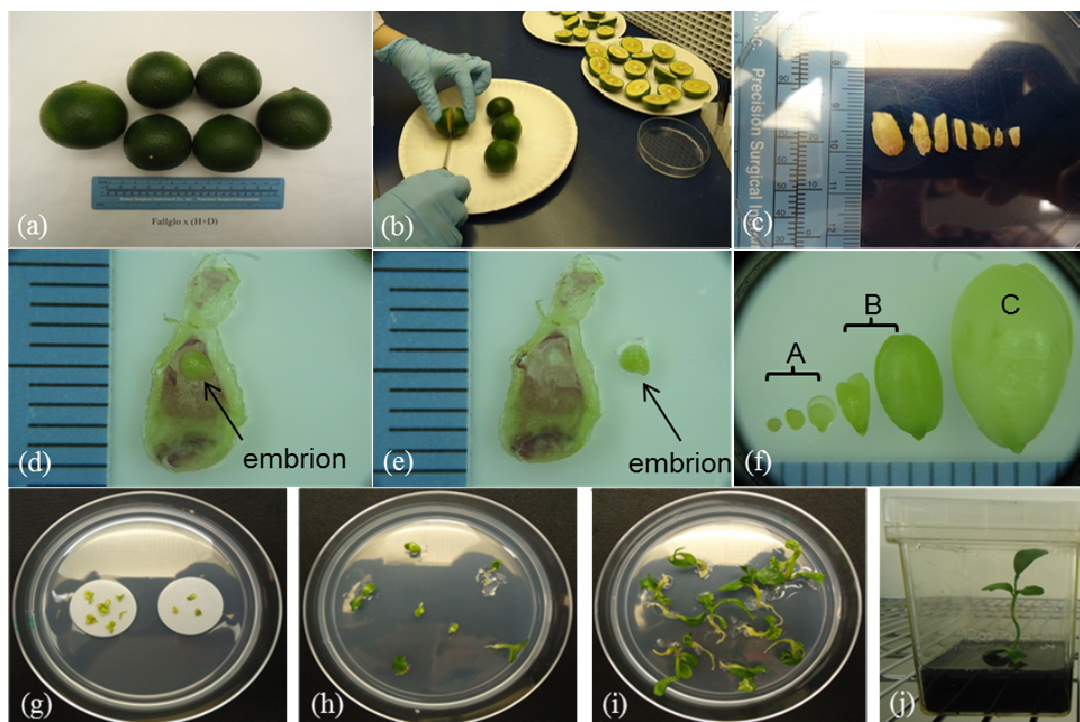
Što se tiče broja semena po plodu, ovaj parametar je bio najveći kod ‘Fallgo’ hibrida tangela i tangora (24) u oprašivanju sa P+(C×S) (**Tabela 31**). Najmanje semena u plodu (5) je bilo kod ‘Ambersweet ZH’ ukrštenog sa Suc+Mt. Kao i u 2011. godini,

najveći broj semena je proizašao iz 'Lee' × 'Page' (2x × 2x) hibridizacije – 521 pri čemu je 22% njih bilo “prazno” tj. bez embriona. Od uspešnih (2x × 4x) hibridizacija, veliki broj semena (309) je dobijen iz ukrštanja 'Sugar Belle' sa (P+F) a jako mali (12) iz ukrštanja 'Ambersweet' sa P+(C×S). Kategorizacija semena po veličini (**Tabela 31**) je pokazala da su u (2x × 2x) hibridizaciji kao i u prethodnoj godini preovlađivala semena srednje veličine (5-10 mm) (II) (439/521 ili 84%) dok su u (2x × 4x) hibridizacijama preovlađivala semena male veličine (<5mm) (I) (816/921 ili 89%). Kod (2x × 4x) hibridizacija je u ovoj godini za razliku od prethodne bilo nešto više velikih semena (>10mm) (III) (56/921 ili 6%). Kao i u prethodnoj godini, u svim kombinacijama (2x × 4x) ukrštanja je pored semena sa embrionima (b) (59%) bilo i dosta “praznih” (a) semena (41%). Broj “praznih” semena je zavisio od oba roditelja. Npr. polinator P+F koji je bio najuspešniji i postigao da čak 63% oprašenih cvetova 'Sugar Belle' da plodove je ujedno činio da 62% od ukupnih semena bude “prazno”. Dalje, Suc+Mt je u oprašivanju 'Marisol Clementine' doprineo da 90% semena bude “prazno” a u oprašivanju 'Ambersweet ZH' samo 7%. To su ujedno bile najveća i najmanja vrednost ovog parametra.

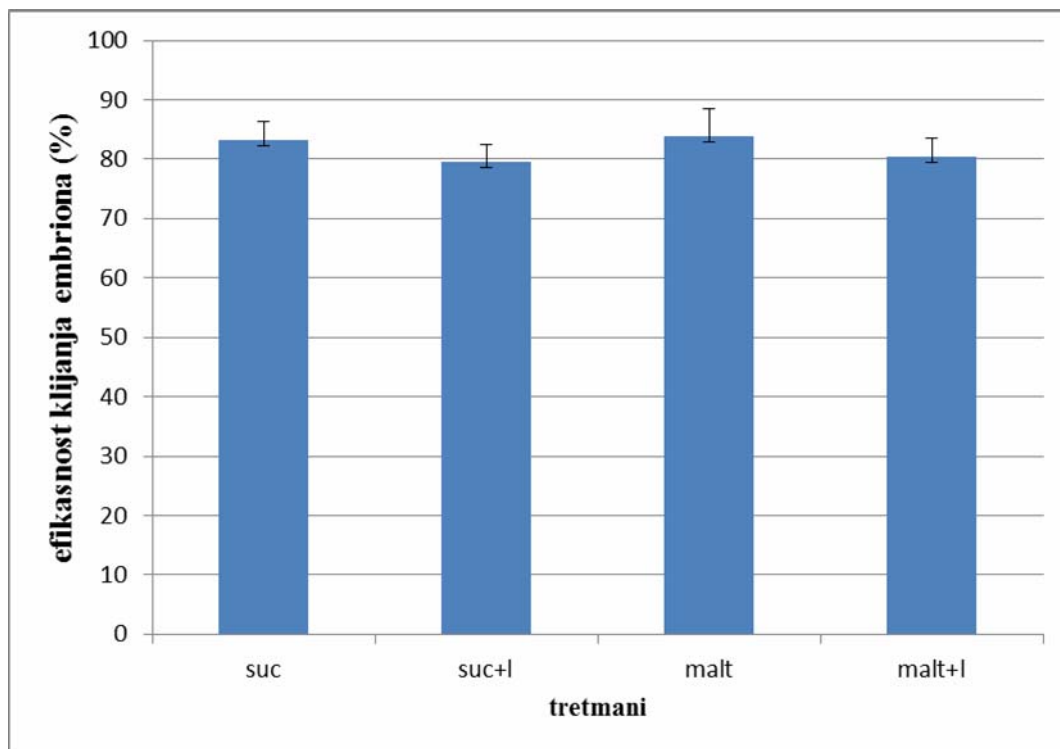
4.2.3. Kultura (“spašavanje”) zigotskih embriona

Sve faze postupaka kulture (“spašavanje”) zigotskih embriona tj. “embrio rescue” tehnika je prikazana na **Slici 23**. Efikasnost klijanja (**Grafikon 4**) izolovanih zigotskih embriona proisteklih iz seksualnog ukrštanja testirana je na dve različite indukcijske agarne hranljive podloge: 0.15 M EME-suc (sa 50g/l saharoze) i 0.15 M EME-malt (sa 50 g/l maltoze) (**Tabela 1**). Takođe su upoređene dve različite tehnike postavljanja embriona na ove hranljive podloge (direktno na površinu hranljive podloge ili indirektno na “vlažni” aceto-celulozni filter papir postavljen preko hranljive podloge - **Slika 23.g**).

Iz **Grafikona 4** se vidi da su sva četiri tretmana vrlo uspešna u indukovanju klijanja izolovanih embriona (83.2%, 79.6%, 83.8% i 80.5%) i da nema značajnih razlika u testiranom parametru. Stoga je najjednostavniji i najjeftiniji tretman - direktno postavljanje embriona na 0.15 M EME-suc čvrstu hranljivu podlogu (na **Grafikonu 4** obeležen kao **suc**) izabran za korišćenje u svim sledećim eksperimentima “spašavanja” embriona.



Slika 23. Detaljan prikaz “embryo rescue” tehnike. **(a-c)** Ekstrakcija semena iz nezrelih plodova. **(d,e)** “Spašavanje” embriona (seksualnih hibrida) iz semena pomoću hirurškog skalpela i mikropincete. **(f)** Svrstavanje embriona u tri kategorije na osnovu njihove razvojne faze u momentu izolovanja: globularna, srcasta i rana kotiledonarna faza (A); faza nezrelih embriona sa kotiledonima (B); faza zrelih embriona (C). **(g-j)** *In vitro* klijanje i rast embriona na različitim hranljivim podlogama.



Grafikon 4. Efikasnost klijanja (%) embriona proisteklih iz seksualnog ukrštanja u 2011. godini na četiri različita tretmana: **suc** = direktno postavljanje embriona na 0.15 M EME-suc čvrstu hranljivu podlogu; **suc+l** = indirektno postavljanje embriona na 0.15 M EME-suc čvrstu hranljivu podlogu preko 'vlažnih' aceto-celuloznih filter papira; **malt** = direktno postavljanje embriona na 0.15 M EME-malt čvrstu hranljivu podlogu; **malt+l** = indirektno postavljanje embriona na 0.15 M EME-malt čvrstu hranljivu podlogu preko 'vlažnih' aceto-celuloznih filter papira. Vrednosti merenog parametra na pojedinačnim tretmanima su prikazane kao srednje vrednosti $\pm$ standardna greška.

4.2.4. Kategorizacija izolovanih embriona i utvrđivanje nivoa ploidnosti

Sve kombinacije (24) koje su dale semena u 2011. godini su dale triploidne (3x) biljke (**Tabela 30**) (nivo ploidnosti je utvrđen pomoću "flow" citometrije). Nekoliko (10) kombinacija je dalo tetraploidne (4x) biljke ali je taj broj bio zanemarljiv (25) u odnosu na broj 3x biljaka (573). Dobijene tetraploidne biljke nisu preživele uslove gajenja u *in vitro* kulturi. Obzirom da su embrioni bili razvrstani u tri kategorije na osnovu razvojne faze u trenutku izolovanja iz semena, to se iz **Tabele 30** može videti da je najveći broj potpuno razvijenih 3x biljaka (#FD) proistekao iz prve kategorije najnerazvijenijih embriona (u globularnoj/ranoj kotiledonarnoj fazi). Naime, iz jedine urađene (2x $\times$ 2x) hibridizacije je iz prve kategorije embriona proisteklo devet a iz interploidnog (2x $\times$ 4x) ukrštanja čak 543 triploidne biljke. Poređenja radi, iz preostale dve kategorije (nezrelih i

zrelih embriona) je iz oba tipa ukrštanja zajedno proistekla 21 triploidna biljka. Kombinacija koja je dala najviše triploida (131) je 'Nules Clementine' mandarina × (P+O) dok je 'Marisol Clementine' mandarina × (Suc+Mt) dala samo jednu. Sve ostale kombinacije ukrštanja su imale intermedijernu proizvodnju triploida od 3-72.

Ukoliko se broj triploidnih seksualnih hibrida preračuna po dobijenom plodu dobija se tzv. efikasnost triploidne proizvodnje za svaku pojedinačnu kombinaciju hibridizacije (**Tabela 30**). Ako se iz 2011. godine od 28 kombinacija interploidnog ($2x \times 4x$) ukrštanja izuzme 5 kombinacija koje uopšte nisu dale plodove ['Fortune' × (Suc+Ch); 'Fortune' × (RR+D); 'Monreal Clementine' × (Suc+Mt); 'Lee' × (H+D); 'Fallglo' × (Suc+Mt)] ostaju 23 ukrštanja kod kojih se efikasnost triploidne proizvodnje kretala od 0.3 ['Lee' × (P+Ort)] do 16 ['Fortune' × (Mt+LB88)]. Srednja vrednost ovog parametra je za sve ($2x \times 4x$) hibridizacije zajedno u toj godini bila 4.8. Kod ženskih roditelja koji su bili oprašeni sa više od jednog polinatora efikasnost triploidne proizvodnje je bila različita i upravo zavisila od vrste polinatora. Najuspešniji ženski roditelji koji su u svakom ukrštanju dali plodove su imali visoke vrednosti za ovaj važan parametar: 'Ellendale' (3.0 i 8.5), 'Nules Clementine' (2.7, 4.0 i 7.7), 'Ambersweet' (2.3, 4.0 i 6.0) i 'Sugar Belle' (1.9 i 4.3). Ukoliko se analiziraju polinatori koji su u oprašivanju više od jednog ženskog roditelja u svim ukrštanjima uspešno dali plodove uočava se da je Mt+LB88 bio najefikasniji jer je u svim tim ukrštanjima dao veliki broj triploidnih biljaka po plodu: četiri (sa 'Nules Clementine'), pet (sa 'Monreal Clementine'), šest (sa 'Fallglo') i 16 (sa 'Fortune'). Broj triploidnih seksualnih hibrida po plodu je kod jedine urađene ($2x \times 2x$) hibridizacije bio 1.2 (17/20).

Od ukupno 13 kombinacija koje su dale semena u drugoj sezoni (2012), 11 kombinacija je dalo triploidne ($3x$) biljke; od ovih 11 kombinacija je bilo tri koje su dale tetraploidne ($4x$) biljke (**Tabela 32**) (nivo ploidnosti je u oba slučaja utvrđen pomoću "flow" citometrije). Broj $4x$ biljaka je bio zanemarljiv (6) u odnosu na broj $3x$ biljaka (145). Kao i u prethodnoj godini, dobijene tetraploidne biljke nisu preživele uslove gajenja u *in vitro* kulturi. Iz **Tabele 32** se može videti da je najveći broj potpuno razvijenih $3x$ biljaka (#FD) (133/145) proistekao iz prve kategorije najnerazvijenijih embriona (u globularnoj/ranoj kotiledonarnoj fazi). Tako je iz ($2x \times 2x$) hibridizacije iz prve kategorije proisteklo 11 a iz interploidnog ($2x \times 4x$) ukrštanja 122 triploidne biljke. Poređenja radi, iz preostale dve kategorije (nezrelih i zrelih embriona) je iz oba tipa

ukrštanja zajedno proisteklo 12 triploidnih biljaka. Najviše triploida u 2012-oj godini su dali 'Fallglo' mandarina $\times$ P+(C $\times$ S) (36) i 'Sugar Belle' mandarina $\times$ (P+F) (34). Sve ostale kombinacije ukrštanja proizvele su od 0-27 triploida.

Ukoliko se, kao i u prethodnoj godini, broj dobijenih triploidnih seksualnih hibrida preračuna po plodu, onda se za svaku pojedinačnu kombinaciju (2x $\times$ 4x) hibridizacije (**Tabela 32**) (a njih 12 je dalo plodove) dobija efikasnost triploidne proizvodnje od 0.1 ['Ambersweet ZH' $\times$ (N+Osc)] do 8.8 ['Fallglo' $\times$ P+(C $\times$ S)]. Srednja vrednost ovog parametra je za sve (2x $\times$ 4x) hibridizacije zajedno u toj godini bila 1.9. I ovde je zabeležen isti trend kao i u 2011. godini da je kod ženskih roditelja koji su bili oprašeni sa više od jednog polinatora efikasnost triploidne proizvodnje bila različita i zavisila od vrste polinatora. Međutim, 'Ambersweet' zigotski hibrid, kao jedini ženski roditelj koji je u 2012 godini u svim ukrštanjima (sa tri različita muška roditelja) uspešno dao plodove, je imao vrlo niske vrednosti efikasnosti triploidne proizvodnje: 0 (sa Suc+Mt), 0.1 (sa N+Osc) i 1.0 (sa '4XSuc'). Dalje, 'Sugar Belle', oprašen sa P+F, koji je te godine bio najuspešniji sa 63% cvetova koji su dali plodove je imao efikasnost triploidne proizvodnje od samo 1.4 dok je 'Fallglo' oprašen sa P+(C $\times$ S) imao samo 4% oprašenih cvetova koji su dali plodove ali je zato postigao najveću efikasnost triploidne proizvodnje od 8.8. Ukoliko se analiziraju polinatori koji su u oprašivanju više od jednog ženskog roditelja u svim ukrštanjima uspešno dali plodove uočava se da je to postigao jedino '4XSuc' tako što je u tim ukrštanjima dao intermedijerni broj triploidnih biljaka po plodu: 1.0 (sa 'Ambersweet ZH'), 1.3 (sa 'Ambersweet'), i 4.0 (sa 'Temple'). Broj triploidnih seksualnih hibrida po plodu je kod jedine urađene (2x $\times$ 2x) hibridizacije bio 0.3 (12/35).

Tabela 29. Analiza plodova koje su dali ženski roditelji nakon ručnog oprašivanja u 2011. godini sa polenom različitih muških roditelja i razvrstavanje ukupnog broja ekstrahovanih semena iz tih plodova u kategorije I, II & III (na osnovu veličine i razvijenosti endosperma) i podkategorije a i b (na osnovu odsustva / prisustva embriona).

			Br.	Br.	Br. semena							
Ženski roditelj	×	Muški roditelj	oprašenih cvetova	dobijenih plodova	Ukupno	I		II		III		Po plodu
						a	b	a	b	a	b	
Ellendale		P+Ort	50	4	69	15	46	5	2	0	1	17
		RR+D	22	1	11	2	4	5	0	0	0	11
Fortune		P+Ort	76	8	190	115	39	26	10	0	0	24
		P+(C×S)	30	7	141	54	21	50	16	0	0	20
		Mt+LB88	45	1	27	3	24	0	0	0	0	27
		H+D	49	2	60	17	25	15	3	0	0	30
		Suc+Mt	76	3	29	11	10	0	1	0	7	10
		Suc+Ch	30	0	-	-	-	-	-	-	-	-
		RR+D	20	0	-	-	-	-	-	-	-	-
		Suc+Mt	11	1	3	1	2	0	0	0	0	3
Marisol Clementine		P+Ort	37	17	350	72	219	19	36	0	4	21
		Mt+LB88	14	5	38	8	26	0	2	0	2	8
		Suc+Mt	8	3	17	5	11	0	0	0	1	6
Monreal Clementine		Mt+LB88	40	7	97	41	48	2	3	0	3	14
		Suc+Mt	2	0	-	-	-	-	-	-	-	-
Lee		P	25	20	459	27	50	38	301	0	43	23
		P+Ort	8	2	35	14	16	3	2	0	0	18
		H+D	3	0	-	-	-	-	-	-	-	-
Fallglo		P+Ort	21	1	23	19	4	0	0	0	0	23
		P+(C×S)	34	3	74	10	32	19	13	0	0	25
		Mt+LB88	20	2	59	7	12	14	26	0	0	30
		H+D	100	7	229	38	92	47	52	0	0	33
		Suc+Mt	37	0	-	-	-	-	-	-	-	-
		Suc+Ch	80	4	79	3	8	12	56	0	0	20

Tabela 29. (nastavak)

Ženski roditelj	Muški roditelj	Br. oprašenih cvetova	Br. dobijenih plodova	Br. semena							
				Ukupno	I		II		III		Po plodu
					a	b	a	b	a	b	
Sugar Belle	P+(C×S)	40	16	225	120	63	31	11	0	0	14
	RR+D	32	11	252	90	80	74	8	0	0	23
Ambersweet	Suc + P	25	6	51	12	29	1	6	0	3	9
	Val + P	10	1	18	2	10	1	2	0	3	18
	Val + Minn	25	5	73	16	37	7	6	0	7	15
P + Ort	F	16	0	-	-	-	-	-	-	-	-
Mt + LB8-8	F	10	0	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: Ia) mala semena bez embriona i sa nepostojećim endospermom; Ib) mala semena sa embrionom i sa nepostojećim endospermom; IIa) srednja semena bez embriona i sa ostacima endosperma; IIb) srednja semena sa embrionom i sa ostacima endosperma; IIIa) srednja semena bez embriona i sa normalno razvijenim endospermom; IIIb) velika semena sa embrionom i sa normalno razvijenim endospermom; P = 'Page' tangelo, 4XSuc = autotetraploidna 'Succari' pomorandža, Suc = 'Succari' pomorandža, Val = 'Valencia' pomorandža, Ort = 'Ortanique' tangor, C = 'Clementine' mandarina, S = 'Satsuma' mandarina, H = 'Hamlin' pomorandža, D = 'Dancy' mandarina, Ch = 'Changsha' mandarina, Mt = 'Murcott' tangor, RR = 'Rhode Red Valencia' pomorandža, D = 'Dancy' mandarina, Minn = 'Minneola' tangelo, F = 'Furr' tangor, LB8-8 = hibrid 'Clementine' mandarine × Minneola tangelo.

Tabela 30. Klijanje (%) zigotskih embriona gajenih u uslovima *in vitro* i nivo ploidnosti embriona proisteklih iz seksualnog ukrštanja u 2011. godini i svrstanih u 3 kategorije na osnovu njihove razvojne faze u trenutku izolovanja iz semena.

Ženski roditelj ×	Muški roditelj	Razvojna faza embriona					
		Globularna / rana kotiledonarna faza					
		#T	#G	#FD	2x	3x	4x
Ellendale	P+Ort	48	40	33	0	33	0
	RR+D	4	3	3	0	3	0
Fortune	P+Ort	45	27	25	0	25	0
	P+(C×S)	28	16	15	0	15	0
	Mt+LB88	24	18	16	0	16	0
	H+D	24	18	17	0	17	0
	Suc+Mt	10	8	8	0	8	0
	Suc+Ch	-	-	-	-	-	-
	RR+D	-	-	-	-	-	-
Marisol Clem.	Suc+Mt	2	2	1	0	1	0
Nules Clem.	P+Ort	249	181	143	14	129	1
	Mt+LB88	27	22	21	1	20	0
	Suc+Mt	11	10	9	1	8	0
Monreal Clem.	Mt+LB88	48	47	35	0	34	1
	Suc+Mt	-	-	-	-	-	-
Lee	P	70	70	70	61	9	0
	P+Ort	16	6	6	0	6	0
	H+D	-	-	-	-	-	-
Fallglo	P+Ort	4	4	4	1	3	0
	P+(C×S)	40	32	25	1	24	0
	Mt+LB88	21	14	12	0	12	0
	H+D	122	99	78	6	72	0
	Suc+Mt	-	-	-	-	-	-
	Suc+Ch	15	13	12	8	4	0
Sugar Belle	P+(C×S)	70	54	30	0	30	0
	RR+D	88	61	50	3	47	0
Ambersweet	Suc + P	34	33	28	15	13	0
	Val + P	11	9	6	1	5	0
	Val + Minn	39	23	21	3	18	0
P + Ort	F	-	-	-	-	-	-
Mt + LB8-8	F	-	-	-	-	-	-

Tabela 30. (nastavak)

Ženski roditelj × Muški roditelj		Razvojna faza embriona					
		Faza nezrelih embriona					
		#T	#G	#FD	2x	3x	4x
Ellendale	P+Ort	0	0	0	0	0	0
	RR+D	0	0	0	0	0	0
Fortune	P+Ort	4	4	4	0	1	3
	P+(C×S)	4	4	4	4	0	0
	Mt+LB88	0	0	0	0	0	0
	H+D	4	3	3	0	0	3
	Suc+Mt	8	8	8	7	0	1
	Suc+Ch	-	-	-	-	-	-
	RR+D	-	-	-	-	-	-
Marisol Clem.	Suc+Mt	0	0	0	0	0	0
Nules Clem.	P+Ort	6	4	4	2	2	0
	Mt+LB88	1	1	1	1	0	0
	Suc+Mt	0	0	0	0	0	0
Monreal Clem.	Mt+LB88	3	3	3	2	1	0
	Suc+Mt	-	-	-	-	-	-
Lee	P	284	268	264	259	5	0
	P+Ort	2	2	2	0	1	1
	H+D	-	-	-	-	-	-
Fallglo	P+Ort	0	0	0	0	0	0
	P+(C×S)	5	4	4	4	0	0
	Mt+LB88	17	15	8	8	0	0
	H+D	8	7	5	5	0	0
	Suc+Mt	-	-	-	-	-	-
	Suc+Ch	39	39	39	39	0	0
	Sugar Belle	P+(C×S)	4	3	3	2	1
	RR+D	0	0	0	0	0	0
Ambersweet	Suc + P	1	1	1	0	1	0
	Val + P	1	1	1	0	1	0
	Val + Minn	4	3	3	0	1	2
P + Ort	F	-	-	-	-	-	-
Mt + LB8-8	F	-	-	-	-	-	-

Tabela 30. (nastavak)

		Razvojna faza embriona						Br.
Ženski roditelj ×	Muški roditelj	Faza zrelih embriona						triploida po plodu
		#T	#G	#FD	2x	3x	4x	
Ellendale	P+Ort	1	1	1	0	1	0	8.5
	RR+D	0	0	0	0	0	0	3.0
Fortune	P+Ort	0	0	0	0	0	0	3.3
	P+(C×S)	5	5	4	2	1	1	2.3
	Mt+LB88	0	0	0	0	0	0	16.0
	H+D	0	0	0	0	0	0	8.5
	Suc+Mt	0	0	0	0	0	0	2.7
	Suc+Ch	-	-	-	-	-	-	-
	RR+D	-	-	-	-	-	-	-
Marisol Clem.	Suc+Mt	0	0	0	0	0	0	1.0
Nules Clem.	P+Ort	4	4	4	0	0	4	7.7
	Mt+LB88	2	1	1	1	0	0	4.0
	Suc+Mt	1	1	1	1	0	0	2.7
Monreal Clem.	Mt+LB88	3	3	3	3	0	0	5.0
	Suc+Mt	-	-	-	-	-	-	-
Lee	P	40	40	39	36	3	0	1.2
	P+Ort	0	0	0	0	0	0	0.3
	H+D	-	-	-	-	-	-	-
Fallglo	P+Ort	0	0	0	0	0	0	3.0
	P+(C×S)	0	0	0	0	0	0	8.0
	Mt+LB88	0	0	0	0	0	0	6.0
	H+D	14	14	14	14	0	0	10.3
	Suc+Mt	-	-	-	-	-	-	-
	Suc+Ch	10	10	10	9	1	0	1.3
Sugar Belle	P+(C×S)	0	0	0	0	0	0	1.9
	RR+D	0	0	0	0	0	0	4.3
Ambersweet	Suc + P	3	3	3	1	0	2	2.3
	Val + P	3	3	3	1	0	2	6.0
	Val + Minn	7	7	7	2	1	4	4.0
P + Ort	F	-	-	-	-	-	-	-
Mt + LB8-8	F	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: #T = ukupan broj izolovanih embriona; #G= br. prokljalih embriona; #FD= br. u potpunosti razvijenih biljaka; 2x,3x,4x = nivo ploidnosti testiranih biljaka; Skraćenice za imena kultivara su iste kao u Tabeli 29.

Tabela 31. Analiza plodova koje su dali ženski roditelji nakon ručnog oprašivanja u 2012. godini sa polenom različitih muških roditelja i razvrstavanje ukupnog broja ekstrahovanih semena iz tih plodova u kategorije I, II & III (na osnovu veličine i razvijenosti endosperma) i podkategorije a&b (na osnovu odsustva / prisustva embriona).

			Br.	Br.	Br. semena							
Ženski roditelj	×	Muški roditelj	oprašenih cvetova	dobijenih plodova	Ukupno	I		II		III		Po plodu
						a	b	a	b	a	b	
Marisol Clementine		Mt+LB88	6	0	-	-	-	-	-	-	-	-
		Suc+Mt	25	2	21	19	2	0	0	0	0	11
Lee		P	84	35	521	40	40	76	363	0	2	15
Fallglo		P+(C×S)	100	4	97	16	56	12	7	0	6	24
		Suc+Mt	90	0	-	-	-	-	-	-	-	-
Sugar Belle		P + F	40	25	309	185	116	6	1	0	1	12
Amberswee		P+(C×S)	100	1	12	7	3	0	1	0	1	12
		4X Succ	100	4	45	11	22	4	2	2	4	11
		Suc+Mt	70	0	-	-	-	-	-	-	-	-
Ambersweet Z.Hybrid		N + Osc	20	8	145	33	107	2	1	0	2	18
		4X Suc	55	10	131	31	94	4	2	0	0	13
		Suc+Mt	12	3	14	1	11	0	1	0	1	5
G96		Suc+Mt	9	1	18	8	1	0	0	0	9	18

Tabela 31. (nastavak)

Ženski roditelj	Muški roditelj	Br. oprašenih cvetova	Br. dobijenih plodova	Br. semena							
				Ukupno	I		II		III		Po plodu
					a	b	a	b	a	b	
Temple	P+(C×S)	100	5	59	20	29	1	0	2	7	12
	Mt + Ort	100	5	53	6	28	1	2	0	16	11
	Mt+LB88	63	0	-	-	-	-	-	-	-	-
	N + Osc	54	0	-	-	-	-	-	-	-	-
	4× Succ	80	2	17	0	10	2	0	1	4	9
	Suc+Mt	22	0	-	-	-	-	-	-	-	-
	(Succ + HBP)	50	0	-	-	-	-	-	-	-	-
(M + LB88)	P	32	1	0	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: Ia) mala semena bez embriona i sa nepostojećim endospermom; Ib) mala semena sa embrionom i sa nepostojećim endospermom; IIa) srednja semena bez embriona i sa ostacima endosperma; IIb) srednja semena sa embrionom i sa ostacima endosperma; IIIa) srednja semena bez embriona i sa normalno razvijenim endospermom; IIIb) velika semena sa embrionom i sa normalno razvijenim endospermom. P = 'Page' tangelo, 4XSuc = autotetraploidna 'Succari' pomorandža, Suc = 'Succari' pomorandža, Val = 'Valencia' pomorandža, Ort = 'Ortanique' tangor, C = 'Clementine' mandarina, S = 'Satsuma' mandarina, H = 'Hamlin' pomorandža, D = 'Dancy' mandarina, Ch = 'Changsha' mandarina, Mt = 'Murcott' tangor, RR = 'Rhode Red Valencia' pomorandža, D = 'Dancy' mandarina, Minn = 'Minneola' tangelo, F = 'Furr' tangor, LB8-8 = hibrid 'Clementine' mandarine × 'Minneol'a tangelo; G96 = hibrid trolisne pomorandže, N = 'Nova' tangelo, Osc = 'Osceola' tangelo, HBP = 'Hirado Buntan' pamelu.

Tabela 32. Klijanje (%) zigotskih embriona gajenih u uslovima *in vitro* i nivo ploidnosti embriona proisteklih iz seksualnog ukrstanja u 2012. godini i svrstanih u 3 kategorije na osnovu njihove razvojne faze u trenutku izolovanja iz semena.

Ženski roditelj ×	Muški roditelj	Razvojna faza embriona					
		Globularna - rana kotiledonarna faza					
		#T	#G	#FD	2x	3x	4x
Marisol Clem.	Mt+LB88	-	-	-	-	-	-
	Suc+Mt	2	1	1	0	1	0
Lee	P	298	289	255	244	11	0
Fallglo	P+(C×S)	62	48	33	0	33	0
	Suc+Mt	-	-	-	-	-	-
Sugar Belle	P + F	117	74	43	9	34	0
Ambersweet	P+(C×S)	3	0	0	0	0	0
	4X Succ	22	16	9	5	4	0
	Suc+Mt	-	-	-	-	-	-
Ambersweet ZH	N + Osc	107	103	95	94	1	0
	4X Suc	95	92	85	75	10	0
	Suc+Mt	11	10	10	10	0	0
G96	Suc+Mt	3	1	1	1	0	0
Temple	P+(C×S)	29	24	24	0	24	0
	Mt + Ort	30	21	11	1	10	0
	Mt+LB88	-	-	-	-	-	-
	N + Osc	-	-	-	-	-	-
	4X Succ	10	10	5	0	5	0
	Suc+Mt	-	-	-	-	-	-
	(Succ + HBP)	-	-	-	-	-	-
(M + LB88)	P	-	-	-	-	-	-

Tabela 32. (nastavak)

Ženski roditelj×	Muški roditelj	Razvojna faza embriona					
		Faza nezrelih embriona					
		#T	#G	#FD	2x	3x	4x
Marisol Clem.	Mt+LB88	-	-	-	-	-	-
	Suc+Mt	0	0	0	0	0	0
Lee	P	103	103	100	99	1	0
Fallglo	P+(C×S)	1	1	1	1	0	0
	Suc+Mt	-	-	-	-	-	-
Sugar Belle	P + F	0	0	0	0	0	0
Ambersweet	P+(C×S)	1	1	1	0	0	1
	4X Succ	2	2	2	0	1	1
	Suc+Mt	-	-	-	-	-	-
Ambersweet ZH	N + Osc	1	1	0	0	0	0
	4X Suc	1	1	1	1	0	0
	Suc+Mt	1	0	0	0	0	0
G96	Suc+Mt	0	0	0	0	0	0
Temple	P+(C×S)	0	0	0	0	0	0
	Mt + Ort	0	0	0	0	0	0
	Mt+LB88	-	-	-	-	-	-
	N + Osc	-	-	-	-	-	-
	4X Succ	0	0	0	0	0	0
	Suc+Mt	-	-	-	-	-	-
	(Succ + HBP)	-	-	-	-	-	-
(M + LB88)	P	-	-	-	-	-	-

Tabela 32. (nastavak)

Ženski roditelj× Muški roditelj		Razvojna faza embriona						Br. triploida po plodu
		Faza zrelih embriona						
		#T	#G	#FD	2x	3x	4x	
Marisol Clem.	Mt+LB88	-	-	-	-	-	-	-
	Suc+Mt	0	0	0	0	0	0	0.5
Lee	P	4	4	4	4	0	0	0.3
Fallglo	P+(C×S)	6	6	6	4	2	0	8.8
	Suc+Mt	-	-	-	-	-	-	-
Sugar Belle	P + F	1	1	1	1	0	0	1.4
Ambersweet	P+(C×S)	1	1	1	0	0	1	0
	4X Succ	4	4	4	2	0	2	1.3
	Suc+Mt	-	-	-	-	-	-	-
Ambersweet ZH	N + Osc	2	1	1	1	0	0	0.1
	4X Suc	0	0	0	0	0	0	1.0
	Suc+Mt	1	0	0	0	0	0	0
G96	Suc+Mt	7	7	7	7	0	0	0
Temple	P+(C×S)	7	7	7	4	3	0	5.4
	Mt + Ort	16	14	7	5	2	0	2.4
	Mt+LB88	-	-	-	-	-	-	-
	N + Osc	-	-	-	-	-	-	-
	4X Succ	4	4	4	0	3	1	4.0
	Suc+Mt	-	-	-	-	-	-	-
	(Succ + HBP)	P	-	-	-	-	-	-
(M + LB88)	P	-	-	-	-	-	-	

Legenda: #T = ukupan broj izolovanih embriona; #G= br. prokljalih embriona; #FD= br. u potpunosti razvijenih biljaka; 2x,3x,4x = nivo ploidnosti testiranih biljaka; Skraćenice za imena kultivara su iste kao u Tabeli 31.

5. DISKUSIJA

Rezultati predstavljeni u ovoj doktorskoj disertaciji imaju veliki značaj za proces oplemenjivanja mandarina i dobijanja novih bezsemenih kultivara sa pretežno mandarinskim poreklom. Primenjene su metode somatske i seksualne hibridizacije koje se zadnjih par decenija intenzivno koriste u svim velikim svetskim centrima i programima za oplemenjivanje citrusa. Primenom ove dve metode dolazi do izmene i nivoa ploidnosti mandarina da bi se kao krajnji proizvod dobile triploidne hibridne biljke sa novim genotipskim kombinacijama (**Slika 2**). Očekuje se da novostvoreni triploidni hibridi imaju plodove koji su unapređeni u odnosu na roditeljske u smislu da su istovremeno visokokvalitetni i bezsemeni.

5.1. Somatska hibridizacija (fuzija protoplasta)

U cilju oplemenjivanja i dobijanja novih hibrida mandarina najvažniji rezultat prvog dela doktorske disertacije je bio da se putem somatske hibridizacije tj. fuzije protoplasta stvore nove alo- i autotetraploidne biljke iz komercijalno popularnih diploidnih roditelja čiji su plodovi izuzetnog kvaliteta, ali nisu bezsemeni. Obzirom na aditivnu prirodu fuzije protoplasta i nepostojanje rekombinacije/ segregacije na tetraploidnom nivou, somatskom hibridizacijom se zadržava izuzetan kvalitet roditeljskih plodova i samo se prenosi na triploidno potomstvo u sledećoj fazi unapređenja mandarina – interploidnom seksualnom ukrštanju ($2x \times 4x$; $4x \times 2x$) putem kontrolisane ručne polinacije. Dakle, u interploidnom seksualnom ukrštanju se prenosi dobar kvalitet ploda sa tetraploidnog na triploidni nivo a bezsemenost se u triploidnom potomstvu pojavljuje kao nova sadržana karakteristika plodova. Kod triploidnih hibrida je bezsemenost posledica postojanja neparnog broja hromozomskih garnitura tj. hromozomski nebalansiranih gameta (vidi **Poglavlje 1.6**). Bezsemenost plodova je inače zbog specifičnih zahteva potrošača primarni cilj unapređenja plemki mandarina, ali svakako da postoje i mnogi drugi ciljevi vezani za kvalitet ploda koji pomoću somatske hibridizacije mogu da se prenesu na triploidno bezsemeno potomstvo. Tu spadaju: otpornost na bolesti, bolja adaptacija na ekstremne sredinske uslove, monoembrionija, lako ljuštenje, dobra (tamno-narandžasta) boja kore i srži, dobar ukus, proširivanje sezone rađanja plodova (stvaranje kultivara

koji rano ili kasno sazrevaju u sezoni), i povećanje postojanosti u toku transportovanja tj. stajanja na policama prodavnica.

Uprkos ogromnoj genetičkoj varijabilnosti u rodu *Citrus* i srodnim mu rodovima, klasični program oplemenjivanja je imao vrlo ograničenu ulogu u pogledu razvoja novih kultivara. Razlog za to je ležao u izvesnim neprevaziđenim problemima vezanim za reproduktivnu prirodu citrusa koji su usporavali klasični program oplemenjivanja: seksualna nekompatibilnost, nucelarna poliembrija (apomikisija), sterilnost polena i jajne ćelije, heterozigotnost i dugačka juvenilna faza. Zbog spomenutih problema vezanih za reproduktivnu prirodu citrusa, većina kultivara plemki i podloga gajenih u današnje vreme nisu nastali kao rezultat klasičnog programa za oplemenjivanje, već slučajno u procesu odabira zdravih klijanaca ili zahvaljujući pojavi prirodnih mutacija pupoljaka (Grosser & Gmitter 1990).

Praktična vrednost somatske hibridizacije je u tome što omogućava transfer gena iz divljih, seksualno nekompatibilnih srodnika citrusa u komercijalno važne kultivare čime se obogaćuje njihov genetički diverzitet i stvaraju se nove genomske kombinacije (Dudits *et al.* 1980; Grosser *et al.* 1996a). Ove, novostvorene genomske kombinacije koje su neophodne za proces genetičkog oplemenjivanja se stvaraju kako fuzijom seksualno inkompatibilnih tako i kompatibilnih kultivara/vrsta. Uvećanje genetičke varijabilnosti putem somatske hibridizacije se ne postiže samo putem prevazilaženja seksualne inkompatibilnosti već i preko kombinovanja nuklearnih, hloroplastnih i mitohondrijalnih genoma u nove kombinacije. Na taj način nastaju: simetrični auto- i alotetraploidni somatski hibridi, asimetrični somatski hibridi i somatski cibridi (definisani kao biljke koje sadrže nuklearni genom samo od jednog roditelja i citoplazmatske organelarne genome oba roditelja) (Grosser *et al.* 2010b). Vrednost novonastalih somatskih hibrida se ogleda u tome što oni sami mogu da imaju dobre osobine i potencijal da budu proizvedeni u nove kultivare. Ova pojava nije toliko česta, ali se ipak dešava i to specijalno u programima unapređenja mandarina i pomorandži (Guo *et al.* 2004a). Ukoliko su tetraploidni somatski hibridi kvalitetni, ali ne dovoljno da postanu novi kultivari onda se oni dalje koriste u procesu oplemenjivanja kao roditelji u interploidnom seksualnom ukrštanju sa krajnjim ciljem dobijanja bezsemenih triploidnih hibrida (Grosser & Gmitter 2011). To je ujedno i najveća praktična vrednost somatske hibridizacije u procesu oplemenjivanja citrusa.

5.1.1 Efikasnost indukcije embriogenog kalusa iz nucelarnog tkiva ovula

Za potrebe fuzije, protoplasti se mogu izolovati iz različitih tkiva i organa, uključujući tu: list, embriogeni kalus, embriogenu suspenziju, neembriogeni kalus i nerazvijene muške polne ćelije nezrelih cvetova (za potrebe dobijanja haploidnih protoplasta). Ipak, uspešna regeneracija somatskih hibrida nakon fuzije se može postići jedino ukoliko protoplasti od bar jednog roditelja imaju embriogeni kapacitet (Grosser & Gmitter 1990). Imajući ovo u vidu, u procesu somatske hibridizacije citrusa se najčešće fuzionišu protoplasti iz totipotentnih embriogenog kalusa/suspenzija koji sa ne-totipotentnim protoplastima iz listova. Na ovaj način se eliminiše mogućnost dobijanja regeneranata od roditelja koji su dali ne-totipotentne protoplaste i tako se olakšava sam proces identifikacije i odvajanja somatskih hibrida od ostalih nefuzionisanih regeneranata.

U ovoj doktorskoj disertaciji su izolovane ovule iz nezrelih plodova mandarina i dalje gajene na tri različite hranljive podloge, a zatim je praćeno formiranje kalusa i adventivnih somatskih embriona iz nucelarnog sloja tih ovula. Ove tri hranljive podloge (**Tabela 1**) su se razlikovale jedino po koncentraciji dodatog kinetina. Kalusogeni i embriogeni potencijali su bili praćeni kod četiri kultivara mandarina koji su kasnije bili korišćeni u eksperimentima somatske hibridizacije: 'Murcott', 'Page', 'Ponkan' i 'W. Murcott'. Formiranje kalusa iz nucelarnog sloja kod četiri ispitivana kultivara, izraženo kao kalusogeni potencijal u funkciji vremena (**Grafikon 1**) je pokazalo veliku genotipsku zavisnost ovog parametra. Ovule kultivara 'W. Murcott' su imale najveći potencijal za formiranje kalusa, naročito u periodu maksimalne kalusogeneze (koja se javlja od 3-6 meseci od početka tretmana). Posle kultivara 'W. Murcott', najveći kalusogeni potencijal su imali kultivari 'Ponkan' mandarina i 'Page' tangelo i naposljetku 'Murcott' tangor. Praćen je i uticaj genotipa na hranljivim podlogama obogaćenim sa kinetinom na kalusogeni potencijal (**Grafikon 2**). Na koncentraciji od 10 mg/l kinetina kalusogeni potencijal je bio različit za sva četiri kultivara dok je manje variranje zabeleženo na koncentraciji od 5 mg/l. Na hranljivoj podlozi bez kinetina kalusogeneza je bila najmanja kod sva četiri testirana kultivara dok je embriogeni potencijal kod sva četiri kultivara bio najveći na ovoj podlozi i iznosio 20-30%. Embriogeni potencijal kod svih kultivara na hranljivim podlogama sa kinetinom nije prevazilazio 10% (**Grafikon 3**). Iz ovih rezultata proizilazi zaključak da na hranljivoj

podlozi sa kinetinom (≥ 5 mg/l) u odnosu na podlogu bez ovog regulatora rastenja mnogo veći broj ovula daje kalus, a mnogo manje njih proizvodi somatske embrione što je poželjna kombinacija za indukovanje embriogenog kalusa od koga se očekuje da ostane u nediferenciranom stanju. Starrantino i Caponnetto su takođe u svom radu iz 1990. godine pokazali da je hranljiva podloga za indukciju embriogenog nucelarnog kalusa mnogo efektivnija kada u sebi sadrži citokinine, nego kada je bez regulatora rastenja. Oni su ispitivali efekte četiri različite koncentracije (0, 2.5, 5.0 i 10.0 mg/l) dva citokina - kinetina i 6-benzil-aminopurina (BAP) dodatih u MT hranljivu podlogu na formiranje kalusa iz ovula pet različitih kultivara slatke pomorandže. Iz tih eksperimenata je izveden zaključak da je kalusogeni potencijal najveći kada se u hranljivoj podlozi nalazi pojedinačno BAP u koncentraciji 10.0 mg/l ili kada su BA i kinetin zajedno prisutni u podlozi u koncentraciji od 5-10 mg/l. U radu Grosser *et al.* (2000) se pored 0.146 M EME podloge bez regulatora rastenja spominju još dve uspešne hranljive podloge (H+H podloga bez regulatora rastenja i modifikovana 0.146 EME hranljiva podloga sa 44 μ M 6-BA i 0.04 μ M 2,4-D) za dobijanje embriogenog kalusa iz nucelarnog tkiva nezrelih ovula. U ovom radu nema podataka o uticaju hranljive podloge na formiranje kalusa.

5.1.2. Ispitivanje efikasnosti enzimske smese koja se koristi za izolovanje protoplasta iz embriogenih kultura suspenzija i neembriogenih mezofilnih ćelija

Fuzija protoplasta je tehnika u kojoj se spajaju protoplasti tj. ćelije bez ćelijskog zida. Odstranjivanje ćelijskog zida je važna pripremna faza pred sam proces fuzije protoplasta. Prisustvo i najmanjih ostataka ćelijskog zida na plazmalemi može da ometa stvaranje bliskog kontakta između ćelijskih membrana protoplasta koji se fuzionišu i time totalno naruši odvijanje tog procesa. U te svrhe je u ovoj disertaciji testiran enzimski rastvor koji može da vrši uspešnu razgradnju biljnog tkiva u pojedinačne ćelije i istovremenu digestiju ćelijskog zida koji se nalazi oko plazmaleme tih pojedinačnih ćelija. Takođe, enzimski rastvor mora da obezbedi dovoljan prinos izolovanih protoplasta iz oba izvora: embriogenog (ćelijska suspenzija) i neembriogenog (mezofilne ćelije biljaka isklijanih iz semena i gajenih u *in vitro* kulturi). Preporučljivo je da se pre otpočinjanja eksperimenata somatske hibridizacije prvo ispituju različite kombinacije enzima u enzimskom rastvoru kao i njihove

koncentracije i dužine trajanja inkubacije. U enzimskom rastvoru koji se generalno koristi u procedurama za fuziju biljnih ćelija uvek su sadržane razne kombinacije enzima koji razlažu glavne konstituentne ćelijskog zida: pektin, celulozu i hemicelulozu (ksilan) (Evans & Bravo 1983). Pektinaza razlaže pektin u vezivnom tkivu koje se nalazi između ćelija i time vrši “maceriranje” tkiva u pojedinačne ćelije tj. vrši njihovo “oslobađanje” iz tkiva. Istovremeno, celulaza i hemicelulaza razgrađuju ćelijski zid oslobođenih individualnih ćelija. Bez ćelijskog zida, one gube oblik koje su imale dok su bile u tkivima i dobijaju sferičan oblik. Optimalan osmotski pritisak u protoplastima se obezbeđuje visokim osmotskim potencijalom (pomoću manitola) enzimskog rastvora. Time se sprečava pucanje protoplasta koji su usled odsustva ćelijskog zida vrlo osetljivi na promene u spoljašnjoj sredini.

U cilju pronalaženja enzimskog rastvora koji daje dobar prinos izolovanih protoplasta iz ćelijskih suspenzija i mezofilnih tkiva listova ispitivana je efikasnost tri enzimске smese (A, B i C) kod pet kultivara mandarina. Enzimске smese su pored istih koncentracija osmotikuma, pufera i jona sadržavale različite koncentracije komercijalno dostupnih enzima: celulaze, maceraze i pektoliazе (receptura enzimskih smesa je opisana u **Poglavlju 3.1.4**). Korišćena je maceraza, koja je vrsta blage pektinaze koja se dobija iz gljive *Trichoderma viride*. Za potrebe izolovanja protoplasta iz citrusa, ali i iz drugih biljnih vrsta, maceraza se najčešće koristi u kombinaciji sa celulazom (Evans & Bravo 1983). Celulaza u sebi sadrži pektinazu, celulazu i hemicelulazu a dobija se iz gljive *Rhizopus sp.* Pektoliazа se sastoji od dve vrste pektinaze: poligalakturonze i pektinliaze a dobija se izolacijom iz gljive *Aspergillus japonicus* (Yakult Honsha Co. Ltd., Japan).

Ukupan broj izolovanih protoplasta, izražen u milionima/1 g sveže težine, kod pet testiranih kultivara mandarina (**Tabela 17**) je pokazao da su enzimске smese B i C bile mnogo efikasnije u odnosu na smesu A. Enzimска smesa A je čak u nekim slučajevima imala toksični efekat (**Slіke 11.b,c**). Obzirom da je smesa A jedina u svom sastavu imala enzim pektoliazu zaključeno je da je negativan efekat upravo i javljao zbog prisustva i aktivnosti ovog enzima. Pektoliazа je decenijama bila korišćena u kombinaciji sa celulazom i macerazom u Laboratoriji za ćelijsku genetiku Dr. Grosser-a (UF, CREC, Lake Alfred) gde je rađena ova doktorska disertacija i to u istim koncentracijama kao što je to prikazano u receptu za smesu A (Grosser & Gmitter

1990). Međutim, upravo su rezultati ove disertacije pokazali da je prinos protoplasta značajno veći ukoliko se pektolijaza totalno izuzme iz pravljenja enzimskog rastvora. Iz **Tabele 17** se vidi da je čak kod tri kultivara (od ukupno pet) smesa C bila skoro dva puta efikasnija nego smesa B zbog čega je i bila izabrana za izolaciju protoplasta u svim sledećim eksperimentima fuzije. Suprotno rezultatima naših eksperimenata, pektolijaza se uspešno koristi za izolovanje protoplasta raznih vrsta citrusa, ali i drugih gajenih vrsta voća i povrća u kombinaciji sa celulazom i macerazom i mnogim drugim enzimima (Prakash & Foxe 1984; Mendes-da-Gloria *et al.* 2000b; Xu *et al.* 2007).

5.1.3. Uspešnost “hemijske“ fuzije protoplasta sa PEG za dobijanje auto- i alotetraploidnih hibrida

Fuzija protoplasta se sastoji od dva procesa. U prvom procesu dolazi do aglutinacije protoplasta gde se membrane dva i više protoplasta dovode u bliski kontakt. U drugom procesu dolazi do promena u fizičko-hemijskim svojstvima membrane što dovodi do fuzije membrana koje se dodiruju i do stvaranja citoplazmatičnog kontinuiteta između ćelija koje se fuzionišu. Protoplasti se mogu fuzionisati “električnom“ (Yamamoto & Kobayashi 1995; Saito *et al.* 1991; Ollitrault *et al.* 2000) ili “hemijskom“ (Grosser & Gmitter, 1990) metodom. U “električnoj“ metodi se bliski kontakt između protoplasta postiže naizmeničnim, slabim niskovoltaznim poljem AC struje koje dovodi do polarizacije ćelija i njihove migracije unutar električnog polja. Pri kontaktu, protoplasti se zbog svoje bipolarnosti sortiraju u pravolinijske agregate koji se u literaturi često zovu “biserne ogrlice“ (Van Wert & Saunders 1992). Ove formacije protoplasta su paralelne linijama električnog polja. AC polje istovremeno uzrokuje lateralnu difuziju membranskih proteina i formiranje regiona sa lipidnom dominacijom, prvo na mestu bliskog kontakta membrana protoplasta koji se dodiruju, a potom i u drugim delovima membrana. Sukcesivna primena snažnijih ali izuzetno kratkih DC pulseva uzrokuje reverzibilnu pojavu tzv. “električnih lomova” membrane što na mestu dodira membrana dva susedna protoplasta izaziva stvaranje pora, a samim tim i nastajanje citoplazmatskog kontinuiteta. “Električni lomovi” membrane su ujedno glavni pokretači fuzije čiji mehanizam nije u potpunosti razjašnjen u literaturi. Jedno od objašnjenja mehanizma fuzije protoplasta ovom metodom je da slučajni sudari hidrofobnih delova fosfolipida u porama susednih membrana dovode do stvaranja membranskog

kontinuiteta (Van Wert & Saunders 1992). Prednost ove metode nad “hemijskom” jeste brzi oporavak fuzionisanih protoplasta zbog toga što se ne koriste hemijske supstance koje mogu imati odloženi toksični efekat na ćelije. Sa druge strane, glavni nedostatak ove metode je u tome što se u istom vremenskom periodu koristi relativno mali broj protoplasta.

U “hemijskoj” fuziji, koja je korišćena prvi put još 1974. godine (Kao & Michayluk), se u smesu protoplasta dodaje PEG kao glavni fuzogeni agens (Evans *et al.* 1983). Hemijsku fuziju još potpomažu visoki pH i visoka koncentracija Ca^{2+} jona. Ova metoda je još pre 24 godine (Grosser & Gmitter 1990) bila prilagođena za potrebe fuzionisanja ćelija citrusa na osnovu metode Menczel *et al.* (1981). PEG metoda se preporučuje od strane ovih autora zato što je jednostavna, efikasna i jeftina metoda. Ukoliko se još pronađu optimalna molekulska masa i koncentracija PEG za svaku pojedinačnu vrstu onda se umanjuje negativni efekat na vijabilnost protoplasta tj. ne stvara se citotoksična sredina. PEG je polimer i ima veliku molekulsku masu koja se kreće i do 20000. Međutim, samo u određenoj koncentraciji (25-33%) i sa specifičnom molekulskom masom (1300-7500) može da izazove uspešnu aglutinaciju ćelija bez njihovog pucanja tako što ih kao most povezuje jedne sa drugima (Constabel 1984). Takođe, obzirom da ima visok afinitet za vodu, PEG dovodi do lokalne membranske dehidratacije i posledično do povećanja njene fluidnosti. PEG u kombinaciji sa rastvorom za eluiranje PEG (A + B rastvor; **Tabele 8, 9**) u kome je visoka koncentracija Ca^{2+} jona (kao 66 mM CaCl_2) i visoki pH (10.5) dovodi do promena u elektrostatičkom potencijalu membrane (ona postaje manje elektronegativna čime se podstiče adhezija) i do redistribucije intramembranskih proteina i glikoproteina. Sve nabrojane fizičko-hemijske promene na membrani i oko nje zajedno dovode do spajanja membrana aglutiniranih protoplasta koje su u bliskom kontaktu i spajanja njihovih citoplazmi tj. dolazi do ćelijske fuzije. Zbog svega navedenog je od suštinske važnosti pre otpočinjanja same fuzije pronaći optimalnu molekulsku masu i/ili koncentraciju PEG-a koja nema citotoksičan efekat na ćelije. Citotoksičnost se pri fuziji protoplasta ispoljava kroz prekomernu dehidrataciju ćelijskih membrana što za posledicu ima stvaranje ireverzibilnih pora na njoj (Hahn-Haterdal *et al.* 1986).

Za potrebe eksperimenata somatske fuzije mandarina izabrana je PEG metoda ali tako što je prvo odlučeno da se utvrdi koja je od tri molekulske mase (1500, 6000 i

8000) 40% rastvora PEG optimalna za efikasno fuzionisanje protoplasta poreklom iz embriogenog i neembriogenog biljnog tkiva. Rezultati u **Tabeli 18** pokazuju da sa rastom molekulske mase PEG kod svih uspešnih kombinacija raste i procenat pojave somatskih hibrida. Iz iste tabele se može videti da četiri roditeljske kombinacije (od šest uspešnih) koje u sebi sadrže embriogeni kalus poreklom od 'W.Murcott'-a proizvode somatske hibride na 1500 PEG tretmanu. Dve roditeljske kombinacije (M + WL i WM + WL) proizvode somatske hibride na drugom tretmanu (6000 PEG) dok svih šest regenerativnih kombinacija to čini na trećem tretmanu (8000 PEG) zbog čega je i utvrđeno da je 8000 PEG najefikasniji tretman za proizvodnju somatskih hibrida kod mandarina i njihovih hibrida. U literaturi se sreće da su različite molekulske mase PEG bile uspešne u indukciji fuzije protoplasta različitih biljnih vrsta. Tako su Louzada & Grosser (1994) dobili da je PEG od 1500 MM najefikasniji za fuziju protoplasta 'Hamlin' slatke pomorandže + *Atalantia ceylanica* kombinacije. Za fuziju protoplasta u ostalih pet kombinacija 'Hamlin' slatke pomorandže sa seksualno nekompatibilnim srodnicima (*Citropsis gilletiana*, *Severinia disticha*, *Severinia buxifolia*, *Feronia limonia*, *Clausena lansium*) su za fuziju bile najbolje molekulske mase od 6000-8000 PEG. Drugi autori (An *et al.* 2008) su za proizvodnju somatskih hibrida između 'Satsuma' mandarine i 'Naval' pomorandže uspešno koristili PEG 6000 MM. Međutim, ni jedan od nabrojanih autora nije svoj zaključak o uspešnosti korišćenih molekulskih masa PEG-a potkrepio sa konkretnim rezultatima o dobijanju velikog broja proizvoda fuzije (heterokarionskih fuzionisanih kolonija ili regenerisanih somatskih hibrida). U tim radovima, rezultati dobijeni pri korišćenju navedenih MM PEG nisu bile diskutovane u odnosu na rezultate koji bi se mogli dobiti uz korišćenje PEG drugih molekulskih masa. Jedan od retkih radova u kome je ispitivan efekat različitih molekulskih masa (1500, 6000 i 8000) 30% PEG na stvaranje heterokariona i deobu tih heterokariona (Chand *et al.* 1988) je imao za cilj da unapredi protokol za hemijsku fuziju dve roditeljske kombinacije: *Solarum viarum* + *S. dulcamara* i *Nicotiana tabacum* + *S. dulcamara*. Oba merena parametra uspešnosti fuzije su kod obe roditeljske fuzije imali bolje vrednosti na tretmanima PEG molekulske mase 1500 i 6000 u odnosu na 8000. U radu sa animalnim ćelijama, Klebe & Mancuso (1981) su za potrebe fuzionisanja ćelija testirali sedam različitih rastvora PEG gde je varirana njegova MM =

200, 400, 600, 1000, 3000, 6000 i 20000. Utvrđeno je da su MM od 600-1000 optimalne dok su 200 i 20000 bile totalno neefikasne u indukciji ćelijske fuzije.

Nakon fuzije je utvrđeno da je uspešna regeneracija biljaka dobijena u osam od ukupno 12 roditeljskih kombinacija (**Tabela 18**) što je navelo na pretpostavku da se toksični efekat primenjenih hemijskih agenasa (za fuziju protoplasta) na ćelije i somatsku embriogenezu ispoljio samo kod 33% roditeljskih kombinacija. Treba napomenuti da, obzirom da nije rađen kontrolni tretman u kome su agensi za fuziju protoplasta odsutni, nije isključena mogućnost (naročito u roditeljskim kombinacijama gde je 'Page' tangelo bio davalac embriogenog kalusa) da je sam embriogeni kalus u međuvremenu izgubio regenerativni potencijal.

5.1.4. Morfološka, citološka i molekularna analiza auto- i alotetraploidnih somatskih hibrida

Utvrđivanje nastanka somatskih hibrida tj. homofuzionisanih (autotetraploidnih) i heterofuzionisanih (alotetraploidnih) proizvoda i njihovo izdvajanje od neželjenih proizvoda fuzije je najvažniji deo završne faze somatske hibridizacije (Guo *et al.* 2004b, Chen *et al.* 2008b). Naime, u smesi protoplasta se nakon fuzije pored homo- i hetero- još nalaze multifuzionisani kao i pojedinačni nefuzionisani roditeljski protoplasti. U nekim smesama protoplasta se pored navedenih proizvoda još nalaze citoplazmatski hibridi - cibridi (Grosser & Gmitter 2011).

U cilju ranog pronalaženja željenih somatskih hibrida među svim nabrojanim proizvodima fuzije koriste se različite morfološke, citološke/citometrijske, biohemijske i molekularne metode. Svaka metoda pojedinačno ima svoje prednosti, ali i nedostatke. Tako npr. citološke/citometrijske ne razlikuju homo- od heterofuzionisanih protoplasta,, dok biohemijski izozimski markeri imaju tu sposobnost razlikovanja homo- od heterofuzionisanih protoplasta međutim ova metoda ponekad može da bude neprecizna obzirom da njeni završni rezultati u mnogome zavise od sredinskih faktora razvića i rastenja regenerisanih biljaka i razvojne faze izolovanog tkiva. U literaturnim podacima preporučuje da se za utvrđivanje dobijanih tetraploida koriste bar dve različite metode, ali tako da jedna od njih bude obavezno molekularna analiza genomske DNK obzirom da je ta metoda u odnosu na sve druge najefikasnija i najpouzdanija (Scarano *et al.* 2002). Izbor molekularne metode za analizu nuklearnog genoma somatskih hibrida nije

teško napraviti obzirom da u literaturi postoje mnoge metode koje daju vrlo uspješne rezultate: RAPD (random amplified polymorphic DNA), SSRs (simple sequence repeats), ISSRs (inter-simple sequence repeats), CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence), AFLP (amplified fragment length polymorphism), RFLP (restriction fragment length polymorphism) kao i GISH (genomic *in situ* hybridization) (Deng *et al.* 1992; Scarano *et al.* 2002; Guo *et al.* 2004b; Fu *et al.* 2004; Chen *et al.* 2008b). Ono po čemu se SSR, CAPS i RFLP metode izdvajaju od drugih jeste kodominantna priroda njihovih markera kojima je moguće razlikovanje heterozigota od dominantnog i recesivnog homozigota [$Aa \neq AA \neq aa$]. Druge metode: RAPD, ISSR i AFLP koriste tzv. dominantne markere pa je sa njima nemoguće razlikovati heterozigot od dominantnog homozigota [$(Aa=AA) \neq aa$]. Ono što takođe izdvaja SSR, CAPS i RFLP metode od drugih jeste da su njihovi prajmeri bazirani na poznatim sekvencama u genomu citrusa pa kao takvi mogu da “ciljaju” specifične gene (Roose 2007).

Od 12 roditeljskih kombinacija fuzije, šest njih je dalo somatske embrione od čega su samo 2.7% (82) bili somatski hibridi. Identifikacija somatskih hibrida i njihova selekcija u odnosu na ostale proizvode fuzije protoplasta, uglavnom diploidne biljke, je sprovedena još u toku njihovog *in vitro* gajenja korišćenjem metode za brzo utvrđivanje nivoa ploidnosti kod biljaka - “flow” citometrije. Ranim otkrivanjem tetraploidnih biljaka i njihovom selekcijom u odnosu na populaciju diploida (koja se nakon potvrđivanja hibridnosti odstranjuje iz kulture kao nepotrebna) se vrši ušteda u materijalnim sredstvima/radnoj snazi a što je najvažnije u vremenu potrebnom za dobijanje somatskih hibrida. Iz literature je poznato da su pre uvođenja “flow” citometrije kao metode za rano utvrđivanje nivoa ploidnosti biljaka, somatski hibridi selekcionisani na osnovu intermedijerne morfologije i citološke metode brojanja obojenih hromozoma od čega se brzo odustalo jer se ispostavilo da je nepouzdan, sporo i materijalno neisplativo (Ollitrault *et al.* 2007).

Nakon rane identifikacije, tetraploidne biljke koje su preživele *in vitro* uslove i bile gajene u stakleniku (nakalemljene na biljne podloge, **Poglavlje 3.1.9**) su bile podvrgnute EST-SSR molekularnoj analizi koja se koristi za analizu genomske DNK. Ova metoda je bazirana na PCR reakciji u kojoj se koriste fluorescentno obeleženi prajmeri koji su komplementarni regionima pojedinačnih tzv. EST (expressed sequence tag) sekvenci genoma mandarina. U okviru EST analize mogu se naći više puta

ponovljene kratke oligonukleotidne (2-6 baza) sekvence koje su u literaturi poznate kao “short tandem repeats” (STR) ili mikrosateliti mada se najčešće zovu “simple sequence repeats” (SSR). Umožene SSR sekvence su vrlo rasprostranjene u biljnom svetu i sreću se kako u intronima gena tako i u njihovim kodirajućim regionima (Scarano *et al.* 2002; Chen *et al.* 2006). Polimorfizam tj. genske razlike između različitih vrsta i kultivara su delimično i rezultat prisustva različitog umnoška SSR sekvenci koji se može detektovati PCR reakcijom gde se koriste komplimentarni prajmeri (Chen *et al.* 2006). Tako se nakon PCR reakcije dobijaju amplifikovani fragmenti različite dužine (merljivi u bp jedinicama) koji predstavljaju detektovane alele za određene lokuse u genomu. Dobijeni amplifikovani fragmenti se potom razdvajaju pomoću gel (agarozne ili poliakrilamidne) elektroforeze ili uz pomoć tečne hromatografije. Softver u aparatu za automatsko sekvenciranje (**Poglavlje 3.1.8.2**) daje hromatografske dijagrame (**Slika 17b**) za svaki od amplifikovanih proizvoda. Vrhovi na dijagramima predstavljaju alele za određene lokuse tj. proizvode amplifikacije genomske DNK sa različitim prajmerima. Obzirom da iz svega navedenog proizilazi da su SSR markeri: jednostavni, frekventno rasprostranjeni u genomu biljaka, multialelni (mogu da detektuju varijaciju u sekvenci), kodominantne prirode i daju ponovljive rezultate, to su i odabrani u ovoj tezi za verifikaciju somatskih hibrida.

Molekularnom EST-SSR analizom je testirano ukupno 65 somatskih hibrida (**Tabela 19**). Ova analiza je pomogla da se utvrdi da li su genomi dobijenih biljaka auto- ili alotetraploidnog karaktera. Generalno, SSR markeri su pogodni za utvrđivanje auto- i alotetraploidnosti somatskih hibrida samo ukoliko pokažu postojanje polimorfizma tj. različitih alela na pojedinim lokusima u roditeljskim genomima (Scarano *et al.* 2007; Chen *et al.* 2008b). U te svrhe su brižljivo odabrani molekularni markeri za koje se pretpostavljalo da mogu da pokažu razlike na genetskom nivou između blisko srodnih mandarina. Odabrano je deset markera iz velike grupe markera koji su u radu Chen *et al.* (2008a) korišćeni za mapiranje genoma slatke (*Citrus sinensis*) i trolisne pomorandže (*Poncirus trifoliata*). Odabir molekularnih markera koji pokazuju razlike na genetičkom nivou između blisko srodnih kultivara je inače vrlo teško uraditi. Primera radi, u radu Guo *et al.* (2004b) se, upravo zbog velike bliskosti između roditelja nije uspelo sa dokazivanjem hibridnosti ‘Page’ tangelo + ‘Murcott’ tangor hibrida za odabrana tri SSR i 30 RAPD prajmera. S druge strane uspelo se sa dokazivanjem

hibridnosti 'Page' tangelo + 'Ortanique' tangor hibrida. Sve ovo ukazuje na važnost pažljivog odabira prajmera u SSR analizi u zavisnosti od tipa roditelja koji se koriste u fuziji.

Za svih 65 proizvedenih somatskih hibrida su nakon PCR reakcije dobijeni SSR (alelski) profili koji su onda poređeni sa alelskim profilima roditeljskih majki biljaka. Alelski profili u sebi sadrže zbirno amplifikovane proizvode (predstavljene u **Tabeli 19** u bp jedinicama) svih deset prajmera. Kada su proizvodi amplifikacije na istom lokusu za različite roditelje različite dužine onda se kaže da su oni polimorfni. Redak je slučaj da svi korišćeni SSR prajmeri u PCR reakciji pokazuju polimorfnost za isti lokus kod različitih roditelja. Oni prajmeri koji ipak to uspeju su veoma značajni jer upravo zbir njihovih proizvoda (označeni zatamnjenim fontom i na žutoj pozadini u **Tabeli 19**) dozvoljava da se somatski hibridi okarakterišu kao auto- ili alotetraploidni. Suma prajmera koji daju polimorfne proizvode kod roditelja koji su onda sadržani i u somatskim hibridima je tako pretvorena u važan parametar koji je nazvan - potvrđan broj markera (preposlednja kolona **Tabele 19**). Što je veći broj tih potvrđenih markera to je veća verovatnoća da se radi o somatskom hibridu (auto-ili alotetraploidu). Činjenica da su somatski hibridi u ovoj disertaciji imali 3-7 potvrđenih markera govori u prilog tome da su molekularni markeri dobro odabrani u smislu da su uspešno pokazali razlike na genetskom nivou između blisko srodnih mandarina.

Obzirom da je uočeno da 72% testiranih hibrida nema identične SSR profile roditeljskim tj. da u alelskim profilima hibrida nedostaju aleli koji inače pripadaju profilima njihovih roditelja, somatski hibridi u okviru iste roditeljske kombinacije i sa istim alelskim profilima su svrstani u 14 različitih genotipskih grupa. Zahvaljujući ovom grupisanju i na osnovu kriterijuma za auto- i alotetraploidnost, utvrđeno je da je dobijeno 46 autotetraploidnih biljaka (genotipske grupe pod rednim brojem 1 - 9) i 18 alotetraploidnih biljaka (genotipske grupe pod rednim brojem 11 - 14) dok je biljka iz genotipa pod rednim brojem 10 ostala nedefinisana. U radovima drugih autora takođe postoje podaci da su kao proizvodi fuzije pored alotetraploidnih dobijene i autotetraploidne biljke. Tako su u radu Grosser *et al.* (1992) iz eksperimenata fuzije dobijeni novi alotetraploidi: 'Nova' tangelo ('Clementine' mandarina × 'Orlando' tangelo) + 'Succari' slatka pomorandža i 'Hamlin' slatka pomorandža + 'Dancy' mandarina ali i autotetraploidne biljke. Autotetraploidi su imali udvojeni jedarni genom

svojih ženskih roditelja ('Hamlin' i 'Succari' slatke pomorandže) kao posledicu homokarionske fuzije. Slične rezultate su dobili i Guo *et al.* (2006). U elektrofuziji embriogenog kalusa 'Page' tangela i mezofilnih protoplasta 'rough' limuna (*C. jambhiri*), pored alotetraploida ovi autori dobili su i autotetraploide ženskog roditelja.

Interesantnu pojavu da svi somatski hibridi nemaju u potpunosti identične alelske profile spoju alelskih profila donorskih roditelja su zabeležili Chen *et al.* (2008b). Iz fuzije protoplasta pet različitih kultivara mandarina sa 250 biljaka pamela (*C. grandis*) tolerantnih na visoki pH zemljišta, CTV virus i parazitnog insekta, *Diaprepes abbreviates*, je proizvedeno devetnaest novih grupa hibrida gde su sve biljke bile alotetraploidi. Međutim, od ovih 19 grupa u pet grupa, gde je ženski roditelj bio 'Page' tangelo, segment SSR profila hibrida koji je došao od ženskog roditelja nije bio u potpunosti identičan profilu majke biljke tog roditelja. Segment SSR profila koji je došao od muškog roditelja je bio identičan SSR profilu tog roditelja. U preostalih 14 grupa hibridi su imali alele koji su bili stvarna kombinacija oba donorska roditelja. Slični rezultati su dobijeni i u ovoj doktorskoj disertaciji. Naime, u okviru grupe autotetraploidnih hibrida samo je 20 njih imalo alelske profile identične svojim roditeljima. To su bili hibridi iz genotipskih grupa obeleženih rednim brojem 1, 2, 4, 7 i 9. U okviru ovih grupa, devetnaest hibrida iz četiri različite roditeljske kombinacije (Mt + WL; WM + Po; WM + Sck; Po + WM) je imalo udvojene genome svojih ženskih roditelja dok je jedna biljka (WM + WL) imala udvojen genom svog muškog roditelja. Preostalih 26 autotetraploidnih somatskih hibrida iz genotipskih grupa broj 3, 5, 6 i 8 nisu imali u potpunosti identične alelske profile, profilu njihovog ženskog roditelja - 'W.Murcott' tangora. U SSR profilu ovih hibrida je samo nedostajao alel 93 koji je inače bio prisutan u roditeljskom profilu. U okviru alotetraploidne grupe je bilo 18 biljaka koje su potekle isključivo iz jedne roditeljske kombinacije Po + WM pri čemu nijedna od njih nije imala alelski profil koji je bio identičan zbiru alela koji su bili prisutni kod oba roditelja. Alelski profili ovih biljaka su pokazali veliku varijabilnost u odnosu na roditeljske profile zbog čega su svrstani u četiri različite genotipske grupe (obeležene rednim brojem 11 - 14). U sva četiri genotipa je na različitim lokusima nedostajalo od jedan do tri alela koji su se inače nalazili u alelskom profilu njihovog muškog roditelja - 'W.Murcott' tangora. Iz **Tabele 19** se još vidi za Po + WM roditeljsku kombinaciju da je najvarijabilnija u smislu da su biljke potekle iz nje svrstane u šest različitih genotipskih

grupa. Iz ove roditeljske kombinacije su naime pored alotetraploidnih dobijene i dve autotetraploidne biljke sa identičnim profilom muškog roditelja ('Ponkan' mandarina) kao i jedna nedefinisana biljka sa komplikovanim alelskim profilom. U njemu su se za određene lokuse nalazili aleli prisutni samo u ženskom, samo u muškom roditelju i totalno novi aleli (nepostojeći u alelskim profilima roditelja).

U ovoj doktorskoj disertaciji od proizvedenih 65 somatskih hibrida za čak 45 njih (26 iz grupe auto-, 18 iz grupe alotetraploida i jedna nedefinisana biljka) je utvrđeno da nemaju u potpunosti identične alelske profile kao što su profili njihovih roditelja. Ova činjenica navodi na pretpostavku da početni material za fuziju nije bio identičan ("true to type") majkama biljkama. Uočena varijabilnost kod svih 18 Po + WM alotetraploidnih biljaka je izražena u segmentu alelskog profila koji je dolazio od 'W.Murcott' muškog roditelja (na različitim lokusima nedostaje 1-3 alela). Istovremeno je prisustvo u njihovim profilima svih ostalih alela iz muškog i ženskog roditeljskog profila navelo na zaključak da su *in vitro* biljke isključane iz semena plodova majki biljaka tog muškog roditelja pored nucelnog bile i zigotskog porekla. Ovo nije toliko iznenađujuće obzirom da se zna da se kod citrusa nucelarna poliembrija kao aseksualni oblik propagacije vrlo često javlja u istom semenu istovremeno i nezavisno od procesa oprašivanja i oplodjenja. Kao konačni rezultat se dobija da se unutar poliembriog semena pored velikog broja aseksualnih (nucelnih) embriona može se pojaviti i seksualni (zigotski) embrion. I dok nucelni embrion ima genotip majke zbog čega se za njega kaže da je "true-to-type", dotle zigotski embrion, kao posledica ukrštanja dva različita kultivara, ima potpuno nov tzv. "off-type" genotip (Soost & Roose 1996). Ono što jeste bilo iznenađujuće je mogućnost da je i kalus 'W.Murcott' tangora zigotskog porekla obzirom da se mislilo da su kalusne linije bile inicirane iz nucelnog tkiva nerazvijenih i (pod pretpostavkom) neoplođenih ovula. Neslaganje SSR profila somatskih hibrida i majki biljaka i zaključak da se radi o zigotskom poreklu kalusa već postoji zabeležen i opisan u literaturi. Pored već spomenutog rada Chen *et al.* (2008b) gde je (u fuziji mandarina i pamela) dobijeno delimično neslaganje između SSR profila 'Page' kalusa i originalne majke biljke, Grosser *et al.* (2010a) su isto neslaganje u alelskim profilima dobili između kalusa i originalne majke biljke kad su koristili 'Satsuma' mandarinu kao ženskog roditelja u fuziji sa drugim kultivarima mandarina i njihovih hibrida. Slični rezultati su dobijeni u ovoj disertaciji gde je 26 autotetraploida

(WM + Po; WM + Sck; WM + WL; WM + Kin) imalo gotovo identične alelske profile svog ženskog roditelja ('W.Murcott' tangora) samo što im je na jednom lokusu nedostajao alel dužine 93 bp.

Jedini način da se stvarno utvrdi da li neke od ovula zaista u sebi imaju zigotski embrion iz koga može da proistekne kalus koji onda više nema istovetni genetski material kao majka biljka je bio da se pomoću molekularnih markera ispita genetičko poreklo kalusnih linija koje potiču iz različitih ovula istovetnog kultivara. S tim ciljem je na kraju prvog dela ovog projekta urađena dodatna SSR-EST analiza gde su poređeni alelski profili kalusa dobijenih iz individualnih 'Murcott' i 'W.Murcott' ovula sa alelskim profilom njihovih majki biljaka. SSR profili 24 kalusne linije 'Murcott' tangora su bili identični alelskom profilu majke biljke dok su kod 'W.Murcott' tangora rezultati bili drugačiji (**Tabela 20**). Od 18 testiranih kalusnih linija 'W.Murcott' tangora, njih 14 je iskazalo variranje u alelskim profilima u odnosu na majku biljku što ukazuje na zigotsko poreklo većine linija embriogenog kalusa 'W.Murcott' tangora koji su korišćeni u eksperimentima somatske hibridizacije.

Prema Grosser & Gmitter (1990), pravi somatski hibridi, alotetraploidi, u odnosu na donorske roditelje imaju pored tetraploidnog broja hromozoma i "kompozitne ekspresije gena / genskih markera" još i intermedijernu vegetativnu morfologiju. Po mišljenju ovih autora, utvrđivanje hibrida ne bi bila potpuno ukoliko u sebi pored citogenetičke i molekularne karakterizaciju ne bi sadržalo i morfološku analizu dobijenih biljaka. Analiza morfologije lista 18 alotetraploidnih hibrida iz Po + WM fuzije (genotipovi pod rednim brojem 11-14 u **Tabeli 19**) (**Slika 19.e**) je pokazala da oni zaista imaju intermedijernu morfologiju u poređenju sa roditeljskim listovima (**Slike 19.a,b**). Iste rezultate za intermedijernu vegetativnu morfologiju alotetraploida u odnosu na roditelje su dobili i mnogi drugi autori radeći na somatskoj hibridizaciji raznih vrsta citrusa (Tusa *et al.* 1992; Grosser *et al.* 1992; Grosser *et al.* 2007). Kod autotetraploidnih biljaka koje imaju udvojen genom jednog od roditelja iz fuzije protoplasta (genotipovi pod rednim brojem 1-9 u **Tabeli 19**) (**Slike 19.f-i**) se očekivalo da imaju istu ili bar sličnu morfologiju lista tog roditelja (**Slike 19.a-d**). Ovi očekivani rezultati su dobijeni za 37 autotetraploida (genotipovi 1,2,4-9 u **Tabeli 19**) dok je devet autotetraploida 'W.Murcott' tangora proizašlih iz W.Murcott + Ponkan fuzije protoplasta (predstavljeni kao genotip 3 u **Tabeli 19**, **Slika 19.f**) imalo morfologiju

listova koja je donekle bila različita u odnosu na ženskog roditelja (**Slika 19.b**). Listovi ovih biljaka su imali slabo izraženu razraslu lisnu dršku koja se inače uopšte ne sreće na listovima njihovog roditelja 'W.Murcott' tangora. Pretpostavka je da su morfološke razlike između ovih autotetraploida i njihovog roditelja posledica nepotpunog podudaranja njihovih SSR profila.

I pored toga što genomi nekih hibrida dobijenih u ovim istraživanjima ne predstavljaju zbir genoma svojih originalnih majki biljaka oni i dalje imaju veliku vrednost za proces oplemenjivanja mandarina. Njihova vrednost se ogleda u tome što oni dodatno povećavaju genetsku varijabilnost linija koje se mogu koristiti kao roditelji u interploidnom seksualnom ukrštanju ili kao potencijalni novi kultivari. Rezultati dobijeni u ovom delu doktorske disertacije ukazuju na to da embriogeni kalus i biljke isključane iz semena mandarina i njihovih hibrida i gajene u uslovima *in vitro* pored nucelnog mogu imati i zigotsko poreklo. Iz ovih rezultata proističe važna preporuka za buduće projekte koji se bave somatskom hibridizacijom da se pre fuzije protoplasta uradi testiranje linija embriogenog kalusa i *in vitro* biljaka isključanih iz semena, molekularnim markerima u cilju selekcije onih koji su "true to type".

5.1.5. Analiza plodova somatskih hibrida gajenih u polju

Glavni cilj prvog dela ove doktorske disertacije (somatska hibridizacija) je bio dobijanje visokokvalitetni somatskih hibrida koji bi se dalje koristili kao roditelji u eksperimentima seksualne hibridizacije. Juvenilna faza citrusa u proseku traje 3-7 godina koliko će biti potrebno da hibridi proizvedeni u prvom delu disertacije (**Tabela 19**) počnu da daju plodove, kada će tek biti moguće izvršiti analizu plodova dobijenih hibrida. Obzirom da je to previše dugačak vremenski period za kompletiranje doktorske disertacije, donešena je odluka da se za potrebe ove disertacije uradi analiza kvaliteta plodova sedam adultnih alotetraploidnih somatskih hibrida koji su proizvedeni ranije u periodu od 1992-2004. godine (**Tabela 2**) i gajeni na istraživačkim poljima Centra za izučavanje citrusa (CREC) u Lake Alfred, Florida. U toku dve uzastopne kalendarske godine (2011 i 2012) su praćene morfološke karakteristike plodova i kvalitet iscedenog soka. Prikupljanje podataka je vršeno u periodu sazrevanja plodova tj. od trenutka kada je više od 50% kore ploda imalo "razvijenu" narandžastu boju. Iz literature se zna da u periodu sazrevanja, plodovi citrusa prolaze kroz promene u sadržaju iscedenog soka,

šećera, kiselina i isparljivih aromatičnih materija koje im daju specifičan ukus i aromu ploda (Goldschmidt 1997). U periodu maksimalne zrelosti, nabrojani parametri postižu svoje najoptimalnije moguće vrednosti koje se onda porede sa unapred utvrđenim standardima. Ukoliko su koncentracije jednake ili više od standardnih onda je velika verovatnoća da će i plod biti kvalitetan. Kod citrusa je dakle kvalitet ploda neodvojivo povezan sa zrelošću ploda. Ovo je očekivano jer citrusi, za razliku od banana, jabuka i krušaka, ne sadrže skrobne materije u plodu i zato posle branja nemaju mogućnost da nastave sa zrenjem. Znači, plod citrusa mora da postigne maksimum kvaliteta dok je još na drvetu (Grierson 2006). Pored sadržaja iscedenog soka i nabrojanih hemijskih materija koje najviše određuju zrelost ploda, za sveukupni kvalitet ploda su važne i neke druge karakteristike: veličina, oblik, boja, prisustvo oštećenja (izazvanih parazitima i negativnim klimatskim faktorima), glatkoća kore, lakoća ljuštenja, broj semena i ukus/aroma. Ove karakteristike nemaju jasno utvrđene standarde. Inače, standardi su različiti u različitim zemljama u kojima se gaji citrus. U SAD su npr. minimalni standardi za zrelost tj. kvalitet utvrđeni od strane Ministarstva za poljoprivredu (United States Department of Agriculture) a usmereni su ka zaštiti prava proizvođača, tržišta svežeg voća/cedenog soka i potrošača. Mereni parametri kod ispitivanih sedam hibrida su poređeni sa standardnim vrednostima koje su pronađene u literaturi za grupu mandarina: $TSS \geq 9\%$, $TSS:TA \geq 7.5:1$, procenat iscedenog soka u plodu $\geq 40\%$ (Grierson 2006). Takođe su parametri ovih hibrida poređeni sa izvesnim parametrima 'W.Murcott' hibrida mandarine (Internet stranica SAD programa za propagaciju citrusa tzv. Citrus Clonal Protection Program) za koju se zna da trenutno predstavlja najpopularniju mandarinu za uzgajanje na Floridi za potrebe plasmana na svetsko tržište svežeg voća. Kultivar 'W.Murcott' kao hibrid mandarine ima mali plod (prosečne visine 6.4 cm, prečnika 5.6 cm i težine 99.4 g), izuzetno tanku glatku koru (2.9 mm) lepe narandžaste boje (u periodu najveće zrelosti je 12 na skali od 4-13 gde je 4 tamno zelena a 13 crveno-narandžasta boja) koja se izuzetno lako ljušti. Unutrašnjost je takođe lepe tamno-narandžaste boje vrlo slatkog i bogatog ukusa. Plod je vrlo sočan tj. ima visok sadržaj soka u sebi (31-42%) i proizvodi mali broj semena (<6) u odsustvu drugih polinatora. Sazreva u periodu od januara do marta kada su $TSS = 10.8-13\%$, $TA = 1.1-0.7\%$ i $TSS:TA = 9.6-18.5$.

Morfološke osobine plodova i kvalitet soka ispitivanih somatskih hibrida (**Tabela 13**) gajenih u polju su praćeni kroz merenje/opis spoljašnjih i unutrašnjih karakteristika ubranih plodova u sezoni njihove najveće zrelosti (od novembra do aprila). Iz **Poglavlja 4.1.8.** se vidi da je deset karakteristika bilo promenljivo u toku vremena (one su nazvane varijabilnim i prikazane su u **Tabelama 21-27**) dok je dosta njih bilo nepromenljivo (one su taksativno nabrojane). Ukoliko se izvrši međusobno poređenje somatskih hibrida uočava se postojanje genetičke specifičnosti za najveći broj varijabilnih i nevarijabilnih karakteristika. Debljina kore je jedna od važnih karakteristika i tu se najviše ističu tri hibrida: Page + Ortanique, Page + (Clementine × Satsuma) i Murcott + LB8-8 sa malom debljinom kore (2-5 mm) za razliku od svih ostalih čija debljina ide i do 11 mm. Obzirom da se zna da komercijalni kultivar hibridne mandarine ‘W.Murcott’ ima izuzetno tanku koru (2-3.3 mm) to znači da se i za ova tri hibrida može reći da je kora izuzetno tanka. To je iznenađujuće obzirom da se iz literature poznato da alotetraploidni somatski hibridi najčešće imaju debelu koru (Kobayashi *at al.* 1995; Grosser & Gmitter 2011). Međutim, tanja kora ne znači automatski da se plodovi i lakše ljušte. Najbolji primer za to je hibrid Hamlin + Dancy čija je debljina kore 4-9 mm a procenjeno je da se ovaj hibrid, pored Page + (Clementine × Satsuma), najlakše ljušti.

Za tržište svežeg voća, ceđenog soka i proces oplemenjivanja mandarina od nevarijabilnih karakteristika su još važni: aroma i ukus iscedenog soka zrelog ploda, kao i veličina i prosečan broj semena u plodu. Po dobroj aromi i ukusu su se istakla dva hibrida od ukupno sedam testiranih: Page + (Clementine × Satsuma) i Succari + Murcott ali treba istaći da su ova merenja urađena vrlo subjektivno bez angažovanja većeg broja degustatora. Kada se procenat iscedenog soka u plodu svih sedam hibrida poredi sa standardom ($\geq 40\%$; Grierson 2006) vidi se (**Tabele 21-27**) da četiri hibrida imaju daleko veći procenat od standardnog a to su: Page + Ortanique, Page + (Clementine × Satsuma), Succari + Murcott i Rhode Red Valencia + Dancy. Ostala dva hibrida: Hamlin + Dancy i Succari + Changsha imaju vrednosti u proseku ~20-30% što je daleko ispod standarda. Hibrid Murcott + LB8-8 po sadržaju soka u plodu prilazi blizu standarda ali tek na kraju sezone sazrevanja.

Svi ispitivani hibridi su imali mali prosečan broj semena u plodu (<6) što je naročito važna karakteristika za konzumiranje mandarina u svežem stanju. Tu svakako

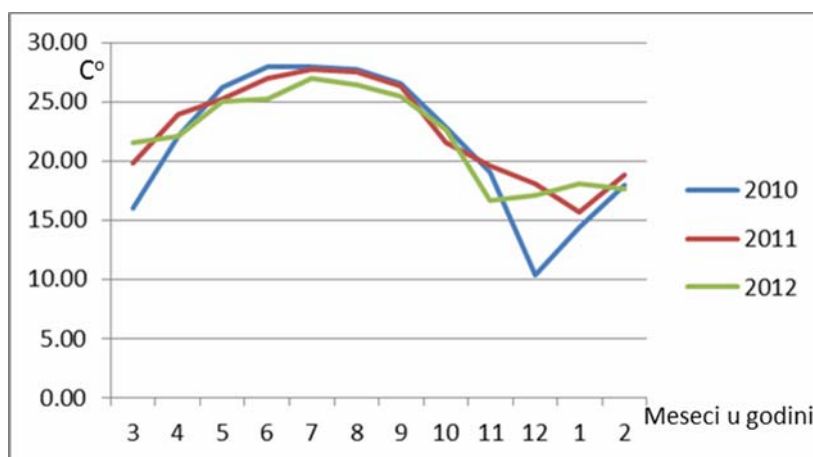
treba istaći hibrid ‘Murcott’ + ‘LB8-8’ sa samo 2.5 semena po plodu koja su ujedno i najmanja u odnosu na sve ostale hibride (12×6 mm). Svi ispitivani hibridi u poređenju sa ‘W.Murcott’ komercijalnom mandarinom, za koji se zna da proizvodi mali broj semena, imaju vrlo slične vrednosti za ovaj parametar.

Genetička specifičnost ispitivanih hibrida se ne ispoljava kada se oni porede za veličinu ploda. Iz **Tabela 21-27** se vidi da plodovi hibrida na osnovu srednjih vrednosti za visinu ploda (6.3 – 8.8 cm) i prečnik (7.8 – 8.8 cm) imaju sličnu veličinu. Jedino što se dva hibrida (Murcott + LB8-8 i Succari + Changsha) izdvajaju po manjoj težini ploda (205 g i 216 g) u odnosu na ostale hibride (250-270 g). U poređenju sa ‘W.Murcott’ komercijalnim hibridom mandarine plodovi ispitivanih hibrida su mnogo veći i teži.

Od varijabilnih karakteristika, za određivanje zrelosti a samim tim kvaliteta ploda su najvažnije tri: TSS, TA i njihov odnos TSS:TA. Kao što je i očekivano, kod svih sedam hibrida (**Tabele 21-27**) °briks (kao mera ukupne količine rastvorenih čvrstih materija u iscedenom soku) raste u toku ispitivanog perioda tj. sezone zrenja plodova a kiselost opada što dovodi do toga da međusobni odnos između ova dva parametra raste. Ukoliko se vrednosti za ove parametre porede sa standarnim (Grierson 2006) zaključuje se da najranije u novembru (moguće i pre) sazrevaju četiri hibrida: Hamlin + Dancy, Succari + Changsha, Succari + Murcott i Murcott + LB8-8. Zatim slede Page + Ortanique i Page + (Clementine × Satsuma) koji ne sazrevaju pre januara dok Rhode Red Valencia + Dancy sazreva vrlo kasno u sezoni, tek u februaru/martu.

Ukoliko se vrednosti za TSS, TA i TSS:TA ispitivanih hibrida porede sa istim vrednostima ‘W.Murcott’ mandarine za koju se zna da ima izuzetno sladak i bogat ukus (Saunt 1990) vidi se da hibridi Page + (Clementine × Satsuma) (**Tabela 22**) i Hamlin + Dancy (**Tabela 23**) imaju vrlo slične TSS:TA u toku perioda sazrevanja kao i ova komercijalna mandarina. Takođe se vidi da TSS:TA vrednosti tri hibrida Succari + Changsha (**Tabela 24**), Succari + Murcott (**Tabela 25**) i Murcott + LB8-8 (**Tabela 26**) čak i prevazilaze vrednosti tog parametra koji ima ‘W.Murcott’ i to pretežno zahvaljujući njihovim vrlo niskim vrednostima za kiselost koje se kreću u rasponu od 0.45-0.8%. Rezultati iz **Tabela 21-27** još pokazuju da je u okviru pojedinačnih kultivara °briks različit u dve uzastopne sezone merenja svih parametara (2010/11 i 2011/12) i da je kiselost uvek niža u drugoj sezoni pri čemu je i odnos °briks /kiselost u toj sezoni viši. Ukoliko se podaci za prosečne 24-h temperature (uzeti iz arhiviranih metereoloških

podataka na Internet stranici floridske metereološke službe tzv. Florida Automated Weather Network - FAWM) prikažu grafički za tri uzastopne godine 2010, 2011 i 2012. godinu (**Grafikon 5**) vidi se da je 2010/11 sezona sazrevanja plodova (u periodu od novembra do februara) bila najhladnija u poređenju sa drugima. Očigledno je da su



Grafikon 5. Prikaz prosečnih dnevnih temperatura (uzeto iz metereoloških podataka arhiviranih na Internet stranici floridske metereološke službe - FAWN) za 2010., 2011. i 2012. godinu.

niže temperature u toku prve sezone sazrevanja plodova uticale na to da su oni u toj sezoni kiseliji tj. imaju više koncentracije organskih kiselina i samim tim niži odnos °briks /kiselost u odnosu na plodove sazrele u drugoj, toplijoj sezoni. Iz literature se odavno zna da je unutrašnji kvalitet plodova pod velikim uticajem klime a naročito pod uticajem temperature i vlage (Goldschmidt 1997). Plodovi koji sazrevaju u tropskim predelima sa visokim temperaturama i vlažnošću (Florida, Teksas) imaju visoke koncentracije TSS ali sa druge strane i niske koncentracije kiseline. Ove niske koncentracije kiselina mogu da budu problem za mandarine i pomorandže u smislu da smanjena koncentracija kiselina i povećan odnos °briks/kiselost mogu, u odsustvu hladnih noći u toku perioda sazrevanja, u nekim slučajevima da dovedu do stvaranja plodova izuzetno lošeg, neprijatnog ukusa. S druge strane u hladnijim subtropskim oblastima (Kalifornija, Arizona) mandarine i pomorandže zbog većeg broja hladnijih noći proizvode veće koncentracija organskih kiselina u plodu zahvaljujući čemu se zbog optimalnog odnosa °briks/kiselost kod njih razvija mnogo kvalitetniji ukus u odnosu na mandarine sazrele u tropskom predelu. Florda je zbog ovih činjenica poznata po gajenju

izuzetno kvalitetnih kultivara grejpfruta a Kalifornija po gajenju mandarina (Goldschmidt 1997).

Kao što temperatura i vlažnost vazduha utiču na unutrašnji kvalitet ploda u toku sazrevanja, preko promena parametara TSS, TA i TSS:TA, isto tako utiču i na “razvijanje” boje ploda od zelene do narandžaste. Visoke temperature sprečavaju gubitak hlorofila i istovremenu akumulaciju karotenoida. Voće u tropskom regionu gde u toku zime nema puno hladnih noći zbog ovih uslova ostaje dugo zeleno i/ili postiže samo bleđu narandžastu boju. Niske temperature, s druge strane, podstiču promenu boje kore od zelene u narandžastu (Goldschmidt 1997). Na taj način se boje spoljašnje kore (egzokarpa), srži (mezokarpa) i iscedenog soka plodova kod svih sedam ispitivanih hibrida menjaju u funkciji vremena u toku obe sezone sazrevanja plodova tj. postaju tamnije sa snižavanjem dnevnih temperatura i istovremenim sazrevanjem plodova (**Tabele 21-27**). U periodu najveće zrelosti, šest od ukupno sedam hibrida zadobija divnu tamno-narandžastu boju unutrašnjosti i spoljašnjosti ploda slično plodovima ‘W.Murcott’ komercijalnog kultivara koji je poznat i cenjen na tržištu po izuzetno lepoj tamno-narandžastoj boji ploda (**Slike 5.g,h**). Naime, ako se hibridi porede međusobno Hamlin + Dancy ima najsvetliju žuto-narandžastu boju ploda; hibrid Page + (Clementine × Satsuma) ima najtamniju narandžastu nijansu boje kore, srži i soka (**Slika 21**); dok se boja kore, srži i soka ostalih pet hibrida nalazi između ove dve nijanse narandžaste. **Slike 6.m,n** pokazuju da ovi tetraploidni somatski hibridi mogu da nadmaše i svoje roditelje po lepoti boje unutrašnjosti i spoljašnjosti plodova.

5.2. Interploidna i diploidna seksualna hibridizacija

5.2.1. Uspešnost oprašivanja i formiranja plodova

Seksualno ukrštanje ($2x \times 2x$; $2x \times 4x$; $4x \times 2x$) mandarina i njihovih hibrida rađeno u dve uzastopne kalendarske godine (2011 i 2012) i “spašavanje” tj. *in vitro* kultura embriona proisteklih iz tog ukrštanja su omogućili dobijanje velikog broja (718) triploidnih ($3x$) biljaka. Iz literature je poznato da je stvaranje triploidnih ($3x$) hibrida jedna od najvažnijih strategija u oplemenjivanju citrusa jer se tako dobijaju novi bezsemeni kultivari od velikog komercijalnog značaja, obzirom da na tržištu svežeg voća postoji ogromna potražnja za bezsemenim plodovima (Ollitrault *et al.* 2008). Naime, $3x$ biljke su zbog stvaranja aneuploidnih ženskih i/ili muških gameta i samim

tim smanjene gametske vijabilnosti u principu sterilne. Povremeno se javljaju i odstupanja od ove pravilnosti. U izuzetno retkim slučajevima $3x$ biljke mogu da stvore plodove sa vrlo malim brojem semena i to kada se desi da među ženskim nevijabilnim gametima postoje i oni sa očuvanom vijabilnošću. Takođe, $3x$ biljke mogu da indukuju stvaranje semena u slučajevima kada dođe do proizvodnje malog broja muških gameta sa očuvanom vijabilnošću. U oba ova slučaja potrebno je da dođe do ukrštanja sa nekim drugim kompatibilnim kultivarom (Fatta del Bosco *et al.* 1992; Otto & Whitton 2000).

Od ukupno 48 kombinacija seksualnog ukrštanja urađenih u ovom radu, u čak 43 kombinacije je diploidni ($2x$) ženski roditelj oprašen sa tetraploidnim ($4x$) muškim roditeljem. U preostalih pet roditeljskih kombinacija su četiri bile $4x \times 2x$ a jedna tipa $2x \times 2x$. Akcenat je bio na interploidnom diploidnom $\times$ tetraploidnom ($2x \times 4x$) ukrštanju zbog dostupnosti monoembriogenih, neapomiktičnih diploidnih ($2x$) ženskih roditelja (koji nemaju mogućnost samooprašivanja) i postojanja visokokvalitetnih tetraploidnih biljaka kao polenskih roditelja. U interploidnoj hibridizaciji citrusa se već odavno preporučuje da se umesto poliembriogenih i/ili delimično apomiktičnih ženskih roditelja koriste monoembriogene biljke jer se jedino tako može u potomstvu dobiti velika populacija genetički jedinstvenih triploida (Grosser *et al.* 2000; Ollitrault *et al.* 2008; Grosser & Gmitter, 2011). U suprotnom se dobijaju nucelarna poliembriogena semena sa mnoštvom embriona koji su beskorisni u genetičkom oplemenjivanju obzirom da su genetičke kopije majke biljke (za njih se kaže da su “true to type”). Iz 28 kombinacija ukrštanja (urađenih 2011. god.) i 18 (urađenih 2012. god.) kombinacija interploidnog ($2x \times 4x$) ukrštanja je proizašlo 23 (82%) odnosno 12 (67%) roditeljskih kombinacija ukrštanja sa plodovima (**Tabele 29, 31**). Dobijene kombinacije su imale različitu uspešnost u proizvodnji plodova tj. od 1% do 63% cvetova je proizvelo plodove nakon oprašivanja. Jedino se kultivar ‘Sugar Belle’u ukrštanju $2x \times 4x$ ističe po izuzetno dobroj proizvodnji plodova nezavisno od polinatora i godine (34-63%) dok kod ostalih ženskih roditelja prinos dosta zavisi od oba spomenuta faktora. Slične rezultate i zapažanja su dobili Vilorio & Grosser (2005) u eksperimentima genetičkog oplemenjivanja kiselih citrusa: nezavisno od polinatora i godine kultivar ‘Key’ lajm je imao najniži (5-24%) a limunovi (7-88%) i ‘Etrog’ citron (25-80%) najviši prinos plodova.

U prvoj godini je iz svih $2x \times 4x$ ukrštanja bilo dostupno za analizu ukupno 117 a u drugoj 70 plodova. Kod četiri različite $4x \times 2x$ hibridizacije, koje su urađene po dve u svakoj godini, samo je jedna (M+LB88) $\times$ P proizvela plod ali to nije imalo značaja jer je bio bezsemen. Vilorio & Grosser (2005) su u eksperimentima genetičkog oplemenjivanja kiselih citrusa kod 32 (od ukupno 42) različite roditeljske kombinacije ($2x \times 4x$) ukrštanja dobili uspešnost u proizvodnji plodova od 5% do 87.5%. Slično rezultatima u ovoj disertaciji, $4x \times 2x$ ukrštanja su bila manje uspešna. Procenat cvetova koji su dali plodove se kod tri od ukupno osam ($4x \times 2x$) kombinacija kretao od 3.5-20% i to samo kada je ženski roditelj bio tetraploid 'Hamlin' slatka pomorandža $\times$ 'Femminello' limun. Treba napomenuti da su ista ukrštanja bila ponovljena u toku dve uzastopne godine. Autori su zaključili da su faktori vezani za oprašivanje/oplodnju kao i različit odnos ploidnosti između roditelja u mnogome uticali na slabi prinos plodova posle ručno obavljene polinacije, obzirom da su ženski roditelji dali značajno veći broj plodova iz prirodno otvorenih cvetova oprašenih pomoću pčela ili vetra s nekim drugim polinatorom. S druge strane, Aleza *et al.* (2010a, 2012a) su pored uspešne proizvodnje plodova u ($2x \times 2x$) i ($2x \times 4x$) hibridizacijama (sa 59% odnosno 61% oprašenih cvetova koji su dali plodove) imali značajan prinos plodova i u ($4x \times 2x$) hibridizaciji: 36% oprašenih cvetova je dalo plodove kad je ženski roditelj bio 'Clemenules' mandarina, dok je bio 39% kad je ženski roditelj bio kultivar 'Fina' mandarine (Aleza *et al.* 2012b). Za razliku od ($4x \times 2x$) ukrštanja urađenih u ovoj disertaciji koja su bila malobrojna i bez mogućnosti ponavljanja, Aleza *et al.* su spomenute ženske roditelje ukrstili sa 11 tj. 12 polinatora u rasponu od 6 uzastopnih godina pa je ova ponovljivost verovatno i razlog tako dobrih rezultata.

U 2011. i 2012. godini je urađeno 48 roditeljskih kombinacija ukrštanja od kojih su samo četiri bile ponovljene jer je bio cilj da se u potomstvu dobije što više originalnih $3x$ biljaka. Ponavljanje ukrštanja kod neuspelih kombinacija u prvoj godini nije bile moguće u drugoj zbog neadekvatnog fiziološkog stanja roditelja koje je bilo rezultat lošeg staranja i/ili infekcija bakterijskim patogenima koji izazivaju bolesti "greening" i "canker". Usled toga, rezultati dobijeni za pojedinačne kombinacije u jednoj godini nisu uporedljivi sa rezultatima u drugoj godini sem u prethodno spomenutim slučajevima ponovljene tri $2x \times 4x$ i jedne $2x \times 2x$ hibridizacije. Ono što je zajedničko za rezultate u obe godine jeste da je u čak pet od deset (50%) neuspešnih

kombinacija interploidnog ($2x \times 4x$) ukrštanja polinator bio ‘Succari’ + ‘Murcott’ hibrid (**Tabele 29,31**) čija je vijabilnost polena od 35% i 48% (utvrđena histološkim bojenjem) bila izuzetno niska u odnosu na sve ostale polinatore (55-93%) (**Tabela 28**). Niske vrednosti vijabilnosti polena kod ovog kao i kod ‘Furr’ tangor polinatora korišćenog u ($4x \times 2x$) oprašivanju bi mogle biti jedan od razloga zašto nije došlo do forimiranja plodova kod ovih kombinacija ukrštanja. Međutim, visoke vrednosti vijabilnosti polena od 93% kod npr. ‘Page’ polinatora ne mogu nikako da objasne nemogućnost dobijanja plodova u oprašivanju dva $4x$ hibrida (Suc+HBP) i (M+LB8-8) u 2012. godini. Isto tako četiri polinatora (N+Osc, RR + D, H + D, Suc + Ch), sa visokim vrednostima za vijabilnost polena (>50% **Tabela 28**), su pri oprašivanju nekih ženskih roditelja dali adekvatan prinos plodova dok u istoj godini u oprašivanju nekih drugih roditelja nisu dali apsolutno ni jedan plod. Na kraju, treba spomenuti najefikasnijeg polinatora u 2011. godini (M+LB88) koji u sledećoj godini nije uspeo da opraši ni jedan od dva ženska roditelja (‘Marisol Clementine’ i ‘Temple’) pri čemu je u obe godine imao dobru vijabilnost polena od 85% i 59%. Svi navedeni primeri ukazuju da postoje i neki drugi genetički faktori sem vijabilnosti polena koji utiču na oprašivanje i stvaranje plodova. Jackson & Futch (1997) navode seksualnu inkompatibilnost kao jedan od najvažnijih faktora koji uzrokuje loš prinos plodova kod citrusa. Ovi autori ukazuju da je seksualna inkompatibilnost najčešći uzrok pojave nemogućnosti samooplođenja i/ili oplodenja sa drugim kultivarima a posebno je prisutna u rodu *Citrus* i to najčešće kod kultivara pamela (*C. grandis*) i njihovih hibrida sa mandarinama (tangelima). Kada inkompatibilnost postoji, onda se u stubiću ženskog roditelja stvaraju inhibitori ili postoji odsustvo stimulatora rastenja polenove cevčice. Ovaj spori rast cevčice znači da će stubić biti odbačen (usled prirodnog procesa abscisije) mnogo pre nego polenova cevčica uspe da dopre do ovarijuma i izvrši oplodjenje. Pored genetičkih svakako da na polensku proizvodnju, klijanje i kinetiku prolaska cevčice kroz stubić u mnogome utiču sredinski faktori: svetlost, temperatura, hranljive materije u zemlji, prisustvo mikoriza i drugi (Ruane & Donohue 2007; Li & Huang 2009; Poulton *et al.* 2001).

5.2.2. Kategorizacija semena i uspešnost tehnike “spašavanja” embriona

Nakon detaljne analize nije utvrđena veza između prinosa plodova i prosečnog broja semena u plodu. Od svih $2x \times 4x$ hibridizacija urađenih u dve uzastopne godine

(računajući i tri ponovljene) je dobijeno 3071 (2150+921) semena (**Tabele 29, 31**). Ovako visok ukupan broj semena se može pripisati korišćenju ženskih roditelja za koje se zna da u prisustvu drugih kompatibilnih oprašivača daju mnogosemene plodove (10-30) a ukoliko se drže izolovani od drugih oprašivača daju bezsemene plodove (usled postojanja nemogućnosti samooprašivanja) (vidi **Poglavlje 3.3**). Broj semena po plodu je u individualnim roditeljskim kombinacijama bio vrlo varijabilan (3-33) ali je kod većine kombinacija (37/43) bio >10 što takođe ide u prilog pretpostavci da je broj semena genetički determinisan visokom vijabilnošću ženskih gameta. Isto objašnjenje se može primeniti na roditeljske kombinacije koje su nakon ručnog oprašivanja proizvele veliki broj semena (8-33) a u kojima su oprašivači bili: P+Ort, P+(C×S), Mt+LB88, H + D koji inače u nekontrolisanoj polinaciji, kada su oni sami davaoci polena, imaju nizak prosečan broj semena: 6, 4, 2.5 i 4.5 (vidi **Poglavlje 4.1.6**). Viloria & Grosser (2005) su kod većine ženskih roditelja u ukrštanju kiselih citrusa dobili da je broj semena u ubranim plodovima bio sličan broju semena koji ovi roditelji imaju u plodovima proizašlim iz nekontrolisanih polinacija. Jedino su u roditeljskim kombinacijama dva ženska roditelja 'Lisbon' limun i 'Etrog' citron za koje se zna da prirodno daju mnogosemene plodove primetili varijabilnost u broju semena po plodu u zavisnosti od korišćenog polinatora.

Od ukupnog broja dobijenih semena u $2x \times 4x$ hibridizacijama, 1380 (45%) je bilo prazno a 1691 (55%) sa zigotskim embrionima (**Tabele 29, 31**). Kategorizacija semena po veličini je pokazala da je 79% njih bilo malo (kategorija Ib), 16% su bila semena srednje veličine (kategorija IIb) a gotovo da nije bilo velikih semena (5%-kategorija IIIb). Iz $2x \times 2x$ hibridizacije 'Lee' × 'Page' urađene u dve uzastopne godine je dobijeno 980 semena (**Tabele 29, 31**) pri čemu je 18% bilo prazno a 82% sa embrionima. Kod istog ukrštanja, kategorizacija semena po veličini je pokazala da su preovlađivala semena sa embrionima iz kategorije IIb (83%) dok ih je iz kategorije Ib bilo 11% a iz kategorije IIIb samo 6%. Radeći sličnu kategorizaciju semena po veličini, Viloria & Grosser (2005) su za većinu kombinacija $2x \times 4x$ hibridizacije kod kiselih citrusa dobili najviše srednjih semena sa embrionima mada je bilo i par kombinacija (sa ženskim roditeljima 'Lisbon' limun i 'Lakeland' hibrid lajma i kumkvata) gde su preovlađivala velika semena. Koristeći drugačiju kategorizaciju Aleza *et al.* (2012a) su u svom radu o oplemenjivanu mandarina korišćenjem $2x \times 4x$ ukrštanja razvrstali

semena u nerazvijena i razvijena (ne uzimajući u obzir veličinu semena). Ukoliko se uzmu u obzir opis stupnja razvića izolovanih zigotskih embriona iz semena i objavljenih fotografija različitih kategorija embriona na kojima se vidi i njihova veličina, može se povući paralela između nerazvijenih semena iz rada Aleza *et al.* (2012a) i kategorija Ib ove doktorske disertacije. Takođe bi se moglo reći da razvijena semena iz njihovog rada odgovaraju kategorijama Ib i IIb prikazanim u ovoj disertaciji. Pošto je u njihovom radu bilo 2651 nerazvijenih i 1061 razvijenih semena sa embrionima, zaključuje se da su kod tih kombinacija ukrštanja mandarina takođe preovlađivala semena iz kategorije Ib. U radu o oplemenjivanju mandarina korišćenjem $2x \times 2x$ ukrštanja, Aleza *et al.* (2010a) su razvrstali semena u tri kategorije: razvijena mala, nerazvijena i razvijena velika pri čemu su preovlađivala semena iz prve kategorije sa zigotskim embrionima koji su bili mali ali koji su imali razvijene kotiledone. Razvijena mala semena iz njihovog rada bi tako odgovarala kategoriji IIb iz ove disertacije koja su takođe bila najbrojnija u odnosu na ukupan broj semena.

Što se tiče vijabilnosti “spašenih” embriona, (**Tabele 30, 32**) vidi se da su zigotski embrioni iz svih $2x \times 4x$ hibridizacija imali klijavost od 66% dok je ta vrednost bila 92% kod $2x \times 2x$ hibridizacija. Ovo je pokazalo da je *in vitro* tehnika “spašavanja” embriona od velike pomoći u dobijanju triploidnih biljaka, naročito kada se radi o interploidnom $2x \times 4x$ ukrštanju jer ovako dobijena semena ne mogu da kličaju prirodno ukoliko se posade u zemlju. Aleza *et al.* (2012a) su u svom radu o oplemenjivanju mandarina korišćenjem $2x \times 4x$ ukrštanja dobili visoku klijavost embriona od 71% upravo zahvaljujući korišćenju ove tehnike. Na osnovu svojih rezultata su zaključili da svaki ozbiljan program oplemenjivanja citrusa mora da ima dobro razvijen protokol za “spašavanje” embriona bez obzira na zahtevnost ove tehnike u smislu radne snage, vremena i novca. Ovi autori *in vitro* “spašavanje” embriona vide kao neodvojiv deo interploidnog $2x \times 4x$ seksualnog ukrštanja. S druge strane, isti autori vide *in vitro* “spašavanje” embriona samo kao pomoćni deo prilikom korišćenja ($2x \times 2x$) i ($4x \times 2x$) hibridizacija. U radovima gde su koristili ove tipove hibridizacije, “spašeni” ekstrahovani embrioni su imali mnogo veću klijavost [$(2x \times 2x) = 93\%$ i $(4x \times 2x) = 97.5\%$] u odnosu na semena koja su zasejana direktno u zemlju (42% i 69.5%). Za razliku od predhodne kombinacije, kod $2x \times 4x$ hibridizacije čija semena ne kličaju u zemlji, semena iz ($2x \times 2x$) i ($4x \times 2x$) hibridizacije uspešno kličaju u zemlji.

Rezultati prikazani u **Tabelama 30 i 32** pokazuju da klijanje embriona i njihov razvitak u biljke u uslovima *in vitro* tj. “spašavanje” embriona pored toga što zavisi od roditeljske kombinacije ukrštanja, zavisi i od razvojne faze samog zigotskog embriona i hranljive podloge. Vilorio (2003) je na osnovu svojih rezultata hibridizacije kod kiselih citrusa zaključila da što je razvojna faza embriona niža u trenutku njegove izolacije iz semena to je šansa za njegovo preživljavanje i klijanje u biljku manja. Slični zaključci se mogu izvući i na osnovu rezultata prikazanih u ovoj doktorskoj disertaciji. Kao što se može videti u **Tabelama 30 i 32**, na osnovu vrednosti #T, #G i #FD mogu se izračunati dva parametra: procenat prokljalih zigotskih embriona na hranljivim podlogama i procenat prokljalih embriona koji su se razvili u biljke. Ukoliko se dalje izračunaju srednje vrednosti ovih parametara za sve $2x \times 4x$ hibridizacije (kojima je najpotrebnije “spašavanje” embriona) za obe godine, vidi se da su oni bili niži kod izolovanih embriona u globularnoj fazi (78% i 80%) u odnosu na nezrele (92% i 91%) i zrele embione (95% i 92%). Pored toga, proučavana je efikasnost klijanja (%) izolovanih embriona na dve hranljive podloge (0.15 M EME-suc sa 50g/l saharoze i 0.15 M EME-malt sa 50 g/l maltoze) sa i bez “vlažnih” aceto-celuloznih filter papira (**Grafikon 4**). Na osnovu rezultata se može zaključiti da hranljive podloge nisu imale veliki uticaj na klijanje izolovanih zigotskih embriona obzirom da je klijanje (>80%) bilo slično na sva četiri tretmana. Razlog tome je najverovatnije izbor vrlo sličnih hranljivih podloga po hemijskom sastavu koji imaju već dokazanu efikasnost kod mnogih vrsta i kultivara iz roda *Citrus* (Tomaz *et al.* 2001; Niedz *et al.* 2002). Vilorio (2003) je pokazao da je indukcija klijanja abortiranih zigotskih embrioana na B5 hranljivoj podlozi mnogo bolja (62%) kod embriona iz interploidnog ukrštanja kiselih citrusa u odnosu na EME-suc hranljivu podlogu (45%). Pored toga, dodatak GA_3 u ove hranljive podloge pokazao je pozitivan efekat na klijanje “spašenih” zigotskih embiona.

Od ukupno 34 roditeljske kombinacije ukrštanja kod kojih je došlo do formiranja semena u dve uzastopne godine sve su sem tri u 2012. godini [*‘Ambersweet’* $\times$ P+(C $\times$ S); *‘Ambersweet ZH’* $\times$ Suc+Mt; *‘G96’* $\times$ Suc+Mt] proizvele triploidne (3x) biljke (**Tabele 30, 32**). Trinaest kombinacija ukrštanja je takođe proizvelo tetraploidne (4x) biljke – bilo je ukupno 31 koje nisu preživele. Iz 33 kombinacije interploidnog ($2x \times 4x$) ukrštanja je metodom “spašavanja” embriona dobijeno 1114 biljaka. Većina ovih biljaka tj. njih 689 (62%) je bila triploidna, dok su ostale bile diploidne (394 tj. 35%) i

tetraploidne (31 tj. 3%). Zigotski embrioni su bili razvrstani u tri kategorije na osnovu razvojne faze u trenutku izolovanja iz semena, (**Tabele 30, 32**) i dobijeno je da je 97% triploidnih biljaka proisteklo iz prve kategorije najnerazvijenijih embriona koji su se nalazili u globularnoj/ranoj kotiledonarnoj fazi tokom izolacije. Ovaj rezultat je očekivan obzirom da je nerazvijenih embriona u odnosu na ukupan broj ekstrahovanih bilo i najviše (1468/1691). Ostatak triploida je proključao iz nezrelih i zrelih embriona (10 i 14). Nasuprot tome, većina tetraploidnih biljaka su dobijene "spašavanjem" zigotskih embriona upravo iz ove dve kategorije nezrelih i zrelih embriona (12 i 17) a samo dve iz prve kategorije (globularnoj/rano kotiledonarna faza razvika).

Aleza *et al.* (2012a) su takođe dobili visok procenat triploidnih biljaka iz interploidnih ($2x \times 4x$) hibridizacija mandarina rađenih u toku desetogodišnjeg perioda. U svom radu su objavili da su iz 16 različitih kombinacija dobili 6220 embriona odakle je proključalo 3712 biljaka: 2915 triploidnih (79%), 427 tetraploidnih (11%) i 367 diploidnih (10%). Iz njihove kategorije nerazvijenih semena je proisteklo čak 2636 (90%) triploida. Obzirom da autori navode da su iz ove kategorije semena izolovali embrione koji su, u tom trenutku, nalazili se u globularnoj/ranoj kotiledonarnoj fazi razvika to odgovara gore navedenim rezultatima prikazanim u ovoj doktorskoj disertaciji da se najveći broj triploidnih embriona dobijenih iz $2x \times 4x$ ukrštanja nalazi u semenima sa abortiranim endospermom. Zbog abortiranja endosperma i sami zigotski embrioni ostaju zakržljali u semenima dakle, na niskom stupnju razvika i bez daljeg razvitka i mogućnosti klijanja u uslovima *in vivo*. Ovu nemogućnost preživljavanja embriona kao posledicu nerazvijenosti endosperma koji degeneriše 7-10 nedelja nakon oplodjenja su utvrdili Esen & Soost još 1977. godine. Soost & Roose su kasnije (1996) uočenu nemogućnost preživljavanja embriona pokušali da objasne "neodgovarajućim" odnosom ploidnosti embriona i endosperma od 3:4. Ipak se smatra da EBN-hipoteza (vidi **Poglavlje 1.8.1**) daje najbolje objašnjenje ove pojave u $2x \times 4x$ ukrštanju kroz odnos maternalnih-paternalnih gena u endospermu od 1:1 što kao posledicu ima ne razvijanje endosperma i izaziva abortiranja embriona (Johnson *et al.* 1980; Carpato *et al.* 2003). Ukoliko se ovakvi embrioni ne "spasu" na vreme tj. izoluju iz semena i postave na odgovarajuću *in vitro* hranljivu podlogu dolazi do njihovog umiranja. Viloria *et al.* (2005) su kod kiselih citrusa prvi put primenili metodu *in vitro* "spašavanja" 12-15 nedelja nakon polinacije koja je primenjena i u ovoj doktorskoj disertaciji. Aleza *et*

al. (2012a) takođe navode da se za razliku od nerazvijenih, u razvijenim semenima nalaze embrioni sa kotiledonima ali da je njih u odnosu na zakržljale embrione jako malo. Iz njihove kategorije razvijenih semena (kojih je u odnosu na ukupan broj ekstrahovanih semena bilo samo 3.1%) je proisteklo samo 279 triploida. Razvijena semena bi najverovatnije mogla da klijaju u zemlji ali obzirom da su malobrojna i daju mali broj triploida to se nameće zaključak da je tehniku *in vitro* “spašavanja” embriona najbolje primeniti na sve kategorije semena koja poteknu iz $2x \times 4x$ ukrštanja. Važno je napomenuti da su Aleza *et al.* u istom radu analizirali triploidne biljke iz 12 razvijenih i 12 nerazvijenih semena pomoću SSR molekularnih markera i dobili da sva ona imaju jedan alel od ženskog a dva alela od muškog roditelja. Drugim rečima, triploidne biljke nastaju oplođenjem haploidne ovule i diploidnog polena ali ovo nije nikako povezano sa odnosom maternalnih-paternalnih gena u endospermu od 1:1 koju objašnjava EBN-hipoteza (vidi **Poglavlje 1.8.1**).

Iz jedine $2x \times 2x$ kombinacije ukrštanja ponovljene u dve uzastopne godine je ekstrahovano 799 zigotskih embriona odakle je proklijalo 735 biljaka. Za razliku od $2x \times 4x$ ukrštanja, ovde je dobijeno samo 4% (29) triploidnih biljaka dok su sve ostale bile diploidne (706 tj. 96%). Kao rezultat ovoh ukrštanja nije dobijena ni jedna tetraploidna biljka. Ovako nizak procenat dobijenih triploidnih biljaka je očekivan obzirom da su Esen & Soost (1971) su još pre četrdeset godina objavili da je u $2x \times 2x$ hibridizaciji frekvencija stvaranja neredukovanih $2n$ ženskih gameta generalno vrlo niska i da se u zavisnosti od genotipa kreće od 1% do 20%. U svom drugom radu, Esen *et al.* (1979) su pokazali da je $2n$ jajna ćelija rezultat abortiranja druge mejotičke deobe u megaspori a Luro *et al.* (2000) su potvrdili ovaj mehanizam nastajanja neredukovanih gameta u grupi klementina (*C. reticulata*). U grupi slatkih pomorandži (*C. sinensis*) neredukovane jajne ćelije su rezultat restitucije nukleusa posle I mejotičke deobe (Chen *et al.* 2008c).

Nasuprot rezultatima ove teze gde je dobijen relativno nizak procenat triploidnih biljaka, Aleza *et al.* (2010a) su u toku 10-godišnjeg ukrštanja mandarina (44 različite kombinacije) na diploidnom nivou ($2x \times 2x$) dobili veoma visok procenat triploidnih biljaka 3497/3816 tj. 92%, dok su preostale biljke bile uglavnom diploidne. Ovako visok procenat dobijanja triploida se možda može objasniti velikim brojem kombinacija u kojima su birane monoembriogene majke biljke sa visokom frekvencijom stvaranja *neredukovanih* $2n$ ženskih gameta. Najveći broj triploida je po ovim autorima potekao

iz kategorije razvijenih malih semena u kojima su u trenutku izolovanja zigotski embrioni bili sa jasno razvijenim kotiledonima. Razvijena mala semena su po merenjima autora bila za 52-62% manja u odnosu na razvijena velika semena. Ukoliko se uzme u obzir njihova veličina, izgled i opis stupnja razvića embriona u njima, mala semena najviše odgovaraju IIb kategoriji semena prikazanih u ovoj disertaciji koja su takođe bila najbrojnija (664/779 ili 83%). Jedina razlika je što su iz semena kategorije IIb ekstrahovani embrioni i u globularnoj i u nezreloj fazi (gde su embrioni posedovali male ali jasno razvijene kotiledone). Bez obzira na stupanj razvića u momentu izolacije, svi zigotski embrioni iz IIb kategorije su posle gajenja u uslovima *in vitro* imali odličnu klijavost (98% i 96%) i dalji razvitak u odrasle biljke (91% i 98%) što znači da se i ovde metoda „spašavanja“ embriona pokazala kao vrlo uspešna. Ispitujući klijavost malih semena Aleza *et al.* (2010a) su dobili da oni spontano mogu da klijaju i u zemlji ali sa smanjenom efikasnošću (42%) u odnosu na izuzetno dobru klijavost (93%) koju pokazuju kada se izoluju i gaje u uslovima *in vitro* nakon njihovog „spašavanja“. Na osnovu ovih rezultata su dalje zaključili da je na mala semena mnogo bolje primeniti tehniku *in vitro* „spašavanja“ embriona nego ih isključivati u zemlji. Obzirom da su i rezultati ove disertacije (**Tabele 29-32**) pokazali da se triploidi iz $2x \times 2x$ ukrštanja dobijaju ne samo iz kategorije IIb semena već i iz kategorija Ib i IIIb nametnuo se zaključak da je tehniku *in vitro* „spašavanja“ embriona najbolje primeniti na sve kategorije semena koja poteknu iz $2x \times 2x$ ukrštanja baš kao što je to bio zaključak i u prethodno analiziranom $2x \times 4x$ ukrštanju. Kao generalni zaključak može se reći da semena sa hibridnim embrionima iz $2x \times 4x$ ukrštanja nemaju uopšte sposobnost klijanja u zemlji dok je ta sposobnost kod njih smanjena kad potiču iz $2x \times 2x$ ukrštanja. Smanjena ali ipak očuvana sposobnost klijanja kod $2x \times 2x$ hibridnih semena potiče od delimičnog razvitka endosperma što kao rezultat obezbeđuje dalji normalni razvitak zigotskog embriona.

Esen & Soost (1971, 1973b) kao i Soost & Roose (1996) su očuvanu sposobnost klijanja kod $2x \times 2x$ hibridnih semena pokušali da objasne balansiranim odnosom između triploidnog embriona i pentaploidnog endosperma. Međutim, za razliku od triploidnog endosperma proisteklog iz $2x \times 2x$ nehibridnih semena kod pentaploidnog endosperma se uočava sporije rastenje i u jednom trenutku on prestaje da se razvija pa embrioni ostaju pretežno na nezrelom stupnju razvića ali očigledno i dalje sa

sposobnošću spontanog klijanja u zemlji. Generalno, sporiji razvoj endosperma i embriona u hibridnim semenima koja potiču iz $2x \times 2x$ ukrštanja bi po ovim autorima bio uzrok manje veličine tih semena. Po već spomenutoj EBN-hipotezi ipak je ono što omogućava delimično razvijanje endosperma i daje normalniji razvitak embriona ustvari “adekvatni” odnos maternalnih-paternalnih gena u endospermu od 4:1 (Johnson *et al.* 1980; Carputo *et al.* 2003).

Smanjena ali ipak očuvana sposobnost klijanja ne samo da postoji kod $2x \times 2x$ već i kod $4x \times 2x$ hibridnih semena i takođe se objašnjava odnosom maternalnih-paternalnih gena u endospermu od 4:1 (Johnson *et al.* 1980; Carputo *et al.* 2003). U ovoj disertaciji, $4x \times 2x$ ukrštanje nije bilo uspešno u smislu da je od četiri različite kombinacije samo jedna dala plod koji je na žalost bio bezsemen. Pored klimatskih faktora i loših metoda gajenja drveća korišćenih u eksperimentu jedan od važnih uzroka neuspeha leži u seksualnoj inkompatibilnosti muških i ženskih roditelja. Na ovaj zaključak navodi činjenica da su ženski roditelji dali značajno veći broj plodova iz prirodno otvorenih cvetova oprašenih pomoću pčela ili vetra s nekim drugim polinatorom u odnosu na ručno oplodene cvetove. Vilorio *et al.* (2005) su dobili da su od osam urađenih $4x \times 2x$ kombinacija kiselih citrusa bile uspešne samo dve i to tako što su proizvele šest triploidnih biljaka. Mnogo uspešniji su bili Aleza *et al.* (2012b) koji su iz 23 kombinacije mandarina dobili 1700 biljaka: 1667 triploidnih (98.1%), 7 diploidnih (0.4%), 8 tetraploidnih (0.5%), 9 pentaploidnih (0.5%), 5 heksaploidnih (0.3%) i 4 aneuploidnih (0.2%).

Ispitujući i ovde klijavost malih semena odakle su pretežno dobijeni triploidni embrioni, Aleza *et al.* (2012b) su dobili da oni, kao i hibridna $2x \times 2x$ semena mogu spontano da klijaju i u zemlji. Međutim, dok je vijabilnost hibridnih $2x \times 2x$ semena bila 42% ona je kod kod $4x \times 2x$ semena iznosila čak 69.5%. Na osnovu ovih rezultata, autori su zaključili da se pri korišćenju neapomiktičnih tj. monoembriogenih alotetraploidnih ženskih roditelja u $4x \times 2x$ ukrštanju ne mora primenjivati metoda “spašavanja” embriona. Grosser & Gmitter (2011) su tako isključujući semena direktno u zemlji dobili na stotine triploidnih grejpfrut/pamelo hibrida.

5.2.3. Efikasnost dobijanja triploidnih hibrida

Efikasnost dobijanja triploidnih hibrida je za pojedinačne roditeljske ($2x \times 2x$) i ($2x \times 4x$) kombinacije izračunata kao broj triploidnih seksualnih hibrida po dobijenom plodu (Tabele 30, 32). Ovaj parametar je važan jer se na osnovu njega u principu mogu međusobno porediti roditeljske kombinacije u toku jedne ili različitih godina i čak uraditi srednje vrednosti za svaki tip hibridizacije pojedinačno po godinama i onda međusobno porediti njihova efikasnost.

Efikasnost triploidne proizvodnje je značajno varirala među roditeljskim kombinacijama $2x \times 4x$ u obe ispitivane godine. U 2011. godini je vrednost ovog parametra pokazivala veliki opseg od 0.3 do 16 dok je u 2012. godini variranje iznosilo od 0.1 do 8.8. U obe godine je zabeležen sličan trend u kome su različiti ženski roditelji oprašeni sa istim polinatorom imali različitu efikasnost dobijanja triploida iz čega se može zaključiti da je efikasnost zavisila od kultivara koji je bio ženski roditelj. Takođe, isti ženski roditelji oprašeni sa različitim polinatorima su imali različitu efikasnost triploidne proizvodnje što navodi na zaključak da je efikasnost dobijanja triploidnih hibrida zavisila i od vrste polinatora. Tako se na osnovu rezultata ove disertacije može reći da se uspeh dobijanja triploidnih biljaka nalazio pod uticajem oba roditelja. O uticaju sredinskih faktora i njihovoj interakciji sa roditeljskim genotipovima se ne može mnogo diskutovati obzirom da su samo četiri istovetne roditeljske kombinacije bile ponovljene u obe godine – tri iz $2x \times 4x$ i jedna iz $2x \times 2x$ hibridizacije. One su imale različite vrednosti merenog parametra u različitim godinama. Roditeljska kombinacija 'Marisol Clementine' mandarina $\times$ (Suc+Mt) je imala efikasnost triploidne proizvodnje 1 u 2011. godini a 0.5 u 2012. godini; 'Fallglo' mandarina $\times$ P+(C $\times$ S) je imala efikasnost triploidne proizvodnje 8 u 2011. godini a 8.8 u 2012. godini; 'Fallglo' mandarina $\times$ (Suc+Mt) uopšte nije dala plodove ni u jednoj godini pa se ona ne može ni uzeti u razmatranje, dok je kombinacija 'Lee' $\times$ 'Page' imala efikasnost triploidne proizvodnje od 1.2 u 2011. godini a 0.3 u 2012. godini. Ukoliko se izračuna srednja vrednost ovog parametra za sve $2x \times 4x$ hibridizacije zajedno (nevezano za broj i različitost roditeljskih kombinacija) dobija se vrednost od 4.8 u 2011. godini i u odnosu na nju 60% manja vrednost od 1.9 u 2012 godini. Uzimajući u obzir da je za jedinu urađenu $2x \times 2x$ hibridizaciju, broj triploidnih seksualnih hibrida po plodu u 2012. godini bio takođe manji i to za 75% u odnosu na 2011. godinu nameće se zaključak da

su nevezano za tip hibridizacije sredinski faktori u ove dve godine imali veliki uticaja na uspešnost proizvodnje hibrida.

Aleza *et al.* (2010a, 2012a, 2012b) su u sva tri tipa hibridizacije mandarina na osnovu variranja efikasnosti dobijanja triploida u zavisnosti od ženskog roditelja, muškog roditelja i godine polinacije uočili uticaj oba roditelja i sredinskih faktora. Ovi autori su istakli da je u delovanju svih ovih faktora ipak bila najizraženija interakcija između muškog roditelja i sredinskih faktora tj. njihov zajednički uticaj na dobijanje triploida. Na ovaj zaključak ih je navelo nekoliko činjenica. Prvo, uočeno je postojanje visoke tzv. međugodišnje varijabilnosti za isti tip roditeljske kombinacije gde je vrednost efikasnosti triploidne proizvodnje jako varirala iz godine u godinu (posmatrano u pet različitih godina). Drugo, rangiranje muških roditelja po uspešnosti da se dobiju triploidi kod dva ista ženska roditelja u jednoj godini nikako nije bilo ponovljivo u drugim godinama. Slično ovim autorima, Vilorio & Grosser (2005) su u $2x \times 4x$ hibridizacijama kiselih citrusa a Luro *et al.* (2004) u $2x \times 2x$ hibridizacijama mandarina iz grupe 'Clementine' pronašli i objavili da postoji uticaj muškog roditelja i sredinskih faktora na proizvodnju triploidnih biljaka. To nije čudno obzirom da je u literaturi već dobro dokumentovan uticaj sredinskih faktora, naročito temperature, svetlosti i vlažnosti na mnoge faze seksualne reprodukcije biljaka (Stephenson *et al.* 1992) npr.: razvitak polena tj. njegov kvalitet i kvantitet, transfer polena sa muškog na ženski cvet, receptivnost stigme da podrži klijanje polena, klijanje polena, rast polenove cevčice kroz stubić, oplodjenje jajne ćelije i polarnog tela i naposljetku razvitak semena (Li & Huang 2009; Devasirvatham *et al.* 2012, Lora *et al.* 2012; Jiamanbai & Shapuxi 2013).

Dakle, proizvodnja triploida pored seksualne kompatibilnosti dva roditelja (što je genetički determinisano) u mnogome zavisi od sposobnosti polena da izvrši oplodjenje u smislu njegovog kvaliteta i klijavosti. S druge strane, kvalitet polena i klijavost polenove cevčice su kao što je već rečeno, pored genetičkih u mnogome zavisni i od sredinskih faktora. Tako se može videti i na osnovu rezultata ove doktorske disertacije (bez obzira na činjenicu da je mali broj roditeljskih kombinacija bio ponovljen u dve godine) da je uticaj sredinskih faktora značajan jer je sveopšta efikasnost dobijanja triploida u 2012. godini bio mnogo manja (obzirom na mnogo niže srednje vrednosti ovog parametra za $(2x \times 2x)$ i $(2x \times 4x)$ hibridizaciju) u odnosu na 2011. godinu.

Iz korišćenje opisane metodologije za seksualnu hibridizaciju mandarina je u toku dve godine iz $2x \times 4x$ ukrštanja dobijeno ukupno 718 dok je iz $2x \times 2x$ ukrštanja dobijeno 29 triploidnih biljaka. Na žalost, usled nepostojnja kvalitetnih tetraploidnih monoembriogenih ženskih roditelja posle $4x \times 2x$ ukrštanja nisu dobijeni hibridi. Svi dobijeni hibridi su uspešno nakalemljeni na specifične trolisne podloge, aklimatizovani u staklari i trenutno rastu u zemlji na parceli gde se primenjuje tzv. Rapid Evaluation System (vidi **Poglavlje 3.2.6**). Na plodove će se u narednih par godina primeniti brza evaluacija kvaliteta plodova. Obzirom da je cilj ove doktorske disertacije bio da se dobije potencijalno nov kultivar mandarine sa bezsemenim plodom visokog kvaliteta i kasnog sazrevanja, očekuje se da će dve dobijene populacije triploida biti dovoljne za selektovanje individua sa spomenutim karakteristikama koje će se onda dalje umnožavati u komercijalnije svrhe. Navarro *et al.* (2005) su u Španiji iz $2x \times 2x$ tipa ukrštanja mandarina u svom 10-godišnjem programu oplemenjivanja citrusa dobili ~4000 triploidnih biljaka od kojih je poteklo 13 novih triploidnih varijeteta mandarina zaštićenih biljnim patentima u zemljama Evropske Unije. Od ovih novih varijeteta dva triploidna hibrida mandarine se već intenzivno gaje u voćnjacima EU – ‘Gabi’ (Aleza *et al.* 2010c) i ‘Safor’ (Cuenca *et al.* 2010). U Italiji (Istituto Sperimentale per l’Agrumicoltura, Sicilia) je iz najčešće korišćenog $2x \times 4x$ tipa ukrštanja u prethodnoj deceniji proistekao interesantan tangor ‘Tacle’ (Starantinno 1999) ukrštanjem diploidne mandarine ‘Clementine’ sa autotetraploidom ‘Tarocco’ slatke pomorandže (od koje je hibrid nasledio intenzivnu crvenu boju srži). U Kaliforniji (University of California, Riverside) su iz opsežnog programa za unapređenje citrusa potekla tri triploidna hibrida srednje- i kasne-sezone sazrevanja plodova od ovih roditelja: ‘Temple’ tangor, ‘Dancy’ i ‘Encore’ mandarine. Dobijeni su: ‘Shasta Gold’, ‘Tahoe Gold’ i ‘Yosemite Gold’ hibridi koji proizvode velike bezsemene plodove tamno narandžaste boje, lakog ljuštenja kore i bogatog slatkog ukusa. Zbog svojih visoko-kvalitetnih karakteristika već su na usevima zasađene na značajnim površinama u Kaliforniji (Kahn & Chao 2004).

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu postavljenih zadataka i rezultata ove doktorske disertacije mogu se doneti sledeći zaključci:

- 1) Uspešno je indukovan embriogeni kalus i somatski embrioni nucelarnog porekla iz izolovanih ovula četiri kultivara: dva tangora ('Murcott' i 'W.Murcott'), tangela ('Page') i obične mandarine ('Ponkan').
- 2) Indukcija embriogenog kalusa i somatske embriogeneze je zavisila od genotipa kao i hranljive podloge. Najveća indukcija kalusa je dobijena gajenjem ovula na hranljivoj podlozi sa kinetinom, dok je najveći broj somatskih embriona dobijen na podlozi bez regulatora rastanja.
- 3) Prisustvo pektolijaze u enzimskoj smeši za izolaciju protoplasta iz ćelijskih suspenzija poreklom iz embriogenog kalusa je imalo negativan efekat na izolaciju protoplasta.
- 4) Primenom metode somatske hibridizacije uz pomoć hemijske fuzije protoplasta polietilen glikolom (PEG) uspešno su dobijeni novi tetraploidni hibridi kultivara/selekcija iz grupe mandarina: 'Ponkan', 'Willowleaf', 'Kinnow', 'Murcott', 'W.Murcott' i 'Snack'.
- 5) PEG molekulske mase 8000 je imao najveću uspešnost u fuziji protoplasta poreklom iz embriogenih ćelija suspenzija i mezofila listova.
- 6) Proizvedeni somatski hibridi su bili auto- i/ili alotetraploidi što je potvrđeno "flow" citometrijom i EST-SSR molekularnom metodom. Na osnovu ove analize utvrđeno je da je 28% dobijenih somatskih hibrida bilo alotetraploidno, 71% je bilo autotetraploidno, a za jednu biljku nije bilo moguće utvrditi prirodu ploidnosti.
- 7) Analiza plodova zrelih somatskih hibrida gajenih u polju je pokazala da su oni po mnogim morfološkim osobinama i kvalitetu iscedenog soka jednakog ili čak višeg kvaliteta od unapred utvrđenih standardnih vrednosti za minimum zrelosti i kvaliteta za grupu mandarina.
- 8) Metodom ručnog oprašivanja je izvršena klasična interploidna seksualna hibridizacija kod 48 roditeljskih kombinacija - polen poreklom od dva diploidna

- i 14 tetraploidnih muških roditelja je služio za oprašivanje 12 diploidnih i tri tetraploidna ženska roditelja.
- 9) Izvršena su tri tipa seksualnog ukrštanja ($2x \times 2x$; $2x \times 4x$; $4x \times 2x$), od kojih su ($2x \times 2x$) i ($2x \times 4x$) tipovi ukrštanja bili uspešni dok u kombinaciji ukrštanja $4x \times 2x$ nije postignut uspeh. Na osnovu 34 uspešne roditeljske kombinacije dobijeno je ukupno 4051 semena.
- 10) Iz interploidnog seksualnog ukrštanja $2x \times 4x$ proizvedeno je 689 triploida uz korišćenje 33 roditeljske kombinacije. Iz jedne roditeljske kombinacije $2x \times 2x$ dobijeno je 29 triploidnih hibrida.
- 11) *In vitro* tehnika “spašavanja” embriona je bila od presudne važnosti za dobijanje triploidnih biljaka, naročito u slučaju interploidnog $2x \times 4x$ ukrštanja jer ovako dobijena semena ne mogu da klijaju prirodno ukoliko se posade direktno u zemlju.

LITERATURA

- Aleza P, Juárez J, Cuenca J, Ollitrault P, Navarro L (2010a) Recovery of citrus triploid hybrids by embryo rescue and flow cytometry from $2x \times 2x$ sexual hybridisation and its application to extensive breeding programs. *Plant Cell Rep.* 29: 1023-1034.
- Aleza P, Juárez J, Ollitrault P, Navarro L (2010b) Polyembryony in non-apomictic citrus genotypes. *Ann. Bot.* 106: 533-545.
- Aleza P, Cuenca J, Juárez J, Pina JA, Navarro L (2010c) 'Garbí' mandarin: a new late-maturing triploid hybrid. *HortScience* 45(1):139-141.
- Aleza P, Froelicher Y, Schwarz S, Agustí M, Hernández M, Juárez J, Luro F, Morillon R, Navarro L, Ollitrault P (2011) Tetraploidization events by chromosome doubling of nucellar cells are frequent in apomictic citrus and are dependent on genotype and environment. *Ann. Bot.* 108: 37-50.
- Aleza P, Juárez J, Cuenca J, Ollitrault P, Navarro L (2012a) Extensive citrus triploid hybrid production by $2x \times 4x$ sexual hybridizations and parent-effect on the length of the juvenile phase. *Plant Cell Rep.* 31: 1723-1735.
- Aleza P, Juárez J, Hernández M, Ollitrault P, Navarro L (2012b) Implementation of extensive citrus triploid breeding programs based on $4x \times 2x$ sexual hybridisations. *Tree Genet. & Genomes* 8: 1293-1306.
- Ali S, Khan AS, Raza SA, Rehman RNU (2013) Innovative breeding methods to develop seedless citrus cultivars. *Int. J. of Biosci.* 3: 76-86.
- Allen M (2000) A seed is planted: Citrus emerges to cultivate a new land. *Florida Grower*, pp. 10-13.
- An HJ, Jin SB, Kang BC, Park HG (2008) Production of somatic hybrids between 'Satsuma' mandarin (*Citrus unshiu*) and 'Navel' orange (*Citrus sinensis*) by protoplast fusion. *J. Plant Biol.* 51: 186-191.
- Ben-Hayyim G & Neumann H (1983) Stimulatory effect of glycerol on growth and somatic embryogenesis in Citrus callus cultures. *Z. Pflanzenphysiol.* 110: 331-337.
- Burger DW & Hackett WP (1982) The isolation, culture and division of protoplasts from citrus cotyledons. *Physiologia Plantarum* 56: 324-328.
- Button J, Kochba J, Bornman CH (1974) Fine structure of and embryoid development from embryogenic ovular callus of 'Shamouti' orange (*C. sinensis* Osb.). *J. of Exp. Botany* 25: 446-457.
- Calabrese F (1998) La favolosa storia degli agrumi. L'Epos Societa Editrice, Palermo.
- Cameron JW & Frost HB (1968) Genetic, breeding and nucellar embryony. In: Reuther W, Batchelor LD, Webber HJ (Eds.) *The citrus industry*. Vol 1., University of California, Riverside, pp. 325-370.
- Carimi F, Pasquela FD, Crescimanno FG (1994) Somatic embryogenesis from styles of lemon (*C. limon*). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 37: 209-211.
- Carimi F, Tortorici MC, De Pasquale F, Crescimanno FG (1998) Somatic embryogenesis and plant regeneration from undeveloped ovules and stigma/style explants of sweet orange navel group (*Citrus sinensis* L. Osb.). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 54: 183-189.
- Carlson P, Smith HH, Dearing RD (1972) Parasexual interspecific plant hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69: 2292-2294.

- Carputo D, Frusciante L, Peloquin SJ (2003) The role of 2n gametes and endosperm balance number in the origin and evolution of polyploids in the tuber-bearing Solanums. *Genetics* 163: 287-94.
- Chand PK, Davey MR, J.B. Power JB, Cocking EC (1988) An improved procedure for protoplast fusion using polyethylene glycol. *J. of Plant Phys.* 133: 4480-485.
- Chen C, Bowman KD, Choi YA, Dang PM, Rao MN, Huang S, Soneji JR, McCollum TG, Gmitter FG Jr (2008a) EST-SSR genetic maps for *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*. *Tree Genetics & Genomes* 4: 1-10.
- Chen C, Cancalon P, Haun C, Gmitter FG Jr (2011) Characterization of furanocoumarin profile and inheritance toward selection of low furanocoumarin seedless grapefruit cultivars. *J. J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 36: 358-363.
- Chen C, Grosser JW, Čalović M, Pasquali G, Gmitter J, Gmitter FG Jr (2008b) Verification of mandarin and pummelo somatic hybrids by expressed sequence tag-simple sequence repeat marker analysis. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 133: 794-800.
- Chen C, Lyon MT, O'Malley D, Federici CT, Grosser JW, Chaparro JX, Roose ML, Gmitter FG Jr (2008c) Origin and frequency of 2n gametes in *Citrus sinensis* × *Poncirus trifoliata* and their reciprocal crosses. *Plant Science* 174: 1-8.
- Chen C, Zhou P, Choi Y, Huang S, Gmitter FG Jr (2006) Mining and characterizing microsatellites from citrus ESTs. *Theor. Appl. Genet.* 112: 1248-1257.
- Chen S, Gao F & Zhou J (1991) Studies on the seedless character of Citrus induced by irradiation. *Mutat Breed. News* 37: 8-9.
- Chen ZQ, Wang MQ, Huihua L (1980) The induction of Citrus pollen plants in artificial media. *Acta Genet. Sin.* 7: 189-191.
- Constabel F (1984) Fusion of protoplasts by polyethylene glycol (PEG). In: Vasil IK (Ed.) *Cell culture and somatic cell genetics of plants*. Vol 1., Academic, New York, pp. 414-422.
- Cuenca J, Aleza P, Juárez J, Pina JA, Navarro L (2010) 'Safor' mandarin: a new citrus mid-late triploid hybrid. *HortScience* 45: 977-980.
- Davies FS & Albrigo LG (1994) Citrus. In: Atherton J & Rees A (Eds.) *Crop production sciences in horticulture*. Vol 2., CAB International, Wallingford, UK.
- Deng XX, Deng ZA, Xiao SY, Zhang WC (1992) Pollen derived plantlets from anther culture of Ichang papeda hybrids No. 14 and trifoliata orange. In: *Proceedings of 7th International Citrus Congress*, International Society of Citriculture, Acireale, Italy, pp. 190-192.
- Devasirvatham V, Gaur P, Mallikarjuna N, Tokachichu RN, Trethowan RM, Tan D (2012) Effect of high temperature on the reproductive development of chickpea genotypes under controlled environments. *Functional Plant Biology* 39: 1009-1018.
- Drira N & Benbadis A (1975) Analysis, by *in vitro* anther culture, of the androgenetic potential of two Citrus species (*Citrus medica* L. and *Citrus limon* L. Burm). *Comptes Rendus Hebdomadaires de Séances de l'Academie des Sciences* 281: 1321-1324.
- Dudits D, Fejér O, Hadlaczky G, Koncz C, Lázár G, Horváth G (1980) Intergeneric gene transfer mediated by protoplast fusion. *Mol. Gen. Genet.* 179: 283-288.
- Duncan DB (1955). Multiple ranges and multiple F test. *Biomet.* 11: 1-42.

- Dutt M & Grosser JW (2010) An embryogenic suspension cell culture system for *Agrobacterium* mediated transformation of citrus. *Plant Cell Rep.* 29: 1251-1260.
- Dutt M, Orbovic V, Grosser JW (2009) Cultivar dependent gene transfer into citrus using *Agrobacterium*. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 122: 85-89.
- Earle ED (1995) Mitochondrial DNA in somatic hybrids and cybrids. In: Levings CS & Vasil IK (Eds.) *The molecular biology of plant mitochondria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 557-584.
- Echeverria E (1987) Preparation and characterization of protoplasts from citrus juice vesicles. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 112: 393-396.
- Esen A & Soost RK (1971) Unexpected triploids in citrus: their origin, identification, and possible use. *J. Hered.* 62: 329-333.
- Esen A & Soost RK (1973a) Seed development in Citrus with special reference to $2x \times 4x$ crosses. *Am. J. Bot.* 60: 448-462.
- Esen A & Soost RK (1973b) Precocious development and germination of spontaneous triploid seeds in Citrus. *J. Hered.* 64: 147-154.
- Esen A & Soost RK (1977) Relation of unexpected polyploids to diploid megagametophytes and embryo: endosperm ploidy ratio in Citrus. In: *Proceedings of 1st International Citrus Congress held in 1973, Murtia, Spain, International Society of Citriculture*, pp. 53-63.
- Esen A, Soost RK, Geraci G (1979). Genetic evidence for the origin of diploid megagametophytes in citrus. *J. Hered.* 70: 5-8.
- Evans DA & Bravo JE (1983) Protoplast isolation and culture. In: Evans DA, Sharp WR, Ammirato PV, Yamada Y (Eds.) *Handbook of Plant Cell Culture*. Vol 1., Macmillan Publishing Co., New York, NY, pp. 124-176.
- Evans DA, Bravo JE, Gleba YY (1983) Somatic hybridization: fusion methods, recovery of hybrids, and genetic analysis. *Int. Rev. Cytol. (Suppl)* 16:143-159.
- Fang DQ, Krueger RR, Roose ML (1998) Phylogenetic relationships among selected Citrus germplasm accessions revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 123: 612-617.
- Fatta Del Bosco S, Matranga G, Geraci G (1992) Micro and macro-sporogenesis of two triploid hybrids of Citrus. In: *Proceedings of 7th International Citrus Congress, International Society of Citriculture, Acireale, Italy*, pp. 122-124.
- Fegeros K, Zervas G, Stamouli S, Apostolaki E (1995) Nutritive value of dried citrus pulp and its effect on milk yield and milk composition of lactating ewes. *J. Dairy Sci.* 78: 1116-1121.
- Froelicher Y (1999) Organization of diversity in the *Clausena* Burm.f. genus (fam. *Rutacea*) and method of its exploitation in plant breeding. *Doktorska disertacija*, Université de Paris, Orsay, France.
- Froelicher Y, Bassene JB, Jedidi-Neji E, Morillon R, G Bernardini, G Costantino, Ollitrault P (2007) Induced parthenogenesis in mandarin for haploid production: induction procedures and genetic analysis of plantlets. *Plant Cell Rep.* 26: 937-944.
- Froelicher Y, Luro F, Ollitrault P (2000) Analysis of meiotic behavior of the tetraploid *Clausena excavata* species by molecular marker segregation studies. In: *Proceedings of 9th International Citrus Congress, International Society of Citriculture, Orlando, Florida*, pp. 210.

- Froneman IJ, Breedt HJ, Koekemoer PJ (1996) Producing seedless Citrus cultivars with gamma irradiation. In: Proceeding of 8th International Citrus Congress, International Society of Citriculture, Sun City, South Africa, pp. 159-63.
- Fu CH, Chen CL, Guo WW, Deng XX (2004) GISH, AFLP and PCR-RFLP analysis of an intergeneric somatic hybrid combining 'Goutou' sour orange and *Poncirus trifoliata*. Plant Cell Rep. 23: 391-396.
- Geraci G (1978) Percentage of triploid offspring of cross-pollinated diploid polyembryonic citrus. In: Proceedings of 3rd International Citrus Congress, Sidney, Australia, International Society of Citriculture, pp. 57-58.
- Geraci G, De Pasquale F, Tusa N (1977) Percentages of spontaneous triploids in progenies of diploid lemons and mandarins. In: Proceedings of 2nd International Citrus Congress, Orlando, Florida, International Society of Citriculture, pp. 596-597.
- Geraci G, Esen A, Soost R (1975) Triploid progenies from $2x \times 2x$ crosses of Citrus cultivars. J. Hered. 66: 177-178.
- Germanà MA & Reforgiato RG (1997) Haploid embryos regeneration from anther culture of 'Mapo' tangelo (*Citrus deliciosa* $\times$ *C. paradisi*). Adv. Hort. Sci. 11: 147-152.
- Germanà MA, Crescimanno FG, De Pasquale F, Wang YY (1991) Androgenesis in 5 cultivars of *Citrus limon* L. Burm. Acta Hort. 300: 315-324.
- Germanà MA, Wang YY, Barbagallo MG, Iannolino G, Crescimanno FG (1994) Recovery of haploid and diploid plantlets from anther culture of *Citrus clementina* Hort. ex Tan. and *Citrus reticulata* Blanco. J. Hort. Sci. 69: 473-480.
- Gill MIS, Singh Z, Dhillon BS, Gosal SS (1994) Somatic embryogenesis and plantlet regeneration on calluses derived from seedling explants of 'Kinnow' mandarin (*Citrus nobilis* Lour. $\times$ *C. deliciosa* Tenora). J. Hort. Sci. & Biotech. 69: 231-236.
- Gill MIS, Singh Z, Dhillon BS, Gosal SS (1995) Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in mandarin (*Citrus reticulata* Blanco). Sci. Hort. 63: 167-174.
- Gmitter FG Jr & Hu X (1990) The possible role of Yunnan (China) in the origin of contemporary citrus species (*Rutaceae*). Economic Botany 44: 267-277.
- Gmitter FG Jr, Ling XB, Deng XX (1990) Induction of triploid citrus plants from endosperm calli *in vitro*. Theor. Appl. Genet. 80: 785-790.
- Goldschmidt EE (1997) Effect of climate on fruit development and maturation. In: Short Course & Workshop Proceedings, Florida Citrus Resources, publikovano na Internetu: http://irrec.ifas.ufl.edu/flcitrus/short_course_and_workshop/
- Grierson W (2006) Maturity and grade standards. In Wardowski WF, Miller WM, Hall DJ, Grierson W (Eds.) Fresh citrus fruits, Second Edition, Florida Sci. Source, Inc., Longboat Key, FL, pp. 23-48.
- Grosser & Chandler (1987) Aseptic isolation of leaf protoplasts from *Citrus*, *Poncirus*, *Citrus* $\times$ *Poncirus* hybrids and *Severinia* for use in somatic hybridization experiments. Sci. Hort. 31: 253-257.
- Grosser JW & Chandler JL (2004) Production of twelve new allotetraploid somatic hybrid citrus breeding parents with emphasis on late maturity and cold-hardiness. J. Am. Pom. Soc. 58: 21-28.
- Grosser JW & Gmitter FG Jr (1990) Protoplast fusion and citrus improvement. Plant Breeding Rev. 8: 339-374.

- Grosser JW & Gmitter FG Jr (2005) 2004 SIVB Congress symposium proceedings thinking outside the cell - applications of somatic hybridization and cybridization in crop improvement, with citrus as a model. *In Vitro Cell Dev. Biol. - Plant* 41: 220-225.
- Grosser JW & Gmitter FG Jr (2011) Protoplast fusion in the production of tetraploids and triploids: Applications in scion and rootstock breeding. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 104: 343-357.
- Grosser JW, An HJ, Čalović M, Lee DH, Chen C, Vasconcellos M, Gmitter FG Jr (2010a) Production of new allotetraploid and autotetraploid citrus breeding parents: focus on zipperskin mandarins. *HortScience* 45: 1160-1163.
- Grosser JW, Ananthakrishnan G, Čalović M, Chandler JL, Gmitter FG Jr, Guo WW (2006) Applications of somatic hybridization and cybridization in scion and rootstock improvement with focus on citrus. *Acta Hort.* 738: 73-82.
- Grosser JW, Čalović M, Louzada ES (2010b) Protoplast fusion technology - somatic hybridization and cybridization. In: Davey MR & Anthony P (Eds.) *Plant cell culture - essential methods (Methods and Protocols)*. Agritech Publications, Shrub Oak, NY, pp. 175-98.
- Grosser JW, Chandler JL, Duncan LW (2007) Production of mandarin + pummelo somatic hybrid citrus rootstocks with potential for improved tolerance/resistance to sting nematode. *Scientia Hort.* 113: 33-36.
- Grosser JW, Gmitter FG Jr, Castle WS, Chandler JL (1995) Production and evaluation of citrus somatic hybrid rootstocks: progress report. *Proc. Fla. State Hortic. Soc.* 108: 140-143.
- Grosser JW, Gmitter FG Jr, Chandler JL (1988a) Intergeneric somatic hybrid plants from sexually incompatible woody species: *Citrus sinensis* and *Severinia disticha*. *Theor. Appl. Genet.* 75: 397-401.
- Grosser JW, Gmitter FG Jr, Chandler JL (1988b) Intergeneric somatic hybrid plants of *C. sinensis* cv. 'Hamlin' and *Poncirus trifoliata* cv. 'Flying Dragon'. *Plant Cell Rep.* 7: 5-8.
- Grosser JW, Gmitter FG Jr, Louzada ES, Chandler JL (1992) Production of somatic hybrid and autotetraploid breeding parents for seedless citrus development. *HortScience* 27: 1125-1127.
- Grosser JW, Gmitter FG Jr, Tusa N, Recupero GR, Cucinotta P (1996b) Further evidence of a cybridization requirement for plant regeneration from citrus leaf protoplasts. *Plant Cell Rep.* 15: 672-6.
- Grosser JW, Graham JH, Hoyte A, Rubio HM, Bright DB, Chen CX, Gmitter FG Jr (2007) Continued development of rootstocks tolerant of the phytophthora-diaprepes complex via greenhouse screening. *Proc. Fla. State Hortic. Soc.* 120: 103-109.
- Grosser JW, Graham JH, McCoy CW, Hoyte A, Rubio HM, Bright DB, Chandler JL (2003) Development of "Tetrazyg" rootstocks tolerant of the Diaprepes/Phytophthora complex under greenhouse conditions. *Proc. Fla. State Hortic. Soc.* 116: 262-267.
- Grosser JW, Jiang J, Mourao FAA, Louzada ES, Baergen K, Chandler JL, Gmitter FG Jr (1998) Somatic hybridization, an integral component of citrus cultivar improvement: I. Scion improvement. *HortScience* 33: 1057-1059.
- Grosser JW, Mourao FAA, Gmitter FG Jr, Louzada ES, Jiang J, Baergen K, Quiros A, Cabasson C, Schell JL, Chandler JL (1996a) Allotetraploid hybrids between

- Citrus and seven related genera produced by somatic hybridization. Theor. Appl. Genet. 92: 577-582.
- Grosser JW, Ollitrault P, Olivares-Fuster O (2000) Somatic hybridization in citrus: An effective tool to facilitate variety improvement. In Vitro Cell Dev. Biol. - Plant 36: 434-449
- Guo WW, Cai XD, Grosser JW (2004a) Somatic cell cybrids and hybrids in plant improvement. In: Daniell H, Chase CD (Eds.) Molecular biology and biotechnology of plant organelles, Vol 24., Kluwer, Dordrecht, pp. 635-659.
- Guo WW, Cheng YJ, Chen CL, Deng XX (2006) Molecular analysis revealed autotetraploid, diploid and tetraploid cybrid plants regenerated from an interspecific somatic fusion in Citrus. Sci. Hort. 108: 162-166.
- Guo WW, Prasad D, Serrano P, Gmitter FG Jr, Grosser JW (2004b) Citrus somatic hybridization with potential for direct tetraploid scion cultivar development. J. Hortic. Sci. Biotech. 79: 400-405.
- Hahn-Hägerdal B, Hosono K, Zachrisson A, Bornman CH (1986) Polyethylene glycol and electric field treatment of plant protoplasts: Characterization of some membrane properties. Physiol. Plant. 67: 359-364.
- Hearn CJ (1984) Development of seedless orange and grapefruit cultivars through seed irradiation. J. Am. Soc. Hort. Sci. 109: 270-273.
- Herrero R, Asins MJ, Carbonell EA, Navarro L (1996) Genetic diversity in the orange subfamily *Aurantoideae*. I. Intraspecific and intragenus genetic variability. Theor. Appl. Genet. 92: 599-609.
- Hidaka T & Kajiura I (1988) Plantlet differentiation from callus protoplasts induced from Citrus embryo. Sci. Hort. 34: 85-92.
- Hidaka T & Kajiura I (1989) A simple method for acclimatization of *in vitro* plantlets of citrus. Bull. Fruit Tree Res. Station B.16: 19-28.
- Hidaka T, Yamada Y, Shichijo T (1979) In vitro differentiation of haploid plants by anther culture in *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. Japan. J. Breed. 29: 248-254.
- Hidaka T, Yamada Y, Shichijo T (1981) Plantlet formation from anthers of *Citrus aurantium* L. In: Proceedings of 4th International Citrus Congress, International Society of Citriculture, Tokyo, Japan, pp. 153-157.
- Hirai M, Kozaki I, Kajiura I (1986) Isozyme analysis and phylogenetic relationship of citrus. Japan J. Bree. 36: 377-389.
- Hodgson RW (1961) Classification and nomenclature of Citrus fruit. In: Proceedings of 2nd Conf. Int. Org. of Citrus Virologists, Univ. of Florida Press, Gainesville, FL, pp. 1-7.
- Hodgson RW (1967) Horticultural varieties of Citrus (Chapter 4). In: Reuther W, Webber HJ, Batchelor LD (Eds.) The Citrus industry - History, world distribution, botany, and varieties. Vol 1., University of California Press, Berkeley, CA, pp. 431-586.
- Hutchison DJ & Barrett HC (1981). Tetraploid frequency in nucellar seedlings from single trees of Carrizo and Troyer citrus hybrids . In: Proceedings of 4th International Citrus Congress, International Society of Citriculture, Tokyo, Japan, pp. 1: 27-29.
- Hutchison DJ (1985) Rootstock development, screening and selection for disease tolerance and horticultural characteristics. Fruit Varieties J. 39: 21-25.
- Internet stranica FAO - Food and Agricultural Organization of the United Nations <http://faostat.fao.org>

- Internet stranica FAWN - Florida Automated Weather Network
<http://fawn.ifas.ufl.edu/>
- Internet stranica CCPP - Citrus Clonal Protection Program
<http://www.ccpp.ucr.edu/variety/462.html>
- Internet stranica University of California Riverside
<http://www.citrusvariety.ucr.edu/>
- Internet stranica University of Florida
http://edis.ifas.ufl.edu/topic_citrus_varieties_and_rootstocks
- Internet stranica Florida Foundation Seed Producers, Inc
<http://www.ffsp.net/varieties/citrus/sugar-belle-lb8-9/>
- Iwamasa M & Oba Y (1980) Seedlessness due to self-incompatibility in 'Egami-Buntan', a Japanese pummelo cultivar. Bulletin of the Faculty of Agriculture, Saga University, Saga, Japan, 49: 39-45.
- Jackson LK & Futch SH (1997) Pollination and fruit set -pollination requirement. In: Short Course & Workshop Proceedings, Florida CitrusResources, publikovano na Internetu: http://irrec.ifas.ufl.edu/flcitrus/short_course_and_workshop/
- Jackson LK & Sharman WB (1975) Chromosome counts in 'Tahiti' lime. Proc. Florida State Hort. Soc. 88: 458-9.
- Jiamanbai G & Shapuxi G (2013) Effects of different light conditions on pollen viability and stigma receptivity of *Erythronium sibiricum*. J. of Southern Agricult. 44: 1444-1447.
- Jiménez VM, Guevara E, Herrera J, Bangerth F (2001) Endogenous hormone levels in habituated nucellar Citrus callus during the initial stages of regeneration. Plant Cell Rep. 20: 92-100.
- Johnson AAT & Veilleux RE (2001) Somatic hybridization and applications in plant breeding. Plant Breeding Rev. 20: 167-225.
- Johnson SA, den Nijs TPN, Peloquin SJ, Hanneman RE Jr (1980) The significance of genic balance to endosperm development in interspecific crosses. Theor. Appl. Genet. 57: 5-6.
- Kahn T & Chao CT (2004) Mysteries of mandarins: sex, seedlessness, and new varieties. California Citrus Mutual Journal 2004: 26-31.
- Kao K N & Michayluk M R (1974) A method for high-frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. Planta 115: 355-67.
- Kao KN & Michayluk MR (1975) Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. Planta 126: 105-110.
- Katz & Weaver (2003) Encyclopedia of food and culture. Schribner, New York, NY.
- Khan MM, Khan IA, Mughal AH (1992) Growth and morphological comparison of diploid and tetraploid strains of 'Kinnow' mandarin. In: Proceedings of 7th International Citrus Congress, International Society of Citriculture, Acireale, Italy, pp. 93-95.
- Klebe RJ & Mancuso MG (1981) Chemicals which promote cell hybridization. Somat. Cell Genet. 7: 473-488.
- Kobayashi S (1987) Uniformity of plants regenerated from orange (*C. sinensis* Osb.) protoplasts. Theor. Appl. Genet. 74: 10-14.

- Kobayashi S, Ohgawara T, Ohgawara E, Oiyama I, Ishii S (1988) A somatic hybrid plant obtained by protoplast fusion between navel orange (*C. sinensis*) and 'Satsuma' mandarin (*C. unshiu*). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 14: 63-69.
- Kobayashi S, Ohgawara T, Saito W, Nakumura Y, Omura M (1997) Production of triploid somatic hybrids in citrus. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 66: 453-458.
- Kobayashi S, Ohgawara T, Saito W, Nakumura Y, Shimizu J (1995) Fruit characteristics and pollen fertility of citrus somatic hybrids. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 64: 283-289.
- Kochba J & Button J (1974) The stimulation of embryogenesis and embryoid development in habituated ovular callus from the 'Shamouti' orange (*C. sinensis*) as affected by tissue age and sucrose concentration. *Z. Pflanzenphysiol.* 73: 415-421.
- Kochba J & Spiegel-Roy P (1977) The effect of auxins, cytokinins, and inhibitors on embryogenesis in habituated ovular callus of the 'Shamouti' orange (*C. sinensis*). *Z. Pflanzenphysiol.* 81: 283-288.
- Kochba J, Spiegel-Roy P, Neumann H, Saad S (1982) Effect of carbohydrates on somatic embryogenesis in subculture nucellar callus of Citrus cultivars. *Z. Pflanzenphysiol.* 105: 359-368.
- Kochba J, Spiegel-Roy P, Saad S, Neuman H (1977) Effect of galactose and galactose containing sugars on embryogenesis in citrus callus. *Acta Hort.* 78: 185-186.
- Kochba J, Spiegel-Roy P, Safran H (1972) Adventive plants from ovules and nucelli in Citrus. *Planta* 106: 237-245.
- Kohmoto K, Akimitsu K, Otani H (1991) Correlation of resistance and susceptibility of citrus to *Alternaria alternata* with sensitivity to hosts specific toxins. *Phytopathology* 81: 719-722.
- Krug CA (1943) Chromosome numbers in the subfamily *Aurantioideae* with special reference to the genus *Citrus*. *Bot. Gazette* 104: 602-611.
- Kunitake H, Kagami H, Mii M (1991) Somatic embryogenesis and plant regeneration from protoplasts of 'Satsuma' mandarin (*C. unshiu* Marc.). *Sci. Hort.* 47: 27-33.
- Landgren M & Glimelius K (1994) A high frequency of intergenomic mitochondrial recombination and an overall biased segregation of *B. campestris* or recombined *B. campestris* mitochondria were found in somatic hybrids within the *Brassicaceae*. *Theor. Appl. Genet.* 87: 854-862.
- Lee Y, Kim ES, Choi Y, Hwang I, Staiger CJ, Chung YY, Lee Y (2008) The arabidopsis phosphatidylinositol 3-kinase is important for pollen development. *Plant Phys.* 147: 1886-1897.
- Lewandowski M (2000) Formulating frozen concentrate. In: Florida grower - The history of Florida Citrus, mid-august edition, pp. 44-48.
- Li JK & Huang SQ (2009) Flower thermoregulation facilitates fertilization in Asian sacred lotus. *Ann. Bot.* 103: 1159-1163.
- Li WQ, Kuriyama S, Li Q, Nagai M, Hozawa A, Nishino Y, Tsuji I. (2010) Citrus consumption and cancer incidence: the Ohsaki cohort study. *Int. J. Cancer.* 127: 1913-22.
- Litz RE & Gray DJ (1992) Organogenesis and somatic embryogenesis. In: Hammerschlag FA and Litz RE (Eds.) *Biotechnology of perennial fruit crops*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 3-34.
- Liu J, Xu X, Deng X (2003) Protoplast isolation, culture and application to genetic improvement of woody plants. *Int. J. Food Agric. Environ.* 1: 112-120.

- Liu J, Xu X, Deng X (2005) Intergeneric somatic hybridization and its application to crop improvement. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 82: 19-44.
- Longley AE (1925) Polycary, polyspory and polyploidy in Citrus and Citrus relatives. *J. Wash. Acad. Sci.* 15: 347-351.
- Lora J, Herrero M, Hormaza JI (2012) Pollen performance, cell number, and physiological state in the early-divergent angiosperm *Annona cherimola* Mill. (*Annonaceae*) are related to environmental conditions during the final stages of pollen development. *Sexual Plant Reprod.* 25: 157-167.
- Luro F, Laigret F, Bove JM, Ollitrault P (1995) DNA amplified fingerprinting, a useful tool for determination of genetic origin and diversity analysis in Citrus. *HortScience* 30: 1063-1067.
- Luro F, Maddy F, Jacquemond C, Froelicher Y, Morillon R, Rist D, Ollitrault P (2004) Identification and evaluation of diplogyny in clementine (*Citrus clementina*) for use in breeding. *Acta Hort.* 663: 841-847.
- Luro F, Maddy F, Ollitrault P, Rist D (2000) Identification of 2n gamete parental origin and mode of nuclear restitution of spontaneous triploid Citrus hybrids. In: *Proceedings of 9th International Citrus Congress, International Society of Citriculture, Orlando, Florida*, pp. 168-169.
- Maheshwari P & Rangaswamy N (1958) Regeneration of somatic embryos from nucellus of Citrus ovules. *Ind. J. Hort.* 15: 275-281.
- Menczell L, Nagy F, Kiss Z, Maliga P (1981) Streptomycin resistant and sensitivesomatic hybrids of *Nicotiana tabacum* + *Nicotiana knightiana*: Correlation of resistance to *N. tabacum* plastids. *Theor. Appl. Genet.* 59: 191-195.
- Mendes-da-Gloria FJ, Mourao FAA, Camargo LEA, Mendes BMJ (2000a) 'Caipira' sweet orange + 'Rangpur' lime: a somatic hybrid with potential for use as rootstock in the Brazilian citrus industry. *Gen. Molec. Biol.* 23: 661-665.
- Mendes-da-Gloria FJ, Mourao FAA, Mendes BMJ (2000b) Plant regeneration from protoplast of Brazilian citrus cultivars. *Pesq. Agropec. Bras.*, Vol 35: 727-732.
- Mourao FAA, Gmitter Jr FG, Grosser JW (1996) New tetraploid breeding parents for triploid seedless citrus cultivar development. *Fruit Varieties J.* 50: 76-80.
- Murashige T & Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15(3): 473-497.
- Murashige T & Tucker DPH (1969) Growth factors requirements of citrus tissue culture. In: *Chapman HD (Ed.) Proc. 1st Int. Citrus Symposium, University of California, Riverside, CA*, pp. 1151-1161.
- Navarro L, Juárez J, Aleza P, Pina JA, Olivares-Fuster O, Cuenca J, Julve JM (2005) Programa de obtención de híbridos triploides de mandarino en España. *Phytoma* 170: 36-41.
- Navarro L, Olivares-Fuster O, Juarez J, Aleza P, Ballester-Olmos JF, Cervera M, Fagoaga C, Duran-Vila N and Peña L (2004). Applications of biotechnology to citrus improvement in Spain. *Acta Hort.* 632: 221-234.
- Nicolosi E (2007) Origin and taxonomy. In: *Khan IA (Ed.) Citrus genetics, breeding, and biotechnology. CAB International, Wallingford, UK*, pp. 19-44.
- Nicolosi E, Deng ZN, Gentile A, Lamalfa S, Continella G, Tribulato E (2000) Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* 100: 1155-1166.

- Niedz RP, Hyndman SE, Wynn ET, Bausher MG (2002) Normalizing sweet orange (*C. sinensis* L. Osbeck) somatic embryogenesis with semi-permeable membranes. In *Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 38: 552-557.
- Nito N & Iwamasa M (1990) In vitro plantlet formation from juice vesicle callus of 'Satsuma' (*C. unshiu* Mare.). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 20: 137-140.
- Offord CA (2008) Effects of temperature on pollen viability and flower opening in waratah (*Telopea speciosissima* R.Br.). *Acta Hort.* 805: 99-106.
- Ohgawara T & Kobayashi S (1985) Somatic hybrid plants obtained by protoplast fusion between *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*. *Theor. Appl. Genet.* 71: 1-4.
- Ohgawara T, Kobayashi S, Ishii S, Yoshinaga, Oiyama I (1989) Somatic hybridization in Citrus: navel orange (*C. sinensis* Osb.) and grapefruit (*C. paradisi* Macf.). *Theor. Appl. Genet.* 78: 609-612.
- Oiyama I & Kobayashi S (1993) Haploid obtained from diploid × triploid crosses of Citrus. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 62: 89-93.
- Oiyama I, Okudai N, Takahara T (1980) Studies on polyploid breeding in Citrus. (3) Triploid progenies from small seeds of diploid sweet orange cultivars. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 3: 52-53.
- Ollitrault P & Jacquemond C (1994) Facultative apomixis, spontaneous polyploidization and inbreeding in *Citrus volkameriana* seedlings. *Fruits* 49: 398-400.
- Ollitrault P & Michaux-Ferriere N (1992) Application of flow cytometry for citrus genetic and breeding. In: *Proceeding of 7th International Citrus Congress, International Society of Citriculture, Acireale, Italy*, pp. 193-198.
- Ollitrault P, Allent V, Luro F (1996) Production of haploid plants and embryogenic calli of clementine (*Citrus reticulata* Blanco) after *in situ* parthenogenesis induced by irradiated pollen. In: *Proceeding of 8th International Citrus Congress, International Society of Citriculture, Sun City, South Africa*, pp. 913-917.
- Ollitrault P, Dambier D, Luro F, Froelicher Y (2008) Ploidy manipulation for breeding seedless triploid citrus. *Plant Breeding Rev.* 20: 323-354.
- Ollitrault P, Dambier D, Vanel F, Froelicher Y (2000) Creation of triploid Citrus hybrids by electrofusion of haploid and diploid protoplasts. *Acta Hort.* 535: 191-97.
- Ollitrault P, Guo W, Grosser JW (2007) Somatic hybridization. In: Khan IA (Ed) *Citrus genetics, breeding and biotechnology*. CABI Publishing, Wallingford, pp. 235-260.
- Orczyk W, Przetakiewicz J, Nadolska-Orczyk A (2003) Somatic hybrids of *Solanum tuberosum*: application to genetics and breeding. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 73: 245-256.
- Otto SP & Whitton J (2000) Polyploid incidence and evolution. *Annu. Rev. Genet.* 34: 401-437.
- Poulton JL, Koide RT, Stephenson AG (2001) Effects of mycorrhizal infection and soil phosphorus availability on in vitro and in vivo pollen performance in *Lycopersicon esculentum* (*Solanaceae*) *Am. J. Bot.* 88: 1786-1793.
- Prakash J & Foxe MJ (1984) Use of cellulase Onozuka RS and Pectolyase Y-23 in isolating leaf mesophyll protoplasts from two recalcitrant potato cultivars. *Irish J. Agricult. Res.* 23: 99-103.
- Rafter JJ (2002) Scientific basis of biomarkers and benefits of functional foods for reduction of disease risk: Cancer. *British J. Nutrition* 88: 219-224.

- Rangan TS, Murashige T, Bittvev WP (1968) *In vitro* initiation of nucellar embryos in monoembryonic citrus. HortScience 3: 226-227.
- Ricci AP, Filho FM, Mendes BMJ, Piedade SM (2002) Somatic embryogenesis in *Citrus sinensis*, *C. reticulata* and *C. nobilis* × *C. deliciosa*. Scientia Agricola 59: 41-46.
- Roose ML (2007) Mapping and marker-assisted selection. In: Khan IA (Ed.) Citrus genetics, breeding and biotechnology. CABI Publishing, Wallingford, pp. 275–285.
- Ruane AG & Donohue K (2007) Environmental effects on pollen-pistil compatibility between *Phlox cuspidata* and *P. drummondii* (*Polemoniaceae*): implications for hybridization dynamics. Am. J. Bot. 94: 219-227.
- Sabharwal PS (1962) *In vitro* culture of nucelli and embryos of *C. aurantifolia* Swingle. Plant Embryology, a symposium held at the University of Delhi in 1960, pp. 239-43.
- Saito W, Ohgawara T, Shimizu J, Ishii S (1991) Acid citrus somatic hybrids between sudachi (*Citrus sudachi* Hortex Shirai) and lime (*C. aurantifolia* Swing) produced by electrofusion. Plant Sci. 77: 125-130.
- Saito W, Ohgawara T, Shimizu J, Ishii S, Kobayashi S (1993) Citrus cybrid regeneration following cell fusion between nucellar cells and mesophyll cells. Plant Sci. 88: 195-201.
- Saunt J (1990) Citrus varieties of the world. Sinclair International Ltd., Norwich, England.
- Scarano MT, Abbate L, Ferrante S, Lucretti S, Tusa N (2002) ISSR-PCR technique: a useful method for characterizing new allotetraploid somatic hybrids of mandarin. Plant Cell Rep. 20: 1162-1166.
- Schutte GC (1993) Breeding of citrus cultivars resistant to *Alternaria alternata*: A review. In: Rabe E (Ed.). In: Proceedings of IV World Conf. Intl. Soc. Citrus Nurserymen, Johannesburg, South Africa. pp.197-202.
- Skaria M (2000) A microbudding technique for biological indexing and ultra high density planting of citrus. In: Proceedings of 14th Conf. Int. Org. of Citrus Virologists, Riverside, CA, pp. 411-413.
- Smith SE (1989) Biparental inheritance of organelles and its implications in crop improvement. Plant Breed. Rev. 6: 361-393.
- Soost RK & Cameron JW (1980) 'Oroblanco', a triploid pummelo-grapefruit hybrid. HortScience 15: 667-669.
- Soost RK & Cameron JW (1985) 'Melogold', a triploid pummelo-grapefruit hybrid. HortScience 20: 1134-35.
- Soost RK & Roose ML (1996) Citrus. In: Janick J & Moore JN (Eds.) Fruit breeding - Tree and tropical fruits, Vol 1., John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, pp. 257-323.
- Soost RK (1987) Breeding citrus-genetics and nucellar embryony. In: Abbott AJ, Atkin RK (Eds.) Improving vegetatively propagated crops. Academic Press, London, England, pp. 83–110.
- Spiegel-Roy P, Vardi A & Elhanati A (1985) Seedless induced mutant in lemon (*Citrus limon*). Mutat. Breed. Newsl. 26: 1-2.
- Starrantino A & Caponnetto P (1990) Effect of cytokinins in embryogenic callus formation from undeveloped ovules of orange. Acta Hort. 280: 191-194.

- Starrantino A (1992) Use of triploids for production of seedless cultivars in Citrus improvement programs. In: Proceedings of 7th International Citrus Congress, International Society of Citriculture, Acireale, Italy, pp. 117-121.
- Starantino A (1999) 'Tacle' nuovo ibrido triploide di clementine × 'Tarocco'. Frutticoltura 1: 45-47.
- Stephenson AG, Lau TC, Quesada M, Winsor JA (1992) Factors that affect pollen performance. In: Wyatt R (Ed.) Ecology and evolution of plant reproduction: A new approach. Chapman and Hall, New York, NY, pp. 119-136.
- Swamy NSR (1961) Experimental studies on female reproductive structures of *Citrus microcarpa* Bunge. Phytomorphology (Delhi) 11: 109-27.
- Swingle WT (1967) The botany of citrus and its wild relatives. In: Reuther W, Webber HJ, Batchelor LD (Eds.) The Citrus industry - History, world distribution, botany, and varieties. Vol 1., University of California Press, Berkeley, CA, pp. 190-430.
- Tanaka T (1954) Species problem in Citrus (Revisio aurantiacearum IX). Japan Society for Promotion of Sci., Ueno, Tokyo.
- Tanaka T (1977) Fundamental discussion of Citrus classification. Stud. Citrol 14: 1-6.
- Tian Q, Miller EG, Ahmad H, Tang L, Patil BS (2001) Differential inhibition of human cancer cell proliferation by citrus limonoids. Nutrition and Cancer 40: 180-184.
- Tomaz ML, Mendes BMJ, Mourao FAA, Demetrio CGB, Jansakul N, Rodriguez APM (2001) Somatic embryogenesis in *Citrus* spp.: carbohydrate stimulation and histodifferentiation. In Vitro Cell Dev. Biol. Plant 37: 446-452.
- Toolapong P, Komatsu H, Iwamasa M (1996) Triploids and haploid progenies derived from small seeds of 'Banpeiyu' pummelo, crossed with 'Ruby Red' grapefruit. J. Jpn. Soc. Hortic. Sci. 65: 255-260.
- Tusa N, Grosser JW, Gmitter FG Jr (1990) Plant regeneration of 'Valencia' sweet orange, 'Femminello' lemon, and the interspecific somatic hybrid following protoplast fusion. Hort. Sci. 115: 1043-1046.
- Tusa N, Grosser JW, Gmitter FG Jr, Louzada ES (1992) Production of tetraploid somatic hybrid breeding parents for use in lemon cultivar improvement. Hort. Sci. 27: 445-447.
- Uzun A & Yesiloglu T (2012) Genetic diversity in Citrus. In: Çalışkan M (Ed.) Genetic diversity in plants. Publikovano na Internetu: <http://www.intechopen.com/>, pp. 213-230.
- Van Wert SL & Saunders JA (1992) Electrofusion and electroporation of plants. Plant Physiol. 99: 365-367.
- Vardi A & Galun E (1988) Recent advances in protoplast culture of horticultural crops: Citrus. Sci. Hort. 37: 217-230.
- Vardi A & Galun E (1989) Isolation and culture of citrus protoplasts. In: Bajaj YPS (Ed.) Biotechnology in agriculture and forestry - Plant protoplasts and engineering. Vol 8., Springer, Berlin, Germany, pp. 147-159.
- Vardi A (1977) Isolation of protoplasts in Citrus. In: Proceedings of 2nd International Citrus Congress, Orlando, Florida, International Society of Citriculture, pp. 575-578.
- Vardi A, Breiman A, Galun E (1987) Citrus cybrids: Production by donor-recipient protoplast-fusion and verification by mitochondrial-DNA restriction profiles. Theor. Appl. Genet. 75: 51-58.

- Vardi A, Spiegel-Roy P, Galun E (1975) Citrus cell culture: isolation of protoplasts, plating densities, effect of mutagens, and regeneration of embryos. *Plant Sci. Letters (Amsterdam)* 4: 231-236.
- Vardi A, Spiegel-Roy P, Galun E (1982) Plant regeneration from Citrus protoplasts: variability in methodological requirements among cultivars and species. *Theor. Appl. Genet.* 62: 171-176.
- Viloria Z & Grosser JW (2005) Acid citrus fruit improvement via interploid hybridization using allotetraploid somatic hybrid and autotetraploid breeding parents. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 130: 392-402.
- Viloria Z (2003) Generation of sexual and somatic hybrids in acid citrus fruits. Doktorska disertacija, University of Florida, Gainesville, FL, USA.
- Viloria Z, Droulliard DL, Graham JH, Grosser JW (2004) A stomatal inoculation method for screening triploid hybrids of 'Lakeland' limequat for resistance to Asiatic Citrus Canker (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*). *Plant Disease* 88: 1056-1060.
- Viloria Z, Grosser JW, Bracho B (2005) Immature embryo rescue, culture and seedling development of acid citrus fruit derived from interploid hybridization. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 82: 159-167.
- Weber HJ (1967) History and development of the citrus industry. In: Reuther W, Webber HJ, Batchelor LD (Eds.) *The Citrus industry - History, world distribution, botany, and varieties*. Vol 1., University of California Press, Berkeley, CA, pp. 1-39.
- Wu JH, Ferguson AR, Mooney PA (2005) Allotetraploid hybrids produced by protoplast fusion for seedless triploid Citrus breeding. *Euphytica* 141: 229-235.
- Xu X, Lu J, Grosser JW, Cousins P (2007) Isolation and culture of grape protoplasts from somatic embryogenic suspension cultures and leaves of *Vitis vinifera* and *Vitis rotundifolia*. *Acta Hort.* 738: 787-790.
- Yamamoto M & Kobayashi S (1995) A cybrid plant produced by electrofusion between *C. unshiu* (Satsuma mandarin) and *C. sinensis* (sweet orange). *Plant Tissue Cult. Lett.* 12: 131-137.
- Yamamoto M, Okudai N, Matsumoto R (1992) Segregation for aborted anthers in hybrid seedlings using *Citrus nobilis* × *C. deliciosa* cv. 'Encore' as the seed parent. *J. Jpn. Hort. Sci.* 60: 785-789.

BIOGRAFIJA AUTORA

Milica Čalović je rođena 11. maja 1968. godine u Beogradu, Srbija gde je završila osnovnu i srednju školu. Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Beogradu, Srbija, studijska grupa Opšta Biologija, upisala je 1986. godine, a završila 1992. godine. Posle završenog fakulteta radi kao volonter na Institutu za biološka istraživanja "Siniša Stanković" Univerziteta u Beogradu gde dobija stalno zaposlenje 1995. godine kao istraživač saradnik. Na toj poziciji ostaje do 1998. godine. Septembra 1998. godine odlazi u Sjedinjene Američke Države u istraživačko-obrazovni centar sa stogodišnjom tradicijom istraživanja posvećenih citrusima (Citrus Research and Education Center). Ovaj centar pripada University of Florida, Institute for Food and Agricultural Sciences. Od 2000 godine pa do danas radi u tom centru u laboratoriji za čelijsku genetiku kao istraživač saradnik.

Magistar bioloških nauka je postala 1997. godine na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, Srbija, studijska grupa Biljna Fiziologija. Od januara 2011. godine učesnik je projekta koje finansira Ministarstvo za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije (TR31019).

Do sada je bila angažovana na dva nacionalna i tri međunarodnih projekata. Milica Čalović je do sada bila koautor jednog poglavlja u međunarodnim monografijama, 11 radova međunarodnog značaja, 3 rada nacionalnog značaja i 8 kongresnih saopštenja.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписана _____ Мр Милица Ћаловић _____

број индекса _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

«Оплећењивање мандарина (*Citrus reticulata* Blanco) методама соматске и сексуалне хибридизације у циљу добијања нових безсемених култивара»

- 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.

Потпис докторанда

У Београду, 17.августа 2014.године



Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора _____ Мр Милица Ћаловић _____

Број индекса _____

Студијски програм _____

Наслов рада «Оплемењивање мандарина (*Citrus reticulata* Blanco) методама
соматске и сексуалне хибридизације у циљу добијања нових безсемених
култивара»

Ментор _____ Др Слађана Јевремовић, Проф. др Златко Гиба _____

Потписани/а _____ Мр Милица Ћаловић _____

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, 17. август 2014. године

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

«Опlemeњивање мандарина (*Citrus reticulata* Blanco) методама соматске и сексуалне хибридизације у циљу добијања нових безсеменних култивара»

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).

Потпис докторанда

У Београду, __17. августа 2014. године__



1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.