

UNIVERZITET U BEOGRADU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET

mr Milena R. Đorđević

**CITOEMBRIOLOŠKI ASPEKTI OPLOĐENJA
SORTE ŠLJIVE „POZNA PLAVA“
(*Prunus domestica* L.)**

doktorska disertacija

Beograd, 2015.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF AGRICULTURE

Milena R. Đorđević, MSc

**CYTOEMBRYOLOGICAL ASPECTS OF
FERTILISATION OF PLUM CULTIVAR
„POZNA PLAVA“ (*Prunus domestica* L.)**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015

Komisija za odbranu doktorske disertacije

Mentor:

dr Dragan Nikolić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

Članovi komisije:

dr Dragan Milatović, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

dr Radosav Cerović, naučni savetnik
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet, Inovacioni centar

dr Evica Mratinić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

dr Vera Rakonjac, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

Datum odbrane: _____

Koristim priliku da se zahvalim

dr Radosavu Ceroviću, mom mentoru na Institutu za voćarstvo i vinogradarstvo i idejnom tvorcu ove doktorske disertacije, na velikoj podršci, odličnim sugestijama i savetima,

Mentoru prof. dr Draganu Nikoliću i prof. dr Draganu Milatoviću na korisnim i dobronamernim savetima prilikom izrade disertacije,

Kolegama iz Instituta za voćarstvo u Čačku na nesebičnoj pomoći, savetima i podršci tokom različitih faza realizacije ovih istraživanja.

Posvećeno...

*...vama, koji ste mi dali život i pokazali put.
...tebi, čija ljubav mi daje snagu, a zagrljaj sigurnost.
...vama, koji ste verovali u mene kada ja nisam.
...vama, koji sa neba navijate za mene.*

CITOEMBRIOLOŠKI ASPEKTI OPLOĐENJA SORTE ŠLJIVE „POZNA PLAVA“ (*Prunus domestica* L.)

Rezime

Kod sorte šljive Pozna plava, u trogodišnjem periodu, ispitivano je više citoembrioloških aspekata koji su vezani za dinamiku odvijanja procesa oplođenja, tokom prvih deset dana od momenta punog cvetanja. Fluorohromnim bojenjem analizirana je vitalnost semenih zametaka kao i kvantitativni parametri rasta polenovih cevčica, u tri varijante oprašivanja: slobodno oprašivanje, stranooprašivanje i samooprašivanje. U varijanti stranooprašivanja korišćen je polen sorti šljive Hanita, Čačanska najbolja i Presenta. Klijavost polena korišćenih oprašivača prethodno je utvrđena *in vitro* na agaro-saharoznoj podlozi, dok su morfološke osobine polena analizirane pomoću skenirajućeg elektronskog mikroskopa. U ispitivanim varijantama oprašivanja analizirano je inicijalno i finalno zametanje plodova. U dvogodišnjem periodu ispitivano je funkcionalno stanje embrionove kesice u prvih deset dana od momenta punog cvetanja u dve varijante: slobodno oprašivanje i bez oprašivanja (kontrola). U trogodišnjem periodu, u poljskim uslovima, ispitivan je uticaj temperature, na interakciju muškog gametofita i ženskog sporofita.

U analiziranim morfološkim karakteristikama polena sorta šljive Pozna plava se razlikovala od ostalih sorti, gde je izuzev širine polenovog zrna, u svim ostalim analiziranim parametrima imala najveće vrednosti. Analiza kvantitativnih parametara rasta polenovih cevčica u stubiću tučka pokazala je najbolje vrednosti u varijanti stranooprašivanja, dok se u sve tri godine ispitivanja kao najslabija pokazala varijanta slobodnog oprašivanja. Prisustvo inkompatibilnih polenovih cevčica u gornjoj trećini stubića kao i pojava njihovog specifičnog rasta u plodniku u svim analiziranim varijantama oprašivanja bila je izražena u manjoj meri, tako da nije imala većeg uticaja na broj oplođenih semenih zametaka, a samim tim i na broj inicijalno i finalno zametnutih plodova.

Analiza semenih zametaka u varijanti slobodnog oprašivanja pokazala je da oni u vreme punog cvetanja u najvećem broju sadrže embrionove kesice koje se nalaze u ranoj osmojedarnoj fazi. Takođe, i u varijanti bez oprašivanja je utvrđen ovaj stadijum u vreme punog cvetanja, koji je brzo prelazio u petojedarni stadijum. O postojanju

funkcionalnih stadijuma embrionovih kesica primarnih semenih zametaka u varijanti bez oprašivanja može se govoriti do osmog dana od početka punog cvetanja.

Ispitivanja dinamike rasta polenovih cevčica su pokazala za koje vreme polenove cevčice stižu do embrionove kesice. Na osnovu utvrđenih funkcionalnih stadijuma za ovu sortu se može reći da ima veoma kratak efektivni polinacioni period, od svega jedan do maksimalno dva dana. Korišćene dve metode ispitivanja vitalnosti semenih zametaka pokazala su nepodudaranje u slučaju primarne, dok su se slagale kod sekundarne ovule. U varijanti bez oprašivanja degenerativne promene u primarnom semenom zametku su se u prvom redu odnosile na jajni aparat, dok su u slučaju sekundarnog semenog zametka one prvo primećene u ćelijama nucelusa.

Tokom trogodišnjeg perioda bio je evidentan uticaj temperature na tok progamne faze oplodjenja. U prvoj godini su bile najoptimalnije temperature za rast polenovih cevčica, u prvih deset dana od početka punog cvetanja, dok su u drugoj i trećoj godini utvrđena veća temperaturna kolebanja, koja su se direktno odrazila na ispitivane parametre.

Dobijeni rezultati su jasno ukazali na neophodnost pravilnog izbora adekvatnog oprašivača za analiziranu sortu šljive. Pored toga što ima kasno cvetanje, pokazalo se da ona u vreme punog cvetanja sadrži embrionovu kesicu koja je u ranoj osmojedarnoj fazi. Na osnovu ispitivanih reproduktivnih karakteristika, analizirane sorte korišćene u varijanti stranooprašivanja, se mogu preporučiti kao dobri oprašivači za sortu šljive Pozna plava.

Ključne reči: šljiva, morfologija polena, oprašivanje, rast polenovih cevčica, embrionova kesica, zametanje plodova

Naučna oblast: Biotehničke nauke

Uža naučna oblast: Oplemenjivanje voćaka i vinove loze

UDK: 631.1.11:581.162.4;581.145.1/2

CYTOEMBRYOLOGICAL ASPECTS OF FERTILISATION OF PLUM CULTIVAR „POZNA PLAVA“ (*Prunus domestica* L.)

Summary

Over a three-year period, a study was conducted on the Pozna plava cultivar, focusing on a number of cyto-embryological aspects related to the dynamics of fertilisation process during the ten-day phase that follows the moment of full bloom. Fluorochrome dyeing was used to analyse the vitality of ovules and the quantitative growth parameters of the pollen tubes, thorough three pollination variants: open pollination, cross pollination, and self pollination. In the cross-pollination variant, pollen of the Hanita, Čačanska najbolja and Presenta cultivars was used. An agarose-sucrose base was used for *in vitro* pre-determination of pollen germination of the used pollenisers, whereas the pollen morphological traits were analysed using the scanning electronic microscope. Initial and final fruit set was analysed in the examined pollination variants. In the two years of the study, functional condition of the embryo sac was examined within the first ten days following the moment of full bloom, comprising two variants: open pollination and no-pollination (as the control group). The impact made by temperature on the interaction between the male gametophyte and female sporophyte was examined during the three-year period of study.

The analysis of the morphological characteristics of the pollen, the Pozna plava cultivar recorded different results compared to the other cultivars, reaching the highest values in all of the analysed parameters except the pollen grain width. The analysis of the quantitative growth parameters of the pollen tubes inside the style revealed the highest values in the self-pollination variant, whereas the lowest values of this parameter were recorded in the open pollination variant, in all the three years of the research. The presence of incompatible pollen tubes in the upper third of the style, as well as occurrence of their specific growth inside the ovary in all of the analysed pollination variants was less expressed and had no significant impact on the number of fertilised ovules, thus having no major impact on the number of initial and final fruit set.

The analysis performed in the open pollination variant showed that in the full bloom most of the ovules contained embryo sacs in the early eight-nucleate phase. This

particular stage was also determined in the non-pollination variant, at the time of full-bloom, in a rapid transition to the five-nucleate phase. Presence of functional phases of embryo sacs in primary ovules within the non-pollination variant was evident until the eighth day following the initiation of the full bloom.

Examining the growth dynamics of the pollen tubes made it possible to determine the time within which the pollen tubes reach the embryo sac. Based on the established functional phases, it can be concluded that this cultivar has a very short effective pollination period, falling within the interval of one or two days at the most. The two methods that were used to test the vitality of ovules, revealed discrepancies in the case of primary, as opposed to matching in the secondary ovule. In the non-pollination variant, the degenerative change in the primary ovules were related to the egg apparatus, whereas the ones in the secondary ovules were related to the nucleus cells.

Over the three years, the study also recorded the impact made by temperature on the flow of the progamic phase of fertilisation. In the first year, the most optimal temperatures were recorded for the pollen tubes growth, within the first ten days following the start of the full bloom, whereas in the second and third years more intense temperature fluctuations were recorded, making an immediate impact on the tested parameters.

The obtained results clearly indicated the necessity of a proper selection of a polliniser adequate for the analysed plum cultivar. In addition to its late flowering time, the cultivar's full-bloom phase is characterised by the presence of the embryo sac in an early eight-nucleate phase. Based on the examined reproductive characteristics, the analysed cultivars that were used in the cross-pollination variant can be recommended as good pollinisers for the Pozna plava plum cultivar.

Key words: plum, pollen morphology, pollination, pollen tubes growth, embryo sac, fruit set

Scientific field: Biotechnical sciences

Major scientific field: Fruit and grape breeding

UDK: 631.1.11:581.162.4;581.145.1/2

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	4
3. PREGLED LITERATURE	5
4. RADNA HIPOTEZA	15
5. OBJEKAT, MATERIJAL I METODE RADA	16
5.1. Objekat	16
5.2. Materijal	16
5.3. Metode rada	17
5.3.1. Klijavost polena <i>in vitro</i>	18
5.3.2. Morfometrija polena.....	18
5.3.3. Dinamika rasta polenovih cevčica <i>in vivo</i>	19
5.3.4. Histološka ispitivanja plodnika.....	21
5.3.5. Vitalnost semenih zametaka neoprašenih cvetova.....	23
5.3.6. Inicijalno i finalno zametanje plodova.....	24
5.3.7. Temperaturna kretanja u toku trajanja podfaze punog cvetanja.....	24
5.3.8. Statistička obrada podataka.....	25
6. REZULTATI	27
6.1. Klijavost polena <i>in vitro</i>	27
6.2. Morfometrija polena	30
6.3. Dinamika rasta polenovih cevčica <i>in vivo</i>	33
6.3.1. Prosečan broj polenovih cevčica u stubiću i plodniku.....	35
6.3.2. Dinamika rasta polenovih cevčica u tučku.....	38
6.3.3. Korelaciona analiza klijavosti polena <i>in vitro</i> i broja polenovih cevčica u određenim regionima tučka.....	43
6.3.4. Zastupljenost inkompatibilnih polenovih cevčica u stubiću.....	45
6.3.5. Specifičan rast polenovih cevčica u plodniku.....	48
6.4. Histološka ispitivanja plodnika	51
6.4.1. Položaj i morfološki izgled primarnog i sekundarnog semenog zametka u plodniku.....	51
6.4.2. Organizacija normalne embrionove kesice u primarnom i sekundarnom semenom zametku.....	56
6.4.3. Funkcionalni stadijumi, embriogeneza i pojava anomalija u	

strukturi semenih zametaka u varijanti slobodnog oprašivanja.....	58
6.4.3.1. Funkcionalni stadijumi embrionove kesice primarnih semenih zametaka.....	58
6.4.3.2. Rani stadijum embriogeneze.....	59
6.4.3.3. Pojava defektnih primarnih semenih zametaka.....	60
6.4.3.4. Pojava defektnih sekundarnih semenih zametaka.....	62
6.4.4. Vitalnost, funkcionalni stadijumi i anomalije u strukturi semenih zametaka neoprašenih cvetova.....	64
6.4.4.1. Vitalnost primarnih semenih zametka i funkcionalni stadijumi embrionove kesice.....	64
6.4.4.2. Nepravilnosti u strukturi primarnih semenih zametaka.....	67
6.4.6.3. Vitalnost sekundarnih semenih zametaka i funkcionalno stanje embrionove kesice.....	68
6.4.6.4. Nepravilnosti u strukturi sekundarnih semenih zametaka.....	70
6.5. Inicijalno i finalno zametanje plodova.....	72
6.5.1. Korelaciona analiza između prodora polenovih cevčica u nucelus semenog zametka, desetog dana od oprašivanja, inicijalnog i finalnog zametanja plodova.....	74
6.6. Temperaturna kretanja u toku trajanja podfaze punog cvetanja...	75
7. DISKUSIJA.....	78
7.1 Klijavost polena <i>in vitro</i>.....	78
7.2. Morfometrija polena.....	81
7.3. Dinamika rasta polenovih cevčica <i>in vivo</i>.....	83
7.3.1. Prosečan broj polenovih cevčica u stubiću i plodniku.....	86
7.3.2. Dinamika rasta polenovih cevčica u tučku.....	89
7.3.3. Zastupljenost inkompatibilnih polenovih cevčica u stubiću...	92
7.3.4. Specifičan rast polenovih cevčica u plodniku.....	94
7.4. Histološka ispitivanja plodnika.....	98
7.4.1. Položaj i morfološki izgled primarnog i sekundarnog semenog zametka u plodniku.....	98
7.4.2. Organizacija normalne embrionove kesice u primarnom i sekundarnom semenom zametku.....	99
7.4.3. Funkcionalni stadijumi, embriogeneza i pojava anomalija u strukturi semenih zametaka u varijanti slobodnog oprašivanja.....	102
7.4.4. Vitalnost, funkcionalni stadijumi i anomalije u strukturi	

semenih zametaka neoprašenih cvetova.....	104
7.5. Inicijalno i finalno zametanje plodova.....	109
7.6. Temperaturna kretanja u toku trajanja podfaze punog cvetanja...	112
8. ZAKLJUČAK.....	117
9. LITERATURA.....	121

1. UVOD

Rod *Prunus* pripada familiji *Rosaceae*, potfamiliji *Prunoideae*. Ovaj rod obuhvata uglavnom listopadno žbunje i drveće, rasprostranjeno u tropskim i umerenim predelima severne hemisfere. Predstavlja značajan ekonomski izvor jer veći deo vrsta ima jestive plodove (npr. breskva, šljiva, kajsija, trešnja, višnja, badem), od nekih se dobijaju ulja, drvna građa, dok se neke vrste gaje kao ukrasne biljke.

Šljive imaju najveći diverzitet među vrstama roda *Prunus* i prisutne su na tri kontinenta (Okie i Weinberger, 1996). Domaća šljiva (*Prunus domestica* L.) zajedno sa drugih 13 vrsta čini sekciju *Euprunus* (prave šljive). Sa još dve sekcije, ova sekcija pripada podrodu *Prunophora* (šljive i kajsije), koji sa još četiri podroda pripada rodu *Prunus*, u okviru familije *Rosaceae*. Kao sve vrste iz roda *Prunus*, i šljive imaju osnovni broj hromozoma 8 i kreću se od diploida ($2n = 2x = 16$) do heksaploida ($2n = 6x = 48$). Većina komercijalnih sorti šljive pripada evropskim vrstama šljiva, *Prunus domestica* L. i *Prunus instititia* L. (heksaploidi) i japanskoj šljivi, *Prunus salicina* Linde. (diploid). Domaća šljiva (*Prunus domestica* L.) je heksaploidna, alopoliploidna vrsta (Botu et al., 2002). Pretpostavlja se da je domaća šljiva prirodni hibrid koji je nastao pre oko 2000 godina ukrštanjem diploidne džendarike ($2n = 16$) (*Prunus cerasifera* Ehrh.) i tetraploidnog crnog trna ($2n = 32$) (*Prunus spinosa* L.) (Kota i Lācis, 2013).

Šljiva je voćka umereno kontinentalne klime, koja se na prostorima Srbije prilagodila različitim uslovima. Veoma je adaptivna, uspeva čak i na preko 1000 m nadmorske visine (gaji se na padinama Javora i Kopaonika, na visini preko 1250 m). Najrasprostranjenijim sortama šljive u našoj zemlji (Požegača, Stenley i Čačanska rodna) najviše odgovaraju tereni između 200 i 750 m nadmorske visine.

Privredni značaj šljive određen je njenom upotrebom vrednošću, visokom zastupljenošću u voćarskoj proizvodnji, značajnim učešćem u spoljno-trgovinskoj razmeni, visokim angažovanjem radne snage u proizvodnji, preradi i prometu šljive.

Jedan od osnovnih uslova uspešne i rentabilne proizvodnje voćaka je pravilan izbor odgovarajuće glavne sorte, odnosno kombinacije sorta – podloga, kao i odabir

odgovarajućeg oprašivača. Nove sorte treba da svojim kvalitetom i izgledom ploda odgovaraju zahtevima potrošača i prerađivača, da daju visoke i redovne prinose, da su otporne na nepovoljne biotičke i abiotičke činioce sredine, da se dobro čuvaju.

Za postizanje maksimalne realizacije rodnog potencijala pojedinih sorti neophodno je i poznavanje različitih aspekata u oblasti biologije oplodjenja (Cerović i Mičić, 1996). Jedan od faktora koji ima uticaja na efikasnost odvijanja progamne faze oplodjenja, a samim tim i na uspešnost oplodjenja, su temperaturni uslovi. Visoke temperature tokom perioda punog cvetanja sa jedne strane ubrzavaju rast polenovih cevčica u stubiću tučka, ali sa druge strane dovode do bržeg sazrevanja i degeneracija papila na žigu (Egea et al., 1991). Takođe, faktor za koji većina autora iznosi da ima veliki uticaj na odvijanje progamne faze oplodjenja jeste genotip oprašivača. Stott et al. (1973), ispitivanjima kod šljiva, konstatuju brži rast polenovih cevčica u varijanti stranooprašivanja u odnosu na slobodno oprašivanje i samooprašivanje. Cerović (1994), ispitivanjima kod višnje, iznosi bolje vrednosti dinamike rasta polenovih cevčica u varijanti stranooprašivanja u odnosu na varijante samooprašivanja i slobodnog oprašivanja.

Kod predstavnika roda *Prunus* stubić pripada zatvorenom ili čvrstom tipu sa kompaktnom srži provodnog tkiva. Tokom trajanja progamne faze uloga provodnog tkiva stubića je nutritivna (polenove cevčice tokom prolaska kroz stubić ugrađuju molekule iz ekstracelularnog matriksa u zidove cevčica) i usmeravajuća (rast polenovih cevčica ide od vrha ka bazi stubića) (Cheung, 1995). Kod predstavnika roda *Prunus* rast polenovih cevčica u stubiću je brži nego njihov rast u plodniku (Herrero, 1992). Polenovim cevčicama je potrebno kraće vreme da pređu dužu distancu u stubiću nego u plodniku. Jones et al. (1971), ispitivanjem rasta polenovih cevčica kod nekih sorti šljive na temperaturi od 15°C, navode da se njihov prodor u plodnik uočava pet dana nakon oprašivanja. Međutim, Stott et al. (1973) na istoj temperaturi kod nekih drugih sorti šljiva navode da je polenovim cevčicama potrebno osam dana da bi prodrle u plodnik.

Kod predstavnika familije *Rosaceae* sreće se homomorfna gametofitna inkompatibilnost. Reakcija kompatibilnog/inkompatibilnog prepoznavanja je pod kontrolom dva gena *S*-lokusa, *S*-RNaze i *SFB*, od kojih *S*-RNaza kontroliše komponentu stubića, a *SFB* komponentu polena (Tao i Iezzoni, 2010). Domaća šljiva u svom

genomu ima tri komponente (D1D2C), sa genetskom formulom D1D1D2D2CC, gde je C komponenta genomsko nasleđe od diploidne dženarike (Botu et al., 2002).

Jedan od ključnih faktora u procesima oplodjenja, a samim tim i u finalnom zametanju plodova je i dužina vitalnosti normalno razvijenog ženskog gametofita (Cerović, 1994). Kao i ostale koštičave vrste voćaka, i šljiva u plodniku sadrži dva semena zametka koja su približno iste veličine do početka perioda punog cvetanja. Embrionova kesica kod šljiva, je monosporna, bipolarna sa osam jedara i pripada *Polygonum* tipu (Lersten, 2004).

Formiranje normalne embrionove kesice je u direktnoj vezi sa procesima megasporogeneze i megagametogeneze (Cerović i Mičić, 1996). Faza razvoja semenog zametka u vreme cvetanja varira ne samo između vrste voćaka, već čak i između sorti iste vrste. Poznavanje stadijuma zrelosti semenog zametka u vreme cvetanja kada je žig u mogućnosti da primi polen, je značajno sa aspekta samog cveta da postane plod. Ukoliko je u vreme punog cvetanja semeni zametak zreo, u zavisnosti od temperaturnih kretanja nakon cvetanja, postoji veći ili manji rizik da će doći do njegove degeneracije u vreme kada polenove cevčice stignu u plodnik. Sa druge strane, nedovoljno zrela embrionova kesica može biti razlog manjeg broja zametnutih plodova (Ruiz et al., 2010).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja ove doktorske disertacije bio je ispitivanje više citoembrioloških aspekata vezanih za dinamiku odvijanja procesa oplodjenja kod sorte šljive Pozna plava, tokom prvih deset dana podfaze punog cvetanja. Ova sorta se odlikuje kvalitetnim plodovima i izuzetno kasnim vremenom zrenja.

Na osnovu dosadašnjih rezultata, nasuprot dobrom kvalitetu plodova koji poseduje, jedan od ključnih razloga koji može uticati na njeno limitirano gajenje je slabo zametanje plodova. Istraživanja u ovom radu su obuhvatila ispitivanje nekih od ključnih sekvenci procesa oplodjenja ove sorte šljive.

U različitim varijantama oprašivanja analizirana je dinamika rasta polenovih cevčica u stubiću, plodniku i zametanje plodova, što za krajnji cilj ima da se na osnovu ispitanih kvantitativnih pokazatelja rasta polenovih cevčica da preporuka nejefikasnijeg oprašivača. Takođe, utvrđeno je kakav uticaj imaju temperaturna kretanja na interakciju između muškog gametofita i ženskog sporofita. Analiziran je funkcionalni stadijum embrionove kesice i vitalnost semenih zametaka, sa ciljem da se utvrdi stadijum njihove zrelosti u vreme kada bi se realno očekivalo da polenova cevčica stigne do njih i da dođe do oplodjenja.

Analiza dobijenih rezultata iz oblasti embriologije šljive, kroz sagledavanje uticaja pojedinih faktora u reproduktivnom procesu, će omogućiti da se upotpune i prošire saznanja u ovoj oblasti a takođe i da se dobiju smernice daljih istraživanja.

Sa druge strane, s obzirom da su dobijeni rezultati posmatrani u agroekološkim uslovima Čačka, praktična primena ovih rezultata, jeste davanje odgovora na slabu rodnost ove sorte, tj. u adekvatnom odabiru sorte oprašivača koji će omogućiti kontinuirano visoku rodnost.

3. PREGLED LITERATURE

U dosadašnjoj literaturi postoji veliki broj pojmova i termina koji se odnose na funkcionalnu sposobnost polena. Vitalnost polena opisuje sposobnost polenovog zrna da raste, klija i da se razvija (Dafni i Firgman, 2000). Termin vitalnost se koristi da opiše sposobnost polenovog zrna da klija *in vitro* ili *in vivo*, potom da usvaja određene boje prilikom bojenja, kao i da dovede do adekvatnog zametanja plodova prilikom oprašivanja. Međutim, nijedan od navedenih parametara neće biti ispunjen ukoliko nisu odgovarajući uslovi koji će omogućiti klijanje i rast tog polenovog zrna. Stoga, Thomson et al. (1994) navode da se termin vitalnost koristi samo u okvirnoj definiciji i da se u zavisnosti od korišćenog testiranja polenovog zrna koriste različiti termini za opisivanje njegove funkcionalne sposobnosti.

Za razliku od većine biljnih ćelija koje dediferenciraju i izgube svoju polarnost u *in vitro* kulturi, polen zadržava svoj razvojni identitet i polarnost. Polenove cevčice *in vitro* rastu sinronizovano i uniformno pokazujući pri tome visoko polarizovanu citoplazmatsku organizaciju samog vrha, bogatog u egzocitoznim vezikulama (Qin i Yang, 2011).

U radovima većeg broja autora do sada je ispitivan uticaj različitog sastava medijuma: saharoze (Cerović, 1989; Milatović i Nikolić, 2007a; Asma, 2008; Alcaraz et al., 2011), poliamida (Sorkheh et al., 2011), biljnih regulatora (Bolat i Pirlak, 2003), borne kiseline (Bolat i Pirlak, 2003) i fungicida (Cerović et al., 1999, Zarrabi i Imani, 2011) na klijavost polena kod većeg broja predstavnika roda *Prunus*.

Osim uticaja hranljivog medijuma, istraživanja autora su pokazala značaj temperature, relativne vlažnosti vazduha (Anjum i Shaukat, 2008) kao i dužine inkubacije na klijavost polena *in vitro* (Chagas et al., 2010).

Ispitivanja uticaja različitih temperatura na klijavost polena pokazala su da optimalna temperatura zavisi od vrste voćaka, dok varira između sorti (Loupassaki et al., 1997; Mert, 2009). Stösser et al. (1996) navode da vitalnost polena varira između pojedinih sorti u okviru iste vrste voćaka. Kod kajsijske, trešnje (Pirlak, 2002) i višnje

(Cerović i Ružić, 1992a) utvrđeno je da se optimalne temperature za klijavost polena *in vitro* kreću od 15°C do 20°C. Ispitivanja klijavosti polena *in vitro* kod sorti šljive Improved French i Muir Beauty su pokazala da se najbolje vrednosti dobijaju na temperaturama od 22 do 24°C (De Ceault i Polito, 2010).

Polenovo zrno u vreme svoje zrelosti ima troslojni omotač, spoljašnji (egzina), unutrašnji (intina) i polenov omotač koji se sastoji od komponenti koje popunjavanju šupljine na egzini (Edlund et al., 2004). U vreme prašenja polena ne postoji morfološka razlika između spoljašnjeg i unutrašnjeg omotača polenovog zrna, mada postoje hemijske razlike (Rowley et al., 2000). Prašenje polena kod šljive traje od 0–30 h. Sama veličina polena varira od 15 do 100 µm (Robertson, 2008).

Ispitivanja morfologije polena i ornamentike egzine pomoću skenirajućeg elektronskog mikroskopa u novije vreme su se pokazala kao veoma korisna za taksonomiju blisko srodnih vrsta. Fogle (1977a, b) je ukazao da su razlike u veličini i površini egzine polenovog zrna veoma korisne za razlikovanje vrsta i sorti breskve, nektarine, jabuke, trešnje i šljive. Međutim, kasnijim istraživanjima isključena je mogućnost determinacije sorti na osnovu ornamentike egzine i ta determinacija se može primeniti samo na nivou vrste (Mičić, 1988).

Egzina sadrži pore i grebene i na osnovu njihovog rasporeda, pružanja i oblika ornamentika egzine može biti mrežasta, granularna, žlebasta, trnovita, prugasta ili glatka (Evrenosoğlu i Misirli, 2009). Prema navodima Hebda i Chinnappa (1994), kod većine rodova u potfamilijama *Prunoideae*, *Maloideae* i *Spiroideae* polenova zrna su trikolpatna, strijatna sa velikim perforacijama u dolinama između grebena. Ispitivanjima mikromorfoloških karakteristika polena kod trinaest autohtonih sorti i tri podloge u okviru četiri vrsta roda *Prunus* na Siciliji (kajsija, trešnja, šljiva, breskva) najveća varijabilnost ispitivanih parametara je uočena kod polena šljive (Geraci et al., 2012).

Ispitivanjem morfologije polena tri sorte šljive, Mičić (1988) navodi da sve analizirane sorte imaju trikolpatni tip polenovog zrna. Isti autor navodi da oblik polenovog zrna zavisi od toga da li se posmatra u suvom ili hidratisanom stanju. Ukoliko se posmatra u suvom stanju, polenovo zrno ima oblik izduženog rotacionog elipsoida sa tektatnim tipom egzine, retikularne ornamentacije. Rezultati ispitivanja morfoloških karakteristika polena kod trinaest autohtonih i dve standardne sorte šljive u

Bosni su pokazali da se radi o trikolpatnim polenovim zrnima sa tektatnim tipom egzine, retikularne ornamentacije (Mičić et al., 1989).

Zrelo polenovo zrno od momenta prašenja do dospevanja na žig tučka je najmanje osjetljivo na temperaturna kolebanja u odnosu na sve ostale faze u razvoju muškog gametofita. Tolerancija na temperaturna kolebanja se dovodi u vezu sa malim sadržajem vode u polenovom zrnu, niskom metaboličkom aktivnošću i zaštitnim strukturama na njegovoj površini (Hedhly, 2011).

Kod roda *Prunus* stubić pripada vlažnom tipu, gde eksudati sekretornih ćelija žiga omogućavaju klijavost polena i prodor polenove cevčice u tkivo žiga (Nasrallah et al., 1991). Adhezija polena na žig tučka, osim toga što se brzo uspostavlja, je i jaka i visoko selektivna, pri čemu tu značajnu ulogu imaju površina polenovog zrna i ekstracelularni matriks žiga (Zinkl et al., 1999). Nakon adhezije polena na žig tučka dalja dešavanja koja uključuju hidrataciju, klijavost, rast kroz provodno tkivo stubića, vođenje ka mikropili i na kraju interakciju sa ženskim gametofitom vođena su i regulisana od strane ženskog sporofita (Higashiyama i Hamamura, 2008; Palanivelu i Tsukamoto, 2011).

Prvi korak u klijavosti polena je njegova hidratacija koja je daleko od pasivnog procesa (Palanivelu i Tsukamoto, 2011). Komponente žiga regulišu kretanje vode od žiga ka polenu. Fiziološka aktivacija polena zajedno sa hidratacijom rezultira u prelasku sadržaja zrna u cevčicu, što se označava kao momenat klijavosti ili formiranja polenove cevčice na žigu tučka. Klijavost polena na žigu se dešava na autotrofan način, zahvaljujući rezervama hranljivih materija u polenu (Herrero i Dickinson, 1981), dok je rast u stubiću heterotrofan (Herrero i Dickinson, 1979). Iako svaka polenova cevčica sadrži dva spermatična jedra u vegetativnoj citoplazmi, njihovi genomi ne učestvuju u genetičkoj kontroli rasta polenove cevčice, već se ta kontrola ostvaruje od strane haploidnog genoma vegetativnog jedra (Qin i Yang, 2011).

Zid polenove cevčice je dvoslojan. Unutrašnji sloj je sastavljen od kaloze a spoljašnji od celuloze i hemiceluloze (Krichevsky et al., 2007). Vršni region polenove cevčice se može podeliti u četiri zone: apikalna ili vršna zona bogata sa egzocitoznim vezikulama, subapikalna zona bogata u organelama, nuklearna zona i šuplja zona koja može da se prostire do polenovog zrna (Hepler et al., 2001).

U centru stubića se nalazi provodni kanal, koji je sastavljen od izduženih ćelija, koje izlučuju pektinazni ekstracelularni matriks (Crawford i Yanofski, 2008). Na putu ka embrionovoj kesici, polenova cevčica prolazi kroz različita tkiva u tučku i brzina rasta polenovih cevčica je veća u stubiću nego u plodniku (Herrero i Arbeloa, 1989). Ovaj zaključak je potvrđen u rezultatima većeg broja autora na različitim vrstama voćaka. Analiziranjem rasta polenovih cevčica kod višnje i trešnje, Stösser i Anvari (1981) navode da one za dva do tri dana stižu do baze stubića, a za šest do osam dana do semenih zametaka, dok Cerović (1994) kod višnje konstatuje nešto raniji prodor polenovih cevčica u semene zametke, četvrtog dana od oprašivanja. Radičević (2013), ispitivanjem rasta polenovih cevčica kod trešnje, takođe ukazuje na brži rast polenovih cevčica u stubiću nego u plodniku, navodeći na postojanje zavisnosti brojnosti i brzine rasta polenovih cevčica korišćenih oprašivača od sporofita majčinske sorte. Smanjenje u brojnosti polenovih cevčica duž stubića se dovodi u vezu sa smanjivanjem provodnog kanala, a samim tim i dostupnosti hranljivih materija (Herrero, 1992).

Samobesplodnost je jedan od najznačajnijih mehanizama od strane biljaka da spreče samooplođenje i pospeše stranooplođenje (Frankling-Tong i Franklin, 2003). Kod biljaka su zastupljena dva tipa autoinkompatibilnosti: sporofitni i gametofitni. Sporofitni tip se sreće kod malog broja biljaka iz familija *Brassicaceae*, *Asteraceae* i *Convolvulaceae*, dok je gametofitni tip daleko rasprostanjeniji i sreće se kod predstavnika familija *Solanaceae*, *Papaveraceae*, *Ranunculaceae*, *Leguminosae*, *Onagraceae*, *Scrophulariaceae*, *Rosaceae* i *Poaceae* (Igić i Kohn, 2001).

Za razliku od ostalih predstavnika roda *Prunus*, kod kojih postoji gametofitni sistem inkompatibilnosti, kod domaće šljive se sreću oba tipa autoinkompatibilnosti (Botu et al., 2002). Sporofitna inkompatibilnost je uslovljena mutacijom lokusa koji je odgovoran za formiranje polena i citoplazmatsku sterilnost (Kota i Lācis, 2013). Gametofitni sistem je baziran na alelnom polimorfizmu *S*-RNaze kodirajućeg gena ili *S*-gena i na osnovu njegovog ispoljavanja izvršena je podela sorti u tri grupe: samooplodne, delimično samooplodne i samobesplodne (Botu et al., 2002).

Tradicionalni pristup ispitivanja samobesplodnosti kod voćaka bio je praćenjem zametanja plodova oprašenih i izolovanih cvetova u poljskim uslovima. Na osnovu stepena zametanja plodova proučavanih evropskih i japanskih sorti šljive, izvršena je podela sorti u pet grupa: potpuno samobesplodne (nema zametanja plodova),

samobesplodne (zametanje do 1%), delimično samooplodne (zametanje do 10%), samooplodne (zametanje do 20%) i visoko samooplodne (zametanje preko 20%) (Nyéki i Szabó, 1996). Međutim, nedostatak ove metode je što zametanje plodova u zavisnosti od vremenskih prilika može da varira po godinama.

Drugi metod je ispitivanje rasta polenovih cevčica u stubiću i uočavanje inkompatibilnih polenovih cevčica pomoću fluorescentnog mikroskopa (Kho i Baër, 1971). Fluorescentno mikroskopska metoda bojenja sa anilin plavim, kao fluorohromom, omogućava relativno brzo i realno sagledavanje samobesplodnosti kod različitih vrsta voćaka. Depozicija kaloze kod inkompatibilnih polenovih cevčica uočena je ne samo u zidovima već i u kaloznim čepićima koji su u ovim slučajevima mnogo duži i njihov broj je mnogo veći u odnosu na kompatibilne polenove cevčice. Takođe, kod inkompatibilnih polenovih cevčica dolazi do proširivanja samog vrha gde može, a i ne mora, doći do njegovog pucanja.

U dosadašnjoj literaturi ova metoda je dosta korišćena za ispitivanje inkompatibilnosti kod različitih vrsta voćaka: jabuke (Marcucci i Visser, 1987), višnje (Cerović, 1989; 1994), trešnje (Radičević, 2013), kajsije (Milatović i Nikolić, 2007b), šljive (Kuzmanović, 2008; Nikolić i Milatović, 2010; Milošević, 2013; Đorđević et al., 2014). U najvećem broju slučajeva inkompatibilne polenove cevčice su se u svom rastu zaustavljale u gornjoj trećini stubića. U novije vreme se koriste dve molekularne metode za ispitivanje autoinkompatibilnosti: utvrđivanje stilarne ribonukleaze (*S-RNaza*) i DNA amplifikacija i identifikacija PCR analizom (Halász et al., 2005; 2010).

Sporofitna kontrola rasta polenovih cevčica u plodniku je regulisana u dve zone: tkivu plodnika i tkivu semenog zametka. Kod breskve polenove cevčice prestaju sa daljim rastom ako dospeju do obturatora čije ćelije nisu u sekretornoj fazi (Arbeloa i Herrero, 1987; Herrero, 2003).

Kontrola u plodniku je vezana za placentu koja predstavlja vezu između stubića i plodnika. Polenova cevčica raste po površini ćelija placente, koristeći njihove sekretorne produkte. Prisustvo arabinogalaktana (Gane et al., 1995) ukazuje da je sastav sekretornih produkata ćelija placente sličan onom u intercelularnim prostorima stubića. Kontrola rasta polenovih cevčica od strane semenog zametka je kontrolisana ćelijama egzostome, sa jedne, i ćelijama koje čine mikropilu, sa druge strane. Sekretacija ovih ćelija je neophodna jer omogućava polenovim cevčicama dalji prodor. Kod nekih vrsta

ta sekrecija je prisutna od početka punog cvetanja, dok se kod drugih proizvodi u određeno vreme, tj. kada ćelije dostignu određeni stepen razvoja (Herrero, 2000). Kod pojedinih predstavnika roda *Prunus* polenove cevčice lutaju u delu egzostome, dok kod drugih nesmetano prodiru u nju (Herrero, 2000).

Higashiyama et al. (2001) navode da postoje signali u mikropili za usmereno kretanje polenovih cevčica koji potiču od strane sinergida. Isti autori iznose da u semene zametke u kojima su sinergide odstranjene laserom ili u defektne, sa nepravilnim filiform aparatom, polenove cevčice nikada ne prodiru. Sinergide luče atraktante koji vode polenovu cevčicu do ženskog gametofita (Higashiyama et al., 2003) i prema Weteringsu i Russellu (2004) verovatno sadrže faktore koji kontrolišu prestanak daljeg rasta polenove cevčice, njihovo pražnjenje i fuziju gameta. Zrele sinergide sadrže veliki broj sekretornih organela kao što su endoplazmatski retikulum, Goldži kompleks, a takođe i veliki broj vezikula u proksimalnom delu filiform aparata (Higashiyama, 2002). Prvi gen identifikovan da kodira određene atraktante za polenove cevčice lučen od strane ženskog gametofita je *ZmEA1* (*Zea mays* EGG APPARATUS1) (Márton et al., 2005).

Zbog visoke koncentracije jona Ca^{2+} konstatovanih u sinergidama, dugo se smatralo da je ovaj jon potencijalni atraktant. Međutim, ispitivanjem rasta polenovih cevčica *in vitro* utvrđeno je da oni nisu univerzalni atraktanti, već jedni od veće grupe atraktanata (Higashiyama, 2002; Higashiyama et al., 2003). Različita *in vitro* ispitivanja su pokazala da se usmeren rast polenovih cevčica i oslobađanje spermatskih jedara pre može podvesti pod specifičnost same vrste, nego da se to generalno vezuje za jone Ca^{2+} ili GABA (γ amino buterna kiselina) (Dresselhaus i Márton, 2009).

Stadijum zrelosti semenog zametka se smatra jednim od bitnih faktora u procesu oplodjenja. Stadijum razvoja semenog zametka u vreme punog cvetanja se razlikuje među vrstama voćaka, pa čak i među sortama iste vrste. U vreme punog cvetanja nedovoljno zreo semeni zametak je utvrđen kod različitih vrsta voćaka: jabuke, sorte Mutsu (Sato et al., 1988), višnje, sorti Montmorency (Furukawa i Bukovac, 1989) i Čačanski rubin (Cerovic i Micic, 1999), trešnje, sorte Satohnishiki (Beppu et al., 1997), badema, sorte Nonpareil (Pimienta i Polito, 1983). Kod badema u vreme punog cvetanja primarni semeni zameci su zreli, odnosno, embrionove kesice se uglavnom nalaze u peto- ili četvororednom stadijumu (Egea i Burgos, 2000). Albuquerque et al. (2002)

navode da je kod kajsije stradijum razvoja semenog zametka u vreme punog cvetanja genotipska specifičnost vrste.

Nezreo primarni semeni zametak u vreme punog cvetanja kod višnje (Furukawa i Bukovac, 1989) i kajsije (Egea i Burgos, 1994, 1998; Alburquerque et al., 2002) se navodi kao jedan od mogućih razloga lošeg zametanja plodova. Takođe, jedan od mogućih razloga lošeg zametanja plodova je i neusklađena sinhronizacija između muškog gametofita i ženskog sporofita, odnosno između stadijuma razvoja ženskog gametofita i vremena potrebnog polenovim cevčicama da stignu do semenog zametka. Kod badema je utvrđena pozitivna korelacija između dolaska polenovih cevčica do semenih zametaka i stadijuma njihovog razvoja (Pimienta i Polito, 1983). Normalna i zrela embrionova kesica u vreme punog cvetanja se dovodi u direktnu vezu sa uspehom oplodjenja kod višnje (Cerovic i Micic, 1999) i kajsije (Alburquerque et al., 2002). Alburquerque et al. (2004) kod dve od četiri sorte kajsije, u vreme punog cvetanja, konstatuju prisustvo zrelih i veći broj oplodjenih embrionovih kesica, kao i zametnutih plodova. Međutim, kod druge dve sorte embrionove kesice su bile nezrele i kao jedino prihvatljivo rešenje poboljšanja zametanja plodovakod te dve sorte autori navode kasno oprašivanje istih.

Određeni broj autora, ispitivanjem rasta polenovih cevčica u plodniku, kod različitih vrsta voćaka, su uočili prisustvo polenovih cevčica koje su se karakterisale specifičnim rastom, odnosno, rastom koji je odstupao od normalnog. Herrero (2000) pojavu takvog rasta polenovih cevčica dovodi u vezu sa fazom razvoja ženskog sporofita, koji nije u mogućnosti da obezbedi dalji rast polenovih cevčica, u trenutku njihovog dospevanja u određene delove plodnika. Pojava specifičnog rasta polenovih cevčica uočena je u različitim delovima plodnika - tkivu plodnika, zoni obturatora, mikropili, kod višnje (Cerović i Ružić, 1992b), trešnje (Radičević, 2013) i šljive (Đorđević, 2010).

Fluorohromno bojenje sa anilin plavim omogućava da se na osnovu akumulativne determinacije utvrdi vitalnost semenih zametaka kod predstavnika roda *Prunus*. Metoda koju su dali Stösser i Anvari (1982) zasniva se na različitom nivou fluorescencije semenih zametaka nakon bojenja sa anilin plavim. Depozicija kaloze i početna fluorescencije se uvek uočava u halaznom delu, potom se širi i zahvata ceo semeni zametak. Ispitivanja vitalnosti semenih zametaka neoprašenih cvetova kod dve

sorte trešnje i tri sorte višnje su pokazala da one počinju da gube vitalnost 4-5 dana nakon punog cvetanja da bi nedelju dana, od momenta otvaranja cvetova, veći broj cvetova izgubio vitalnost (Stösser i Anvari, 1982). Nasuprot njima, Radičević (2013) kod četiri sorte trešnje u varijanti stranooprašivanja, trećeg dana od oprašivanja, konstatuje pojavu fluorescencije semenih zametaka. Isti autor navodi da se može uočiti jasna gradacija pojave fluorescencije semenih zametaka kod analiziranih cvetova. Emaskulirani neoprašeni cvetovi su najpre i u najvišem procentu pokazivali znake degeneracije, potom emaskulirani oprašeni, dok su se kao najvitaliji pokazali cvetovi koji nisu bili emaskulirani.

Williams (1970) uvodi termin efektivni polinacioni period (EPP), koji se dobija kada se od vremena trajanja vitalnosti semenih zametaka oduzme vreme koje je potrebno polenovim cevčicama da stignu do njih. Kasnije se pokazalo da je EPP izuzetno koristan okvir u sklopu koga se mogu pratiti uticaji koji mogu dovesti do slabog zametanja plodova. Tri glavna procesa tokom trajanja reproduktivnog procesa: receptivnost žiga, rast polenovih cevčica u tučku i razvoj semenih zametaka su okvir EPP na koje veliki uticaj mogu imati temperatura, kvalitet polena i hemijski tretmani (Sanzol i Herrero, 2001).

Zametanje plodova je uslovljeno vremenskim prilikama u vreme cvetanja koje utiču na oprašivanje, rast polenovih cevčica i vitalnost semenog zametka. Tokom reproduktivnog procesa veći broj faktora ima uticaja na broj finalno zametnutih plodova. To uključuje vitalnost polena, transfer polena na žig tučka, inkompatibilnu reakciju, sinronizaciju u vremenu dolaska polenove cevčice u semeni zametak i zrelost embrionove kesice, oplodjenje jedne od njih i uspešan razvoj embriona (Rodrigo i Herrero, 1998).

Kod emaskuliranih cvetova faktori koji imaju uticaja na slabo zametanje su vremenski uslovi pre i tokom fenofaze cvetanja, neadekvatni stadijum razvoja cvetnih pupoljaka u vreme kada se radi emaskulacija, gubitak nutritivne i zaštitne uloge perijanta, oštećenje tučka prilikom izvođenja postupka (Okie i Hancock, 2008), kao i ubrzana degeneracija semenih zametaka (Hedhly et al., 2009).

Na slabo zametanje plodova kod pojedinih sorti šljive može uticati genetska predispozicija za razvoj nepravilnih embrionovih kesica, niske temperature u vreme cvetanja ili nedostatak bora u cvetovima, što rezultira slabim rastom polenovih cevčica

(Thompson i Liu, 1973). Takođe, slabo zametanje plodova može nastati i usled smanjenog EPP, razlike između stadijuma zrelosti semenog zametka i vremena potrebnog polennoj cevčici da stigne do semenog zametka (Williams, 1970; Stösser i Anvari, 1982). Različiti uzroci mogu dovesti do toga da cvetovi ne budu oprašeni u vreme otvaranja, već kasnije u vreme kada žig izgubi svoju receptivnost. Kratak period receptivnosti žiga svakako nije poželjan jer može usloviti nisko zametanje plodova.

Karakteristika globalnog klimatskog zagrevanja jeste povećanje učestalosti ekstremnih temperatura koje utiču na smanjenje uspešnosti oplodjenja, a sa tim i na nisko zametanje plodova (Tubiello et al., 2007). Uticaj visokih temperatura tokom reproduktivnog procesa je izraženiji kod vrsta voćaka koje se nalaze na granici njihovog areala gajenja, tako da su one osetljivije na kratko pojavljivanje visokih temperatura (Olesen i Bindi, 2002). Daleko značajniji je uticaj temperature na učinak polena (Hedhly et al., 2008). U slučaju temperaturnog stresa, uobičajena reakcija muškog gametofita bi bila redukcija u produkciji polena i njegovoj vitalnosti, koja se kasnije odražava na proces oprašivanja i potom oplodjenja. U nekim slučajevima uticaj temperature može biti takav da dovodi do pojave sterilnosti polena i/ili do sprečavanja pucanja antera. Slični efekti su uočeni i kod ženskog sporofita (žig, stubić i plodnik) i gametofita što u krajnjoj liniji može dovesti do ženske sterilnosti (Hedhly, 2011).

Temperaturna kolebanja imaju uticaja u prvim fazama nakon dospevanja polena na žig tučka, inicijacije polenove cevčice i rasta u provodnom tkivu stubića (Hedhly et al., 2005b). Kod trešnje visoke temperature značajno ubrzavaju rast polenovih cevčica u prva dva dana nakon oprašivanja, ali u narednim danima se statistički značajno manji broj polenovih cevčica konstatuje u bazi stubića (Hedhly et al., 2007). U vreme punog cvetanja visoke temperature imaju veći uticaj na ženski gametofit dovodeći do brze degeneracije embrionove kesice i nucelusa, nego što imaju uticaja na klijavost polena na žigu i rast polenove cevčice u stubiću (Beppu et al., 2001). Isto tako, niske temperature u vreme cvetanja redukuju brzinu rasta polenovih cevčica u tučku i skraćuju efektivni polinacioni period (Sanzol i Herrero, 2001).

Visoke temperature utiču na receptivnost žiga dovodeći do smanjenja količine eksudata i njihovu kratkotrajnu dostupnost polenovim zrnima. Mada je ženski gametofit više zaštićen nego muški gametofit, takođe pokazuje osetljivost na temperaturna kolebanja. Visoke temperature redukuju vreme trajanja receptivnosti žiga i vitalnosti

semenih zametaka, dok niske temperature dovode do produžavanja perioda receptivnosti žiga i vitalnosti semenih zametaka (Postweiler et al., 1985; Cerovic et al., 2000; Hedhly et al., 2003).

Kod većine voćaka, iz različitih klimatskih regiona, dolazi do slabog zametanja plodova, kada su neposredno pre ili u toku cvetanja izloženi niskim ili visokim temperaturama, u odnosu na optimalne vrednosti (Hedhly, 2011). Povećanje prosečne dnevne temperature za 3°C, nedelju dana pre početka punog cvetanja utiče na smanjeno zametanja plodova kod kajsije (Rodrigo i Herrero, 2002) ili kod trešnje nedelju dana nakon početka punog cvetanja (Hedhly et al., 2007; Radičević, 2013). Prosečno povećanje temperature za 3°C u odnosu na kontrolu, kod breskve, utiče na skraćivanje dužine stubića i na pojavu anomalija u strukturi plodnika (Rodrigo i Herrero, 2002).

Kod trešnje i višnje povećanje temperature sa 5°C na 25°C skraćuje period vitalnosti semenog zametka sa 5 dana na 1–2 dana (Postweiler et al., 1985). Slični rezultati su dobijeni kod šljive u kontrolisanim uslovima gde je na 20°C došlo do značajnog smanjenja vitalnosti semenih zametaka u odnosu na kontrolu u poljskim uslovima, kao i na niske konstantne temperature (Cerovic et al., 2000). Kod breskve, visoke temperature, iznad 25°C, u periodu pre početka punog cvetanja sprečavaju razvoj ili dovode do degeneracije embrionove kesice (Kozai et al., 2004).

Rezultati koje iznose Morenol et al. (1992) kod dve sorte šljive jasno ukazuju na uticaj temperature na degeneraciju semenih zametaka, pri čemu je ona daleko brža na visokim temperaturama. Autori navode da je brža degeneracija semenih zametaka uslovljena njihovim nedovoljnim snadbevanjem hranljivim materijama. Hall (1992) navodi da je reproduktivna faza jedna od najosetljivijih faza kod biljaka na temperaturna kolebanja. Niske i visoke temperature u vreme cvetanja mogu imati negativan efekat, koji se u krajnjem slučaju odražava na broj zametnutih plodova.

4. RADNA HIPOTEZA

U ovoj disertaciji pošlo se od pretpostavke da će ispitivana sorta šljive, kao i korišćeni oprašivači ispoljiti svoje genotipske specifičnosti u pogledu reproduktivnih karakteristika.

Očekivalo se da će se među korišćenim sortama oprašivačima pokazati razlike u pogledu ispitivanja morfometrijskih osobina polenovih zrna, kao i klijavosti polena *in vitro*. Pretpostavilo se da će u godinama ispitivanja korišćene sorte oprašivači u određenim temperaturnim uslovima u toku prvih deset dana nakon punog cvetanja pokazati različitu genotipsku specifičnost u pogledu rasta polenovih cevčica u stubiću i plodniku, kao i u broju zametnutih plodova.

Deo istraživanja bio je baziran na pretpostavci da će temperaturni uslovi imati uticaja na broj inicijalno i finalno zametnutih plodova u ispitivanim varijantama oprašivanja, kao i na vitalnost semenih zametaka.

Značajan deo istraživanja bio je zasnovan na pretpostavci da će citoembriološka ispitivanja plodnika pokazati tok procesa makrogametogeneze, odnosno, da će ukazati na funkcionalno stanje embrionove kesice u toku prvih deset dana nakon punog cvetanja.

Pretpostavilo se, na kraju, da će u ispitivanim agroekološkim uslovima Čačka proučavana sorta šljive kao i korišćeni oprašivači ispoljiti svoje, kako pozitivne, tako i negativne biološke osobine i da će dobijeni rezultati poslužiti kao značajan izvor informacija u pogledu rasvetljavanja uzroka smanjene plodnosti ove sorte šljive.

5. OBJEKAT, MATERIJAL I METODE RADA

5.1. Objekat

Ispitivanja za ovu doktorsku disertaciju obavljena su, tokom trogodišnjeg perioda (2008, 2010. i 2011. godina), u zasadu šljive na objektu Ljubić, Instituta za voćarstvo u Čačku.

Zasad je podignut 2002. godine na podlozi džanarika (*Prunus cerasifera* Ehrh.). Sadnja je obavljena na rastojanju $6,0 \times 5,0$ m. Ogladni zasad se nalazi na nagnutom terenu, na južnoj ekspoziciji, na 254 m nadmorske visine. Pravac pružanja redova je istok – zapad, a sistem uzgoja je kotlasta kruna. Sadnja je obavljena po slučajnom blok sistemu, pri čemu je svaka sorta u bloku bila zastupljena sa pet stabala u tri ponavljanja.

Tokom izvođenja ogleđa u zasadu je primenjivana redovna agrotehnika i zaštita za šljivu. Zemljište između redova održavano je u vidu jalovog ugara.

5.2. Materijal

Kao materijal za ispitivanje korišćena je sorta šljive Pozna plava. Stvorena je 1980. godine u Institutu za voćarstvo u Čačku, samooplodnom sorte Čačanska najbolja. Za sortu je priznata 2008. godine. U saradnji sa g. Klausom Ganterom (rasadnik Klaus Ganter Markenbaumschule, Wyhl, Nemačka) ova sorta šljive je na području Evropske Unije zaštićena pod nazivom Čačak Späthe.

U opštoj oceni je navedeno da sorta šljive Pozna plava cveta srednje pozno. Polen je dobre klijavosti. Delimično je samooplodna. U određenim lokalitetima rađa obilno. Lokalitet i vremenske prilike u periodu cvetanja znatno utiču na prinose ove sorte. Srednje je osetljiva na prouzrokača plamenjače (*Polystigma rubrum* Pers.), a relativno osetljiva na prouzrokača rđe (*Puccinia pruni spinosae* Diet.) šljive. Otporna je na prouzrokača truleži plodova (*Monilinia laxa* Aderh et Ruhl.). Tolerantna je na virus šarke šljive (*Plum pox potyvirus*).

Plod je sitan do srednje krupan (20–40 g), ovalnog oblika. Pokožica je čvrsta, tamnoplava sa obilnim pepeljkom. Meso ploda je žuto, čvrsto, sočno, odličnog slatko–nakiselog ukusa (Slika 1).



Slika 1. Plodovi sorte šljive Pozna plava.

Sazreva kasno, krajem avgusta i početkom septembra, što je svrstava u jednu od najpoznatijih sorti šljive. Zahvaljujući čvrstim plodovima odlično podnosi manipulaciju i transport.

5.3. Metode rada

Trogodišnja istraživanja na sorti šljive Pozna plava su obuhvatala poljska i laboratorijska ispitivanja.

U poljskim uslovima, tokom trogodišnjeg perioda ispitivanja, u toku podfaze punog cvetanja, postavljen je ogled sa tri varijante oprašivanja: slobodno oprašivanje, stranooprašivanje i samooprašivanje. U 2008. godini istraživanja kod ispitivanja

kvantitativnih parametara rasta polenovih cevčica i zametanja plodova za varijantu stranooprašivanja korišćeni su oprašivači Čačanska najbolja i Hanita. U 2010. i 2011. godini, prvenstveno zbog preklapanja vremena cvetanja za glavnom sortom korišćenom u ovom istraživanju, a potom i zbog aktuelnosti same sorte, korišćena je i sorta Presenta. Ova sorta kao i Hanita potiče iz Nemačke, a obe su nastale kao rezultat oplemenjivačkog rada na Univerzitetu u Hohenhajmu, Nemačka.

Izuzev morfometrije polena, koja je urađena u laboratoriji Katedre za voćarstvo, Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu, ostala laboratorijska ispitivanja su obavljena u laboratoriji Odeljenja za pomologiju i oplemenjivanje voćaka, Instituta za voćarstvo u Čačku.

5.3.1. Klijavost polena *in vitro*

Za ispitivanje klijavosti polenovih zrna *in vitro*, u trogodišnjem periodu korišćena je agaro-saharozna podloga. Za ovo ispitivanje sakupljani su cvetovi sorti Čačanska najbolja, Presenta, Hanita i Pozna plava, koji su bili u fazi poznog balona. U laboratorijskim uslovima antere su sakupljane u papirne kutije i držane na temperaturi od 20°C, 24–48 h, odnosno, do momenta njihovog pucanja i oslobađanja polenovih zrna. Polen od svake sorte je zasejan na hranljivu podlogu (1% agar i 12% saharoza), razlivenom u tri petri kutije.

Na osnovu metode utvrđivanja klijavosti polena po Galleta (1983), nakon perioda inkubacije, kao klijala polenova zrna računala su se ona koja su isključila više od svog prečnika. Po petri kutiji prebrojavanje je vršeno u tri vidna polja, a u svakom polju je analizirano oko 100 polenovih zrna.

Klijavost po godinama ispitivanja određena je kao prosek za tri ponavljanja.

5.3.2. Morfometrija polena

Morfometrijska ispitivanja polena obavljena su u 2011. godini. U poljskim uslovima su sakupljani cvetovi u fazi poznog balona sorti šljiva Čačanska najbolja, Presenta, Hanita i Pozna plava. U laboratoriji antere su odvajane u papirne kutije i

držane na sobnoj temperaturi do momenta njihovog pucanja i oslobađanja polenovih zrna. Do dalje analize polen je u flakonima čuvan u frižideru na +4°C.

Polen je pomoću četkice nanošen na dvoslojnu traku koja je postavljena na nosač objekta mikroskopa, a zatim je urađeno naparavanje slojem zlata debljine 20 nm, na aparatu marke BAL-TEC SCD 005 (Capovani Brothers Inc., Scotia, NY, USA).

Pripremljeni preparati su posmatrani skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM) marke JEOL JSM-6390LV (Tokyo, Japan), pri uvećanju od 2000× za celo polenovo zrno i na 15000× za delove površine egzine.

Kod svake sorte posmatrano je i analizirano po 30 polenovih zrna. Ispitivanja polena su obuhvatila polarnost, simetriju, aperturaciju (broj, dužinu i širinu kolpi, širinu mezokolpijuma), oblik polenovog zrna (polarni i ekvatorijalni pogled), veličinu polena (polarni dijametar – dužina, ekvatorijalni dijametar – širina, odnos dužina/širina) i karakteristike egzine (ornamentika, broj grebena na 100 μm^2 ekvatorijalnog područja egzine, širinu grebena i brazdi). Kod određivanja oblika polena korišćena je klasifikacija odnosa dužina/širina polenovog zrna data od strane Erdtman (1952) gde se polenova zrna dele na: 'suboblatna' (0,75–0,88), 'oblatno sferoidna' (0,88–1,00), 'subprolatna' (1,14–1,33), 'prolatna' (1,33–2,00) i 'perprolatna' (>2,00).

5.3.3. Dinamika rasta polenovih cevčica *in vivo*

Rast polenovih cevčica *in vivo* u stubiću sorte šljive Pozna plava, ispitan je u varijantama slobodnog oprašivanja, stranooprašivanja i samooprašivanja, u trogodišnjem periodu. Kao oprašivači korišćen je polen sorti Čačanska najbolja, Presenta, Hanita i Pozna plava.

U fazi poznog balona izvršena je emaskulacija cvetova (Slika 2a, 2b), tj. uklanjanje perijanta i antera, nakon čega su grane sa emaskuliranim cvetovima izolovane pergamentnim kesama, radi sprečavanja nekontrolisane polinacije. Veštačko nanošenje polena na žig tučka (Slika 2c) rađeno je u momentu kada se na žigu uočavala sekrecija (što se poklapa sa vremenom kada je otvoreno oko 85% cvetova). Na te grane su ponovo nanošene kese koje su potom uklanjane nakon 10 – 15 dana (Slika 2d).

Od momenta oprašivanja u pet sukcesivnih termina (48 h, 96 h, 144 h, 192 h i 240 h) izvršeno je fiksiranje, oko 40 cvetova u svakoj varijanti oprašivanja. Za fiksaciju

je korišćen FPA (70% etanol, propionska kiselina i formaldehid, u odnosu 90:5:5 zapreminskih delova). Fiksirani uzorci su do momenta dalje analize držani u frižideru na +4°C.



Slika 2. Izdvojene grane sorte šljive Pozna plava za hibridizaciju: a) cvetovi u fazi kasnog balona; b) emaskulirani neoprašeni cvetovi; c) emaskulirani oprašeni cvetovi; d) grane sa oprašenim cvetovima izolovane pergamentnim kesama.

Za ispitivanje rasta polenovih cevčica u stubiću i plodniku, korišćena je fluorescentno-mikroskopska metoda sa anilin-plavim kao fluorohromom (Preil, 1970; Kho i Baër, 1971). Bojena reakcija se zasniva na vezivanju fluorohroma za kalozu (β 1-3 glukan) i sekundarnoj fluorescenciji tog spoja pod UV svetlom. Kaloza postoji u malim količinama, u strukturno različitim biljnim tkivima i neka od njenih svojstava su visoka nepropustljivost, brza sinteza i lako razgrađivanje. U polenoj cevčici, kaloza je prisutna na određenoj udaljenosti od vrha polenove cevice, u obliku kaloznih čepića koji se pojavljuju duž polenove cevčice u pravilnim razmacima. Mada njena uloga još uvek nije rasvetljena, neke od pretpostavki su da ima ulogu da spreči plazmu da od vrha teče

unazad kao i da podrži zid polenove cevčice od pucanja, mehaničkih tenzija i pritisaka (Ünal et al., 2013).

U laboratoriji, na predmetnoj pločici stubić je u svom donjem delu odvajan od plodnika. Za posmatranje rasta polenovih cevčica u stubiću, na predmetnoj pločici isti je uzdužno razdvajan, a onda je pomoću pokrovne ljupe pravljen skvoš preparat. Plodnik je razdvajan po suturi. Semenim zametak je zasecan u longitudinalno-tangencionalnom pravcu da bi se uočio bolji prodor polenove cevčice u mikropilu i nucelus (Cerović, 1994).

Utvrđivanje dužine polenove cevčice u stubiću rađeno je na mikroskopu Olympus BX61 (Tokyo, Japan), u softverskom programu AnalySIS (Soft Imaging System GmbH, Münster, Germany), gde se korišćenjem MIA (Multiple Image Analysis) dobija slika celog stubića.

U svakom ispitivanom uzorku određivan je broj polenovih cevčica u gornjoj trećini stubića, broj polenovih cevčica prodrlih u plodnik, najduža polenova cevčica u stubiću (gornja, srednja ili donja trećina stubića), prodor polenove cevčice u plodnik (lokula plodnika, mikropila ili nucelus semenog zametka), prisustvo inkompatibilnih polenovih cevčica u stubiću kao i pojava specifičnog rasta polenovih cevčica u plodniku.

Za ispitivanje kvantitativnih parametara rasta polenovih cevčica u svakoj varijanti oprašivanja i za svaki termin fiksiranja pregledano je 30 uzoraka, odnosno 750 tučkova po godini ispitivanja.

5.3.4. Histološka ispitivanja plodnika

Histološkim ispitivanjima plodnika proučavana je dinamika procesa megagametogeneze i organizacija embrionove kesice.

Za ova ispitivanja, u dvogodišnjem periodu, korišćena je varijanta slobodnog oprašivanja i neoprašeni tretman koji je u ovom slučaju predstavljao kontrolu. Postupak izolovanja cvetova za ova ispitivanja isti je kao onaj opisan u potpoglavlju 5.3.3.

Po dvadeset cvetova u svakoj varijanti je fiksirano u FPA fiksativ, u dvodnevnom intervalima, počev od momenta punog cvetanja zaključno sa desetim

danom od početka punog cvetanja. Fiksirani uzorci su čuvani u frižideru na +4°C do momenta njihove pripreme i posmatranja pod mikroskopom.

Na predmetnoj pločici pod binokularom stubić je odsecan od plodnika. Tkivo plodnika je isečeno u obliku trapeza, da bi se omogućio lakši ulazak ksilola, a potom i parafina u ćelije semenog zametka. Uvođenje plodnika u parafin je išlo sledećim postupkom:

- fiksirani materijal prvo je ispiran u 70% alkoholu (24 h), da bi se uklonio fiksativ, a potom dehidrisan u seriji rastuće koncentracije alkohola: 90% – 1 h; 96% – 2 h; 100% – dve promene po 2 h,
- prosvetljavanje u ksilolu: alkohol:ksilol (odnos 2:1) – do 18 h; ksilol – dve promene po 10 min.,
- uvođenje u parafin je išlo sledećim postupkom: parafin I:ksilol (odnosu 1:1) – 48 h; parafin II – 72 h; parafin III – 48 h. Uzorci u parafinu su držani u termostatu, na konstantnoj temperaturi od 61°C,
- u parafinu III je urađeno razlivanje u petri kutije. Nakon vađenja parafinskih ploča iz petri kutija, odvajani su pojedinačni uzorci plodnika u parafinu i sečeni u obliku trapeza,
- pojedinačni uzorci plodnika su lepljeni na nosače i čuvani u frižideru. Neposredno pre sečenja uzorci su držani izvesno vreme na ledu.

Priprema predmetnih pločica na koje su lepljeni preseći je obuhvatala provlačenje kroz rastvor od 1% želatina i 0,1% stipse. Preseći uzoraka, debljine 10 µm, su sečeni na mikrotomu marke Baird&Tatlock (London, England).

Nakon razvlačenja u destilovanoj vodi trake sa delovima plodnika su nanošene na predmetne pločice, potom sušene par dana u termostatu na 20°C. Par dana nakon sušenja, uzorci su provlačenjem kroz seriju opadajuće koncentracije alkohola (96–50%) dovedeni do faze bojenja.

Za histološka ispitivanja uzorci su bojeni safraninom, kristal ljubičastim i svetlo zelenim, po metodi Gerlach (1969). Na presecima safranin boji lignifikovane ćelijske zidove, nukleoluse i hromosome (osim u ranoj profazi) crvenom bojom, dok svetlo zeleno boji citoplazmu, a celulozne ćelijske zidove različitim nijansama zelene boje. Rastvor kristal ljubičasto diferencira bojenje sa safraninom, s tim da ga može u potpunosti zameniti ukoliko se preseći duže drže u njemu.

Na obojene preseke lepljena je pokrovna ljuspica pomoću kanada balsama i pločice su sušene par dana u termostatu. Posmatranje preseka obavljeno je na mikroskopu marke Carl Zeiss (Jena, Germany), a fotografisanje na mikroskopu Olympus BX61 (Tokyo, Japan).

Histološka ispitivanja su obavljena na primarnom i sekundarnom semenom zametku. Prema Dyš (1984) i Furukawa i Bukovac (1989) u varijanti slobodnog oprašivanja i u neoprašenoj varijanti su registrovani sledeći razvojni stadijumi embrionove kesice: dvojedarni, četvorojedarni i osmojedarni stadijum, pri čemu je osmojedarni stadijum dalje rangiran kao delimično organizovana embrionova kesica (u slučaju kada se u embrionovoj kesici nalazi osam jedara koja su zauzela svoj položaj, ali nije još došlo do vakuolarizacije njihovih ćelija) i potpuno organizovana ili zrela embrionova kesica (u kojoj su sve ćelije normalno razvijene). Kao funkcionalne embrionove kesice su se računale i one u kojima je došlo do degeneracije antipoda pa se nalaze u petojedarnom stadijumu. Ukoliko je došlo do spajanja polarnih jedara to se računalo kao četvorojedarni stadijum.

Ogled za ova ispitivanja obavljen je u toku 2008. i 2010. godine. U svakoj varijanti ispitivanja i za svaki termin fiksiranja analizirano je po 10 plodnika (osam uzdužnih i dva poprečna preseka) što čini ukupno 120 plodnika po godini ispitivanja, odnosno 240 plodnika za obe godine ispitivanja.

5.3.5. Vitalnost semenih zametaka neoprašenih cvetova

U trogodišnjem periodu ispitana je i vitalnost semenih zametaka sorte šljive Pozna plava. Vitalnost semenih zametaka je ocenjena primenom fluorescentno-mikroskopske metode opisane od strane Anvari i Stösser (1978a, b), gde je različit intenzitet fluorescencije semenih zametaka bio indikator gubitka njihove vitalnosti.

Emaskulirani neoprašeni cvetovi (procedura opisana u podpoglavlju 5.3.3), u dvodnevnom intervalima, počev od momenta punog cvetanja pa do desetog dana od punog cvetanja, su fiksirani u FPA fiksativ. Svi fiksirani uzorci su čuvani u frižideru na +4°C do momenta njihove dalje pripreme i posmatranja pod mikroskopom.

Priprema uzoraka za ispitivanje vitalnosti semenih zametaka je rađena po istoj proceduri kao za ispitivanje rasta polenovih cevčica u stubiću (procedura opisana u

potpoglavlju 5.3.3). Nakon bojenja sa anilin plavim, na predmetnim pločicama plodnici su odsecani od stubića i otvarani po suturi.

Na osnovu subjektivnog kriterijuma, vizuelnim pregledom intezitet fluorescencije semenih zametaka koji se javlja je podeljen u pet kategorija: 1 – nema fluorescencije; 2 – fluorescencija u halaznom delu; 3 – fluorescencija u halaznom delu koja se širi ka bočnoj strani; 4 – fluorescencijom je zahvaćen i mikropilarni deo; 5 – ceo semeni zametak fluorescira.

Mada je primarni semeni zametak ključan u daljem procesu oplodjenja i zametanja plodova, ispitana je i dužina trajanja vitalnosti sekundarnih semenih zametaka, da bi se ustanovilo u kom se stadijumu oni nalaze.

Kod oba semena zametka je analizirana podudarnost ove metode sa korišćenom metodom histološkog bojenja. Za svaki termin fiksiranja analizirano je po 30 plodnika.

U ovom, kao i u potpoglavlju 5.3.3, pripremljeni uzorci su posmatrani i analizirani pod ultravioletnom svetlošću na mikroskopu, marke Olympus BX61 pod plavim filterom (talasna dužina 340–380 nm), dok je u podpoglavljima 5.3.1 i 5.3.4 posmatranje i analiza uzoraka obavljena na istom mikroskopu pod običnim svetlom.

5.3.6. Inicijalno i finalno zametanje plodova

U trogodišnjem periodu, za ispitivanje broja inicijalno i finalno zametnutih plodova u varijanti slobodnog oprašivanja odabrane su 3–4 grane sorte šljive Pozna plava na kojima je prebrojan ukupan broj cvetova (oko 100 cvetova po grani). U varijantama stanooprašivanja i samooprašivanja od momenta oprašivanja su obeležene grane, sa oko 200–300 oprašenih cvetova na njima.

Broj inicijalno zametnutih plodova utvrđen je četiri do pet nedelja posle oprašivanja, dok je brojanje finalno zametnutih plodova obavljeno na početku fenofaze zrenja plodova.

5.3.7. Temperaturna kretanja u toku trajanja podfaze punog cvetanja

Tokom izvođenja eksperimenta, u sve tri godine, praćene su dnevne temperature, tokom trajanja podfaze punog cvetanja, radi ispitivanja njihovog uticaja na

efikasnost odvijanja programne faze oplodjenja i u krajnjoj liniji na broj zametnutih plodova. Izračunate su srednje dnevne temperature i prosečna srednja dnevna temperatura podfaze punog cvetanja (od dana oprašivanja, pa do desetog dana od dana oprašivanja).

5.3.8. Statistička obrada podataka

Dobijeni rezultati statistički su obrađeni primenom Fischer–ovog modela analize varijanse dvofaktorijalnog ogleda (Fischer, 1953). Kod ispitivanja morfometrijskih karakteristika polenovih zrna primenjen je jednofaktorijalni model analize varijanse. Tokom statističkih analiza, za rezultate prikazane u procentima izvršena je arcsin $\sqrt{\%}$ transformacija podataka, čime se dobijaju vrednosti koje imaju normalnu raspodelu, a nakon statističke obrade, dobijene vrednosti su ponovo pretvorene u procenete kako bi se prikazale u tabelama. Dobijene vrednosti su predstavljene kao prosek \pm SE (standardna greška srednje vrednosti).

U slučaju pojave statističke značajnosti F–pokazatelja u okviru nekog od osnovnih faktora kao i njihove interakcije rađeno je testiranje značajnosti razlika pojedinačnih sredina primenom LSD testa, sa pragom značajnosti od 95%.

Međusobna zavisnost između pojedinih parametara koji su ispitani utvrđena je korelacionom analizom primenom Pirsonovog koeficijenta proste korelacije. Predznak koeficijenta korelacije (+/–) ukazuje na vrstu veze pozitivna ili negativna (direktna ili obrnuta). Vrednosti od 0 do 1 ukazuju na jačinu korelacije:

– vrlo jaka povezanost (0,70 ili više); jaka povezanost (0,50–0,69); srednja povezanost (0,30–0,49); slaba povezanost (0,11–0,29); zanemarljiva povezanost (0,01–0,09); nepostojanje linearne povezanosti (0,00).

Kvadriranjem koeficijenta korelacije dobijen je koeficijent determinacije (r^2). Njegove vrednosti se kreću od 0 do 1 (ili 0 – 100%). Označava u kom procentu ispitivana nezavisna promenljiva ima uticaja na zavisnu promenljivu. Kod izračunavanja koeficijenta determinacije ostatak do 100% predstavlja koeficijent alijentacije, koji podrazumeva uticaj ostalih faktora na ispitivanu promenljivu.

Na osnovu regresione analize preko testiranja izabran je tip funkcije koja najbolje odgovara kretanju broja funkcionalnih embrionovih kesica u zavisnosti od dana ispitivanja. U analizi je korišćen nelinearni metod kvadratne regresije:

$$y = a + bx + cx^2$$

Analiza podataka je obavljena korišćenjem statističkog softverskog paketa STATISTICA, Version 8 (StatSoft, Inc., Tulsa, Oklahoma, USA).

6. REZULTATI

6.1. Klijavost polena *in vitro*

Klijavost polena *in vitro* na agaro–saharoznoj podlozi je najpouzdanija metoda za utvrđivanje vitalnosti polena, odnosno potencijala polenovog zrna da klija. Utvrđivanje klijavosti polena kod različitih vrsta voćaka je značajna karakteristika koja ukazuje na kvalitet polena, s obzirom na to da je za efikasno oplođenje neophodna procentualno visoka klijavost polena.

Rezultati klijavosti polena *in vitro* iz 2008. godine su prikazani posebno i statistički analizirani kao jednofaktorijski. U 2010. i 2011. godini istraživanja korišćen je oprašivač više, stoga su rezultati klijavosti polena *in vitro* iz ove dve godine prikazani zajedno i statistički analizirani kao dvofaktorijski.

U 2008. godini ispitivanja najveća vrednost klijavosti polena *in vitro* utvrđena je kod sorte Čačanska najbolja (52,65%), a najmanja kod sorte Pozna plava (29,10%) (Tabela 1). Statistička analiza je pokazala značajan uticaj sorte na klijavost polena *in vitro*.

U 2010. godini istraživanja kod sorte Čačanska najbolja, a u 2011. kod sorte Hanita utvrđena je najveća klijavost polena *in vitro* (45,26% i 54,56%). Najniže vrednosti klijavosti polena u 2010. i 2011. godini su utvrđene kod sorte Pozna plava (12,96% i 21,55%).

Prosečna klijavost polena u 2010. i 2011. godini bila je najveća kod sorte Presenta (46,48%), dok je sorta Pozna plava sa 17,26% imala najnižu prosečnu vrednost (Tabela 2; Slika 3).

Veća prosečna klijavost polena po godinama je utvrđena u 2011. godini (42,31%) u odnosu na 2010. godinu ispitivanja (33,09%). Veća klijavost polena sorte Čačanska najbolja bila je u 2010. godini (46,26%), dok su kod sorti Pozna plava (21,55%), Hanita (54,56%) i Presenta (53,89%) više vrednosti utvrđene u 2011. godini.

Tabela 1. Klijavost polena *in vitro* sorti šljive, koje su korišćene kao oprašivači za sortu Pozna plava, u 2008. godini istraživanja.

Sorta	Klijavost polena <i>in vitro</i> (%)
Pozna plava	29,10±2,97 b
Čačanska najbolja	52,65±1,18 a
Hanita	45,24±1,02 a

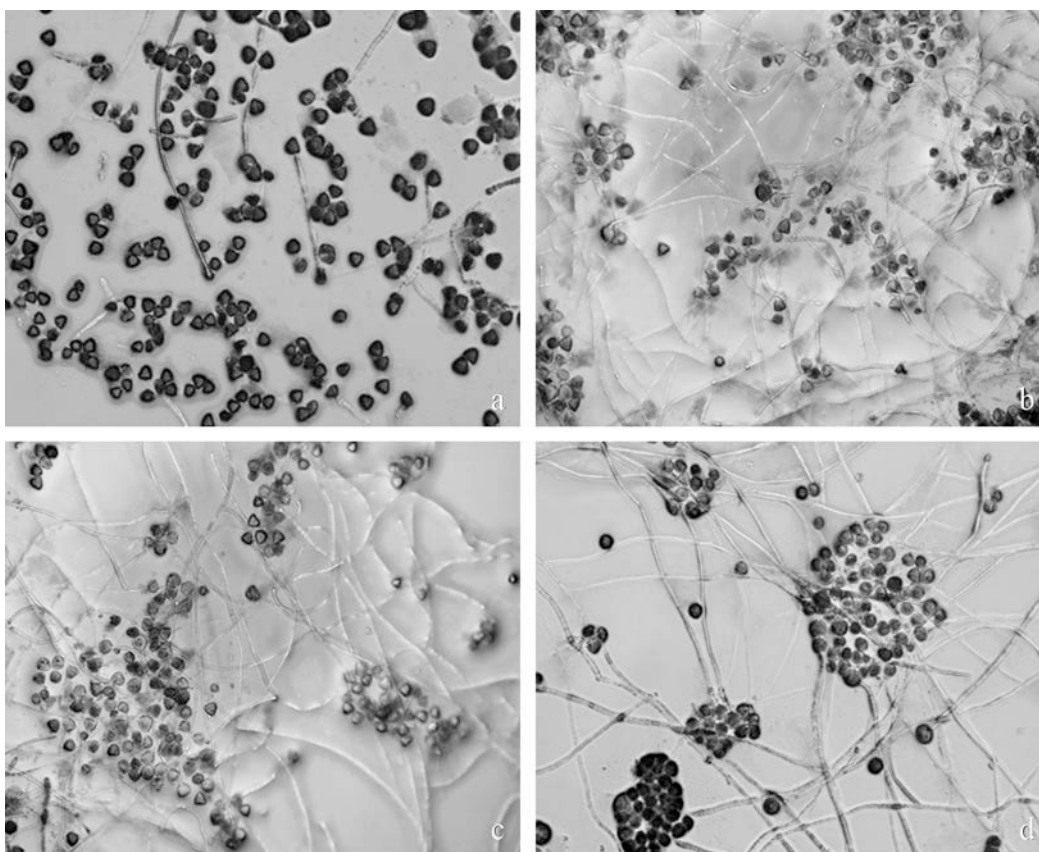
Različita mala slova u koloni pokazuju značajne razlike za $P \leq 0,05$ primenom LSD testa.

Tabela 2. Klijavost polena *in vitro* sorti šljive, koje su korišćene kao oprašivači za sortu Pozna plava, u 2010. i 2011. godini istraživanja.

Faktor	Klijavost polena <i>in vitro</i> (%)		
Sorta (A)	Pozna plava	17,26±5,90 b	
	Čačanska najbolja	42,24±7,34 a	
	Hanita	44,82±10,50 a	
	Presenta	46,48±7,48 a	
Godina (B)	2010.	33,09±11,19 b	
	2011.	42,31±9,92 a	
Interakcija sorta × godina (A × B)	Pozna plava	2010.	12,96±3,46 c
		2011.	21,55±6,22 c
	Čačanska najbolja	2010.	45,26±8,98 ab
		2011.	39,22±5,40 b
	Hanita	2010.	35,07±10,58 b
		2011.	54,56±6,65 a
	Presenta	2010.	39,07±7,92 b
		2011.	53,89±3,21 a
ANOVA			
A	*		
B	*		
A × B	*		

Različita mala slova u kolonama pokazuju značajne razlike za $P \leq 0,05$ primenom LSD testa.

Zvezdice u koloni pokazuju značajne razlike za $P \leq 0,05$ (*) primenom F testa.



Slika 3. Klijavost polena *in vitro* u 2010. godini, sorti šljive:
a) Pozna plava; b) Čačanska najbolja; c) Hanita; d) Presenta.

Analiza varijanse pokazala je statistički značajne efekte interakcije sorta \times godina. Interakcijski efekti ukazuju na postojanje sorte specifičnosti za ispitivani parametar koja se ogleda u sledećem:

- Sorte Hanita i Presenta imaju usaglašenu tendenciju klijavosti polena *in vitro*, koja pokazuje izraženiji rast u 2011. godini. Usaglašena varijacija klijavosti polena *in vitro* se uočava i kod sorte Pozna plava, ali na različitom nivou.
- Interakcijski efekat sorta \times godina kod sorte Čačanska najbolja pokazuje suprotnu tendenciju, u drugoj godini ispitivana klijavost polena pokazuje pad u odnosu na ostale ispitivane sorte. Evidentno je da se interakcijski efekat u smislu suprotnih tendencija ispoljava u drugoj godini istraživanja.

6.2. Morfometrija polena

Analizom polenovih zrna ispitivanih sorti pomoću SEM-a, utvrđeno je da su sva simetrična, izopolarna, trizonokolpatna (sa tri klicine brazde ili kolpe). Kolpe su postavljene meridijalno, duž polenovog zrna i simetrično raspoređene na rastojanju od 120°C u ekvatorijalnoj ravni. Dužina polenovog zrna (polarni prikaz) među ispitivanim sortama se kretala od 53,99 µm kod sorte Hanita do 60,14 µm kod sorte Pozna plava, dok su vrednosti širine polenovog zrna (ekvatorijalni prikaz) bile približnije i kretale su se od 28,22 µm kod sorte Hanita do 29,84 µm kod sorte Čačanska najbolja (Tabela 3).

Tabela 3. Vrednosti morfoloških karakteristika polena ispitivanih sorti šljive.

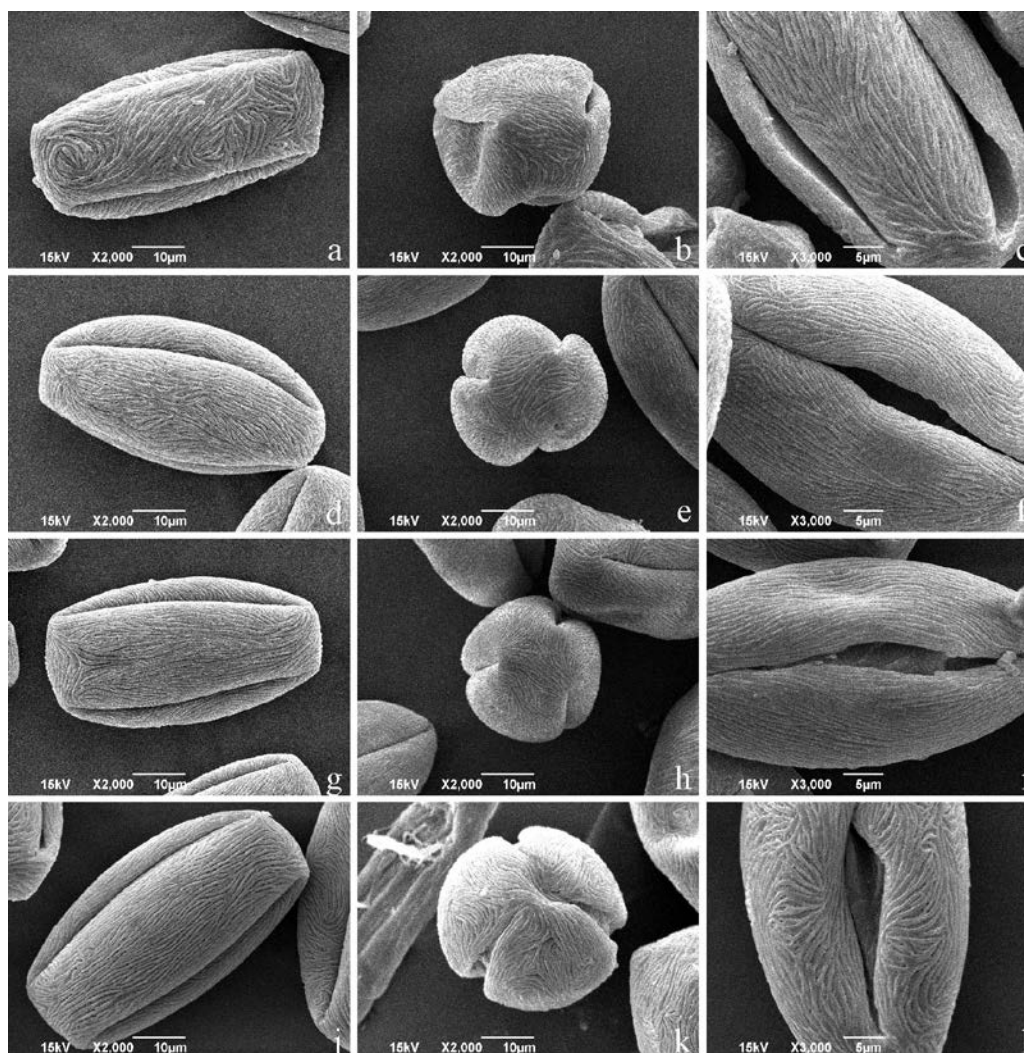
Sorta	Dužina polenovog zrna (µm)	Širina polenovog zrna (µm)	Odnos dužine i širine polenovog zrna	Dužina kolpe (µm)	Širina kolpe (µm)	Širina mezokolpijuma (µm)
Pozna plava	60,14±0,50 a (53,60–64,67)	29,11±0,47 ab (25,47–35,21)	2,06±0,038 a (1,80–2,28)	50,47±0,49 a (43,63–54,81)	2,53±0,16 ns (1,04–3,97)	18,98±0,30 a (15,2–21,50)
Čačanska najbolja	57,66±0,38 b (55,31–62,89)	29,84±0,38 a (24,68–32,69)	1,92±0,020 b (1,69–2,24)	48,54±0,50 b (42,88–53,09)	2,42±0,12 ns (1,10–3,77)	16,82±0,75b c (9,49–24,10)
Hanita	53,99±0,27 c (51,47–56,92)	28,22±0,30 b (24,91–31,92)	1,92±0,021 b (1,75–2,33)	44,93±0,38 d (40,58–48,52)	2,18±0,14 ns (1,07–3,67)	15,84±0,65 c (11,10–24,33)
Presenta	58,42±0,49 b (55,17–63,07)	29,59±0,29 a (28,04–32,93)	1,98±0,019 ab (1,75–2,18)	49,77±0,53 c (44,14–56,70)	2,25±0,19 ns (0,95–5,13)	17,79±0,52 ab (11,93–21,84)

Različita mala slova u kolonama pokazuju značajne razlike za $P \leq 0,05$ primenom LSD testa.

U polarnom prikazu oblik polena kod ispitivanih sorti je trouglasto-tupkonveksan, dok je u ekvatorijalnom prikazu eliptično-zašiljen (Slika 4).

Vrednosti odnosa dužina/širina polenovog zrna su se kretale od 1,92 (Čačanska najbolja i Hanita) do 2,06 µm (Pozna plava). Najveća dužina (50,47 µm) i širina (2,53 µm) kolpe polenovog zrna kao i širina mezokolpijuma (18,98 µm) je utvrđena kod sorte Pozna plava, dok su najniže vrednosti dobijene kod sorte Hanita (44,93 µm, 2,18 µm i 18,84 µm). Dužina kolpi je od 82% do 85% dužine polenovog zrna.

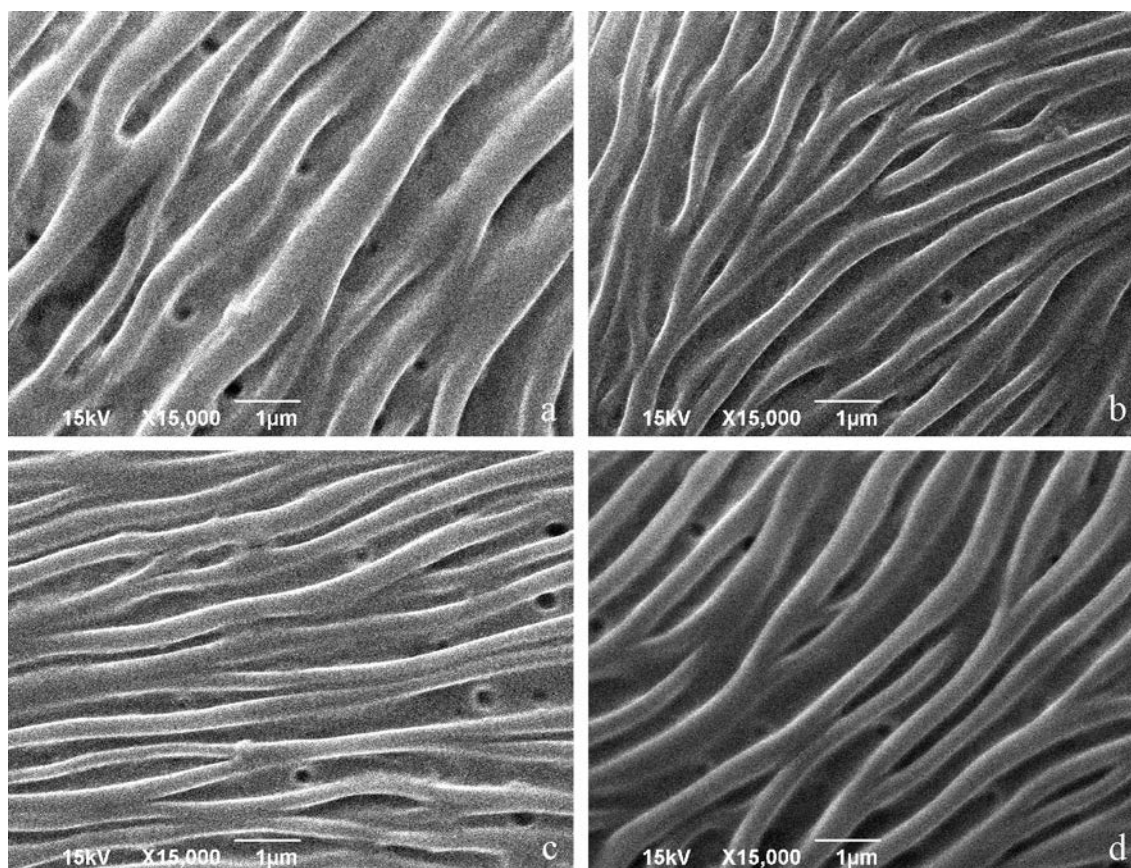
Vrednosti ispitivanih parametara ornamentike egzine (širina grebena, širina brazde, broj grebena na 100 µm² ekvatorijalnog područja) prikazani su u Tabeli 4.



Slika 4. Polarni, ekvatorijalni prikaz i izgled kolpe polenovog zrna ispitivanih sorti šljive: a–c) Pozna plava; d–f) Čačanska najbolja; g–i) Hanita; j–l) Presenta.

Tabela 4. Karakteristike ornamentike egzine ispitivanih sorti šljive.

Sorta	Širina grebena (µm)	Širina brazde (µm)	Broj grebena na 100 µm ² egzine
Pozna plava	0,63±0,014 a (0,47–0,75)	0,55±0,015 a (0,37–0,75)	10,33±0,38 c (8–13)
Čačanska najbolja	0,49±0,011 b (0,40–0,61)	0,44±0,008 b (0,35–0,54)	14,33±0,44 b (11–16)
Hanita	0,39±0,007 c (0,33–0,45)	0,34±0,009 c (0,26–0,45)	16,66±0,09 a (16–17)
Presenta	0,43±0,01 d (0,32–0,58)	0,34±0,01 c (0,23–0,42)	16,33±0,17 a (15–17)



Slika 5. Ornamentika egzine ispitivanih sorti šljive:

a) Pozna plava; b) Čačanska najbolja; c) Hanita; d) Presenta.

Razlike u širini grebena kod ispitivanih sorti su bile značajne i kretale su se od $0,39 \mu\text{m}$ (Hanita) do $0,63 \mu\text{m}$ (Pozna plava). Takođe je utvrđena značajna razlika i u širini brazde, koja se kretala od $0,34 \mu\text{m}$ kod sorte Hanita do $0,55 \mu\text{m}$ kod sorte Pozna plava. Prosečan broj grebena na $100 \mu\text{m}^2$ ekvatorijalnog područja se kretao od 10,33 (Pozna plava) do 16,66 (Hanita). Skulptura egzine, na osnovu analizirane ornamentike (brazda ili mura) kod sve četiri ispitivane sorte je strijatna. Grebeni i brazde su manje ili više paralelni sa kolpama i pokrivaju celu površinu polenovog zrna (Slika 5). U predelu polova ili oko kolpi grebeni i brazde formiraju petlje ili krivulje koje su najviše izražene kod polena sorte Pozna plava i Presenta. Kod svih sorti uočeno je prisustvo manjeg ili većeg broja perforacija unutar brazdi.

Izuzev širine polenovog zrna, ostale ispitivane morfološke karakteristike polena su imale najveće vrednosti kod sorte Pozna plava. Kod sorte Hanita su utvrđene najmanje vrednosti svih ispitivanih morfoloških karakteristika polenovog zrna. Takođe,

i kod ispitivanja parametara ornamentike egzine, izuzev broja grebena na 100 μm^2 ekvatorijalnog područja, najveće vrednosti su uočene kod sorte Pozna plava. Kod sorte Hanita je utvrđen najveći broj grebena na 100 μm^2 ekvatorijalnog područja, nasuprot najnižim vrednostima ostalih ispitivanih parametara ornamentike egzine.

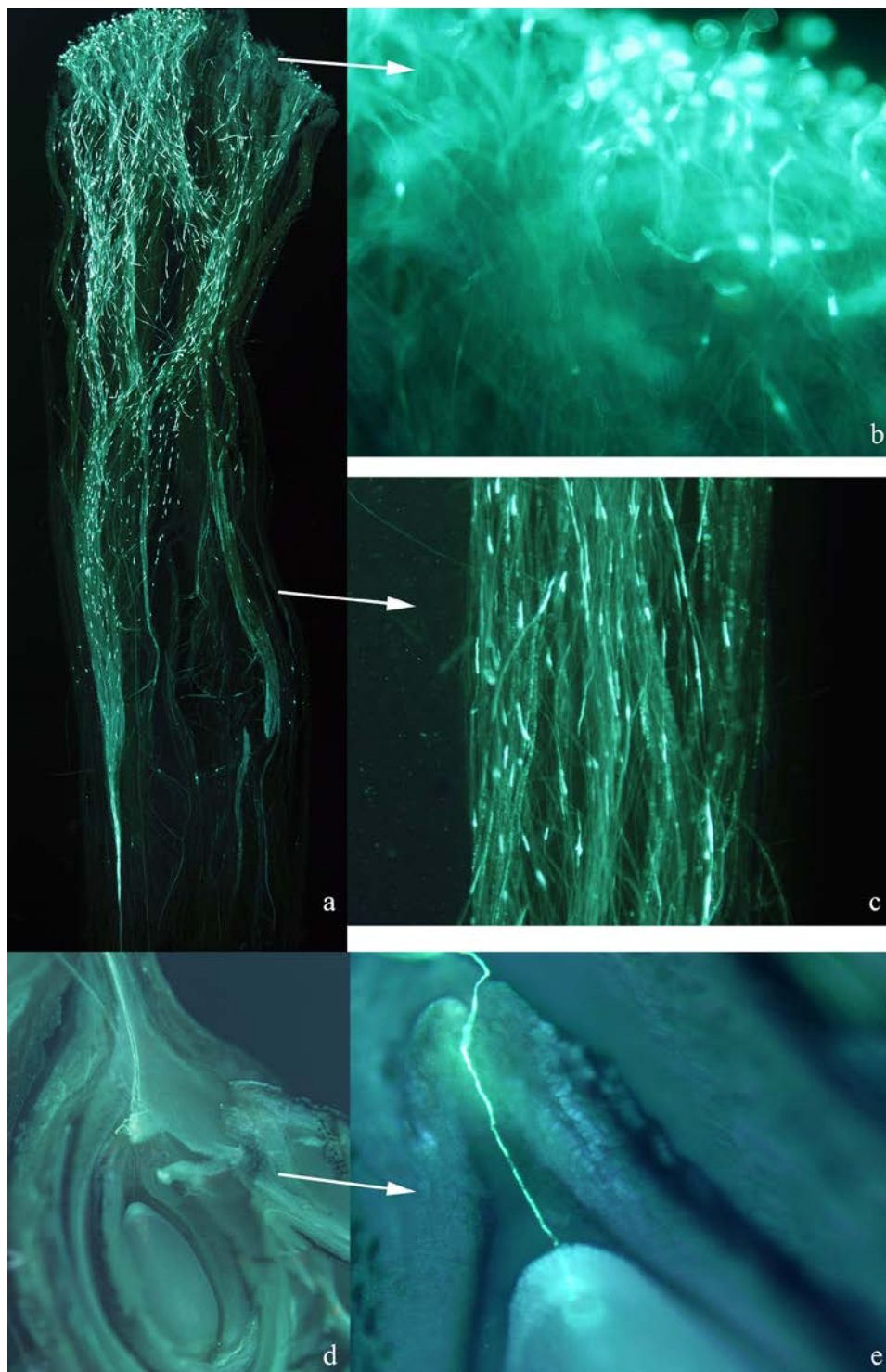
6.3. Dinamika rasta polenovih cevčica *in vivo*

Na uzdužnom preseku stubića, kod šljive kao i kod drugih predstavnika roda *Prunus*, provodno tkivo ima izgled kanala, sa širim krajem na vrhu stubića (žig), koji se postepeno sužava ka bazi stubića (Slika 6a). Adhezija polena na žig tučka se brzo uspostavlja, visoko je selektivna, pri čemu tu značajnu ulogu imaju površina polenovog zrna i ekstracelularni matriks žiga. Prvi korak u klijavosti polena je njegova hidratacija. Komponente žiga i polen regulišu kretanje vode od žiga ka polenu. Fiziološka aktivacija polena zajedno sa hidratacijom rezultira u prelasku sadržaja zrna u cevčicu, što se označava kao momenat klijavosti ili formiranja polenove cevčice na žigu tučka (Slika 6b).

Rast polenovih cevčica u provodnom tkivu stubića je ekstracelularan, mada može biti i intracelularan, tj. kroz slojeve zida (Slika 6c). Čelije provodnog tkiva su izdužene, sa širokim ćelijskim zidovima i velikim intercelularnim prostorima. Na putu ka embrionovoj kesici, polenova cevčica prolazi kroz različita tkiva u tučku, i brzina rasta polenovih cevčica je veća u stubiću nego u plodniku.

U plodniku se nalaze dva semena zametka i oplodjenje jednog od njih je neophodno za zametanje plodova (Slika 6d). Semeni zameci predstavnika roda *Prunus* su krasinucelatni i bitegmni *Polygonum* tipa. Dva semena zametka prisutna u plodniku približno su iste veličine do početka punog cvetanja. Kasnije jedan od njih (sekundarni) počinje da degeneriše, a drugi (primarni) nastavlja sa svojim rastom u lokuli plodnika.

Polenova cevčica nakon dospevanja u plodnik raste po površini ćelija placente usmerena od strane njihovih sekretornih produkata. Obturator koji predstavlja protuberancu karpelarnog zida plodnika čini vezu između egzostome semenog zametka i placente. Rast polenovih cevčica u obturatoru je po njegovoj površini, a nekad i kroz njegove ćelije.



Slika 6. Rast polenovih cevčica u tučku šljive Pozna plava u varijanti stranooprašivanja sa sortom Hanita, desetog dana od oprašivanja: a) izgled levkastog provodnog kanala u tučku sa polenovim cevčicama; b) klijala polenova zrna na žigu; c) polenove cevčice u stubiću; d) rast polenovih cevčica u plodniku; e) prodor polenove cevčice u nucelus semenog zametka.

Semeni zameci se sastoje iz dva sloja integumenta. Unutrašnji sloj integumenta naleže direktno na nucelus i u mikropilarnom delu formira otvor mikropilu. Spoljašnji sloj integumenta se nastavlja na unutrašnji i on takođe formira otvor na mikropilarnom kraju, egzostomu.

Nakon prolaska kroz mikropilu polenova cevčica prodire u ženski gametofit kroz jednu od sinergida (Slika 6e). Nakon dospevanja u jednu od sinergida polenova cevčica prestaje sa daljim rastom, puca i oslobađa dva spermatična jedra.

Kvantitativna efikasnost rasta polenovih cevčica u stubiću i plodniku, za svaku varijantu oprašivanja, ispitivana je utvrđivanjem prosečnog broja polenovih cevčica i dinamikom rasta polenovih cevčica u određenim regionima tučka. Prebrojavanje polenovih cevčica u stubiću rađeno je u gornjoj trećini, a u plodniku u regionu placente. U svim varijantama oprašivanja, broj polenovih cevčica iz pet termina fiksiranja je prikazan u tabeli kao prosečna vrednost. Dinamika rasta polenovih cevčica predstavljena je kao broj tučkova u kojima je konstatovana najduža polenova cevčica.

6.3.1. Prosečan broj polenovih cevčica u stubiću i plodniku

Posmatrajući dobijene vrednosti prosečnog broja polenovih cevčica, za sve tri godine ispitivanja, najveće vrednosti u stubiću i u plodniku su dobijene u varijanti stranooprašivanja. Niže vrednosti su dobijene u varijanti samooprašivanja, dok se kao najslabija pokazala varijanta slobodnog oprašivanja (Tabele 5 i 6).

U 2008. godini ispitivanja, najveći prosečan broj polenovih cevčica u stubiću i u plodniku, je utvrđen u varijanti stranooprašivanja sortom Hanita kao oprašivačem (50,55 i 2,87). Najmanji prosečan broj polenovih cevčica u stubiću je dobijen u varijanti slobodnog oprašivanja (23,91), a u plodniku u varijanti samooprašivanja (2,11) (Tabela 5).

Kao i u 2008. godini istraživanja i u druge dve godine najveći prosečan broj polenovih cevčica u gornjoj trećini stubića (61,15) i u plodniku (3,15) je utvrđen u stranooprašivanju sortom Hanita (Tabela 6), dok je najmanji prosečan broj uočen u varijanti slobodnog oprašivanja (17,94 i 1,33).

Tabela 5. Prosečan broj polenovih cevčica u određenim regionima tučka sorte šljive Pozna plava, u 2008. godini ispitivanja.

Varijanta oprašivanja	Stubić	Plodnik
Pozna plava	27,04±0,42 c	2,11±0,02 d
Čačanska najbolja	39,76±0,40 b	2,73±0,05 b
Hanita	50,55±0,16 a	2,87±0,01 a
Slobodno oprašivanje	23,91±0,97 d	2,39±0,03 c

Različita mala slova u kolonama pokazuju značajne razlike za $P \leq 0,05$ primenom LSD testa.

Tabela 6. Prosečan broj polenovih cevčica u određenim regionima tučka sorte šljive Pozna plava, u 2010. i 2011. godini ispitivanja.

Faktor		Stubić	Plodnik	
Oprašivač (A)	Pozna plava	29,94±1,25 d	1,99±0,09 d	
	Čačanska najbolja	37,82±0,86 c	2,44±0,10 c	
	Hanita	61,15±0,93 a	3,15±0,19 a	
	Presenta	48,43±1,24 b	2,60±0,20 b	
	Slobodno oprašivanje	19,74±1,64 e	1,33±0,11 e	
Godina (B)	2010.	39,73±4,18 ns	2,45±0,23 a	
	2011.	39,10±3,62 ns	2,16±0,11 b	
Interakcija oprašivač × godina (A × B)	Pozna plava	2010.	32,73±0,09 g	1,82±0,03 e
		2011.	27,15±0,20 h	2,17±0,08 d
	Čačanska najbolja	2010.	39,73±0,11 e	2,65±0,04 c
		2011.	35,91±0,11 f	2,23±0,06 d
	Hanita	2010.	63,21±0,10 a	3,56±0,04 a
		2011.	59,09±0,14 b	2,73±0,06 c
	Presenta	2010.	46,91±2,31 d	3,05±0,04 b
		2011.	49,91±0,14 c	2,16±0,06 d
	Slobodno oprašivanje	2010.	16,09±0,03 i	1,17±0,17 g
		2011.	23,39±0,19 j	1,50±0,06 f
	ANOVA			
	A		*	*
B		ns	*	
A × B		*	*	

Različita mala slova u kolonama pokazuju značajne razlike za $P \leq 0,05$ primenom LSD testa.

Zvezdice u kolonama pokazuju značajne razlike za $P \leq 0,05$ (*) primenom F testa.

Kod svih varijanti oprašivanja, u godinama ispitivanja, drastično manji broj polenovih cevčica je prodro u plodnik (preko deset puta), u odnosu na broj utvrđen u

gornjoj trećini stubića. U 2008. godini, u varijantama stranooprašivanja sortama Hanita i Čačanska najbolja sa kojima je utvrđen najveći broj polenovih cevčica u gornjoj trećini stubića, utvrđeno je i najveće smanjenje u broju istih prodljih u plodnik (18 i 15 puta). U varijantama slobodnog oprašivanja i samooprašivanju 10 i 12 puta je manje polenovih cevčica prodrlo u plodnik u odnosu na njihov broj utvrđen u gornjoj trećini stubića.

U 2010. i 2011. godini najmanji broj polenovih cevčica prodrlih u plodnik bilo je u varijanti stranooprašivanja. Kod sorti Hanita i Presenta 19 puta je manje prodrlo polenovih cevčica u plodnik, dok je kod sorte Čačanska najbolja njihov broj za 16 puta bio manji. U 2010. i 2011. godini u odnosu na 2008. godinu u varijantama samooprašivanja i slobodnog oprašivanja do 15 puta je bio manji broj polenovih cevčica prodrlih u plodnik u odnosu na broj utvrđen u gornjoj trećini stubića.

Analizirano po godinama istraživanja, u ispitivanim varijantama oprašivanja, nije bilo većeg odstupanja u prosečnom broju polenovih cevčica. U varijanti samooprašivanja prosečan broj polenovih cevčica u gornjoj trećini stubića je bio vrlo ujednačen i kretao se od 27,04 do 32,73. U varijanti stranooprašivanja, u trogodišnjem periodu ispitivanja, takođe su dobijene približno iste vrednosti prosečnog broja polenovih cevčica u gornjoj trećini stubića. U varijanti oprašivanja sortom Čačanska najbolja prosečan broj polenovih cevčica se kretao od 35,91 do 39,73, sortom Hanita od 59,09 do 63,21, a sortom Presenta od 46,91 do 49,91. Mada je u varijanti slobodnog oprašivanja utvrđen najmanji prosečan broj polenovih cevčica u stubiću, dobijene vrednosti su bile približno ujednačene u godinama ispitivanja (16,09–23,39). Analiza dobijenih rezultata za prosečan broj polenovih cevčica prodrlih u plodnik je pokazala postojanje linearnog trenda rasta u odnosu na broj polenovih cevčica utvrđenih u gornjoj trećini stubića.

Značajnost interakcijskih efekata pokazuje da ima odstupanja od ispoljenih osnovnih zakonitosti. Analiza varijanse za prosečan broj polenovih cevčica u stubiću i plodniku pokazala je statistički značajne efekte interakcije oprašivač \times godina.

Analiza interakcijskog efekta za prosečan broj polenovih cevčica u gornjoj trećini stubića sorte šljive Pozna plava je pokazala da je došlo do odstupanja od osnovnih zakonitosti u 2011. godini. U varijanti samooprašivanja i stranooprašivanja sortama Hanita i Čačanska najbolja utvrđen je manji prosečan broj polenovih cevčica, a

u varijantama slobodnog oprašivanja i stranooprašivanja sortom Presenta uočen je veći prosečan broj polenovih cevčica.

Analiza interakcijskog efekta oprašivač \times godina za prosečan broj polenovih cevčica u plodniku pokazuje da je došlo do odstupanja od osnovnih tendencija u 2011. godini kada se kod svih korišćenih oprašivača uočava smanjenje u broju prodrlih polenovih cevčica u plodnik, dok se kod samooprašivanja i slobodnog oprašivanja konstatuje veći broj polenovih cevčica prodrlih u plodnik.

6.3.2. Dinamika rasta polenovih cevčica u tučku

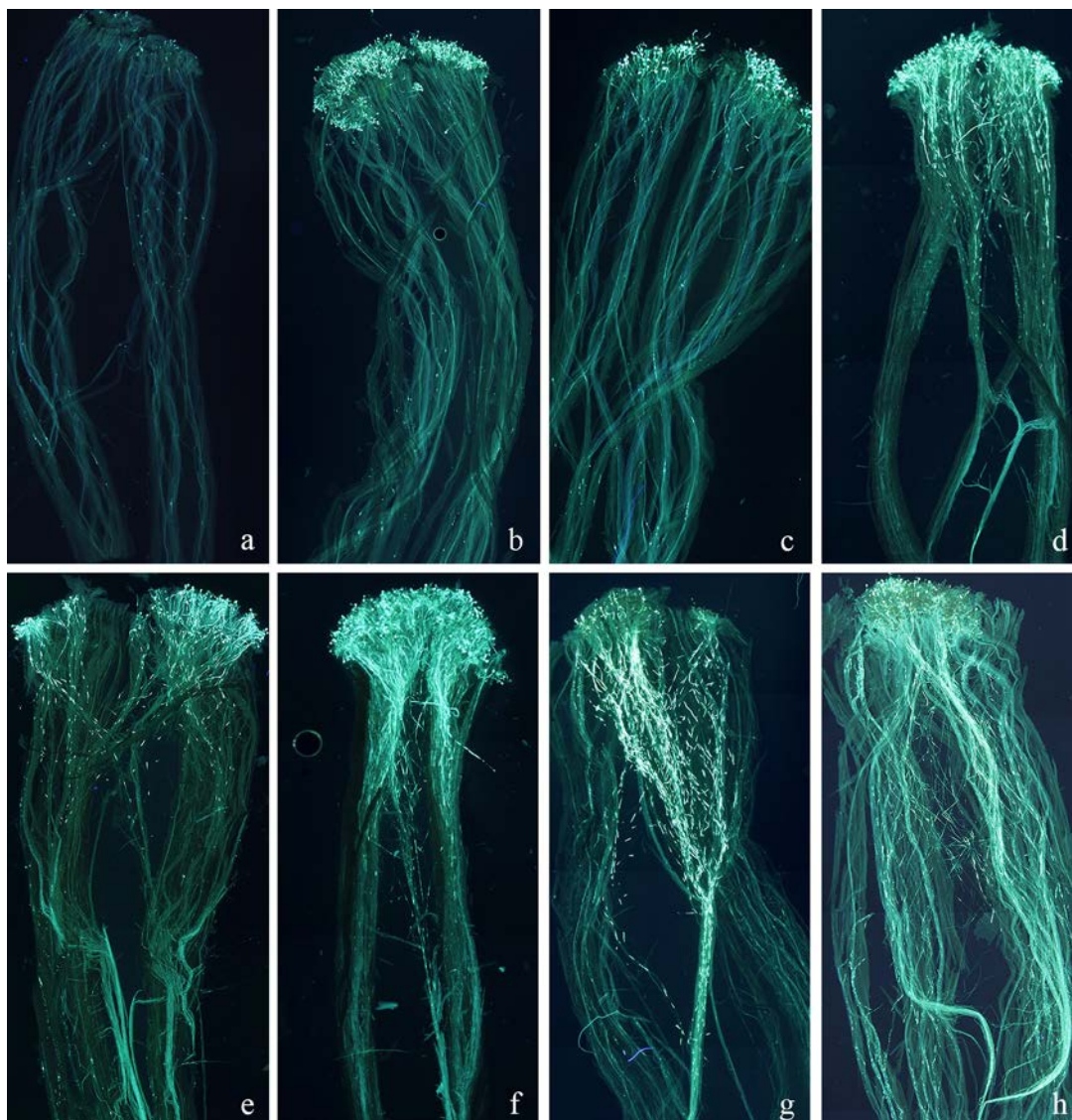
Dinamika rasta polenovih cevčica kroz određene regione stubića i plodnika, predstavljena je brojem tučkova sa prodorom najduže polenove cevčice u pojedine regione stubića i plodnika. Analiza dinamike rasta polenovih cevčica rađena je u svim terminima fiksiranja, kod svih ispitivanih varijanti oprašivanja (Slika 7 a–h i Slika 8 a–c). Posmatrajući rezultate iz trogodišnjeg perioda najduži rast polenovih cevčica dobijen je u varijanti stranooprašivanja, a najslabiji rast je bio u varijanti slobodnog oprašivanja (Grafikon 4).

U 2008. godini ispitivanja najduži rast polenovih cevčica do osmog dana od momenta oprašivanja je dobijen u varijanti sa sortom Hanita. Desetog dana od oprašivanja najduži rast polenovih cevčica u 56,67% tučkova je utvrđen u varijanti oprašivanja sortom Čačanska najbolja. U istoj godini najmanji rast polenovih cevčica u danima ispitivanja je bio ili kod slobodnog oprašivanja ili kod samooprašivanja, da bi zaključno sa desetim danom bilo najslabiji kod samooprašivanja.

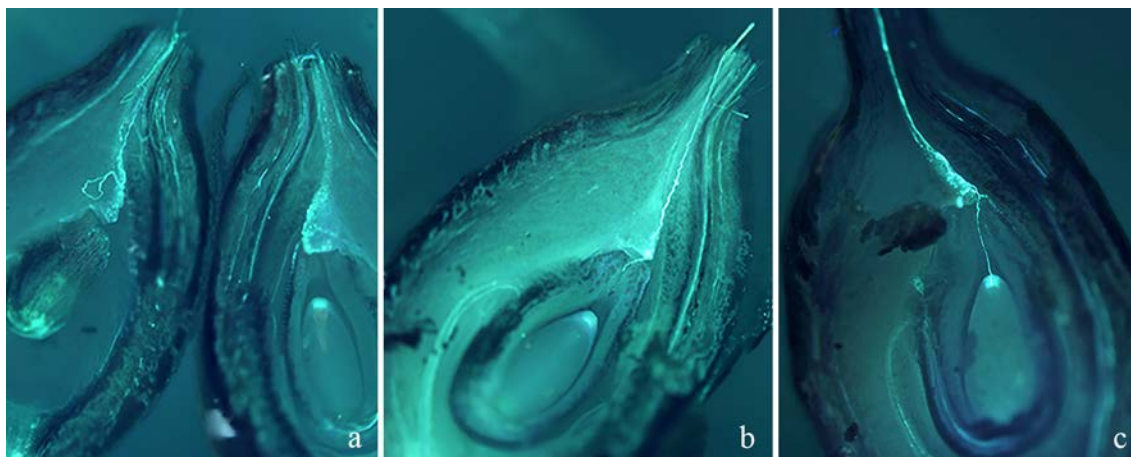
U 2010. godini ispitivanja najduži rast polenovih cevčica, u prvih šest dana nakon oprašivanja, je utvrđen u varijanti sa sortom Presenta (50,00% tučkova sa prodorom polenove cevčice u tkivo plodnika). Osmog i desetog dana od oprašivanja najduži rast polenovih cevčica je utvrđen u varijanti oprašivanja sortom Hanita (36,67% i 48,17% tučkova sa prodorom polenove cevčice u nucelus). Najslabiji rast polenovih cevčica u svim danima ispitivanja u 2010. godini je dobijen u varijanti slobodnog oprašivanja.

Najduži rast polenovih cevčica u 2011. godini, izuzev šestog dana od oprašivanja, u ostalim terminima je utvrđen u varijanti oprašivanja sortom Hanita (28,57% tučkova sa prodorom polenove cevčice u tkivo plodnika, desetog dana od

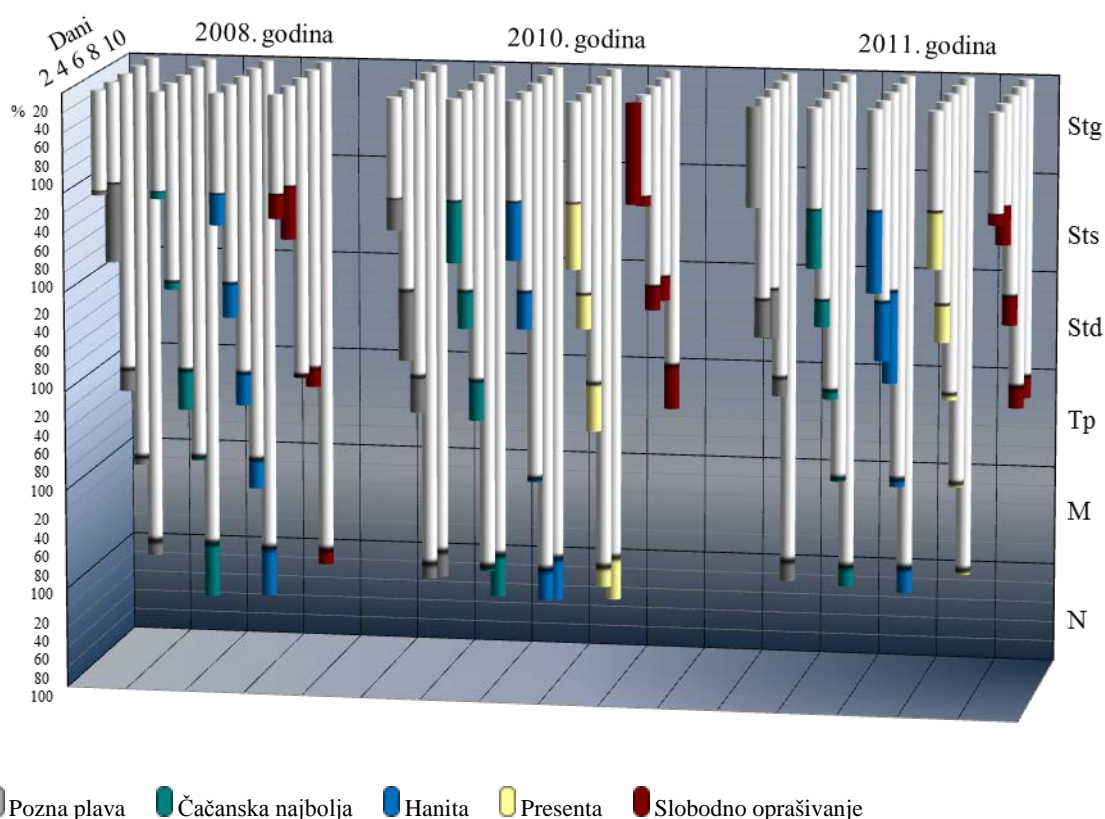
momenta oprašivanja). Slično kao u i 2008. godini ispitivanja, najslabiji rast polenovih cevčica je utvrđen ili kod slobodnog oprašivanja ili kod samooprašivanja, da bi desetog dana bila najslabija kod slobodnog oprašivanja.



Slika 7. Rast polenovih cevčica analiziranih varijanti oprašivanja u stubiću šljive Pozna plava: a–b) drugog dana nakon oprašivanja; c–e) četvrtog dana nakon oprašivanja; f) šestog dana nakon oprašivanja; g) osmog dana nakon oprašivanja; h) desetog dana nakon oprašivanja.



Slika 8. Prozor polenovih cevčica u određene regione plodnika šljive Pozna plava: a) zona obturatora (varijanta samooprašivanja); b) mikropila (oprašivanje sortom Hanita); c) nucelus semenog zametka (oprašivanje sortom Presenta).



Grafikon 4. Dinamika rasta polenovih cevčica u određenim regionima tučka sorte šljive Pozna plava, u ispitivanim varijantama oprašivanja, tokom trogodišnjeg perioda (Stg, Sts i Std – gornja, srednja i donja trećina stubića; Tp – tkivo plodnika; M – mikropila; N – nucelus).

Rast polenovih cevčica u varijanti samooprašivanja u ispitivanim terminima se kretao od 100% u 1/3 stubića (drugog dana od oprašivanja) do 28,00% prodora u nucelus (desetog dana od oprašivanja) u 2011. i 2010. godini istraživanja. Dinamika rasta polenovih cevčica kroz određene regione tučka u varijanti samooprašivanja u sve tri godine ispitivanja je bila približno ujednačena i broj tučkova sa prodorom najduže polenove cevčice u nucelus semenog zametka, desetog dana od oprašivanja, iznosio je od 15,79% do 28,00%.

U sve tri godine ispitivanja, u varijanti oprašivanja sortom Čačanska najbolja u ispitivanim terminima, prodor polenovih cevčica se konstatovao u zoni od 2/3 stubića (drugog dana od oprašivanja) do prodora u nucelus (desetog dana od oprašivanja). Trend rasta polenovih cevčica se kretao od 58,82% u 2/3 stubića do 56,6% tučkova sa prodorom polenovih cevčica u nucelus semenog zametka (2011. i 2008. godina ispitivanja). Rast polenovih cevčica u tučku u godinama ispitivanja u prve dve godine istraživanja i u trećoj godini do osmog dana je bio približno ujednačen (46,67% i 56,67% tučkova sa prodorom polenove cevčice u nucelus). U 2011. godini je utvrđen dva puta manji prodor polenovih cevčica u nucelus semenog zametka u odnosu na broj konstatovan u prve dve godine.

Kod varijante oprašivanja sortom Hanita, u ispitivanim terminima, u trogodišnjem periodu, dinamika rasta polenovih cevčica kretala se od 81,82% u 2/3 stubića, drugog dana od oprašivanja u 2011. godini ispitivanja, do 53,85% tučkova sa prodorom polenovih cevčica u nucelus semenog zametka, desetog dana u 2008. godini. Isto kao i u varijanti oprašivanja sortom Čačanska najbolja, i u ovoj varijanti dinamika rasta polenovih cevčica kroz određene regione tučka u prve dve godine istraživanja i u trećoj do osmog dana je bila približno ujednačena. U trećoj godini i u ovoj varijanti oprašivanja je uočen dva puta manji prodor polenovih cevčica u nucelus semenog zametka u odnosu na broj utvrđen u prve dve godine ispitivanja.

Utvrđena tendencija rasta polenovih cevčica sorte Presenta, je bila slična rastu polenovih cevčica utvrđenom kod ostalih sorti iz varijante stranooprašivanja. Dinamika rasta polenovih cevčica se kretala od 66,66% tučkova sa prodorom polenove cevčice u 2/3 stubića, drugog dana od oprašivanja u 2008. godini, do 45,45% tučkova sa prodorom polenove cevčice u nucelus, desetog dana od oprašivanja u istoj godini. U 2011. godini, dinamika rasta polenovih cevčica u prva četiri dana od oprašivanja je bila

približno ista kao u 2010. godini, da bi u danima posle bila znatno slabija. Broj tučkova sa prodorom polenove cevčice u nucelus semenog zametka, desetog dana od oprašivanja je bio pet puta manji u odnosu na broj uočen u 2010. godini.

U varijanti slobodnog oprašivanja rast polenovih cevčica kretao se od 100% u 1/3 stubića (drugog dana od oprašivanja) do prodora u nucelus u 19,23% tučkova (desetog dana od oprašivanja) (2011. i 2008. godina ispitivanja). Samo je u 2008. godini ispitivanja desetog dana od oprašivanja uočen prodor polenovih cevčica u nucelus semenog zametka, dok je u 2010. i 2011. godini, u istom terminu fiksiranja, najduža polenova cevčica utvrđena u tkivu plodnika.

Posmatrano po godinama ispitivanja, najbolja dinamika rasta polenovih cevčica desetog dana od oprašivanja je dobijena u varijanti stranooprašivanja i to: u 2008. godini sa sortom Čačanska najbolja (Tabela 7), u 2010. i 2011. godini sa sortom Hanita (Tabela 8).

Značajnost interakcijskih efekata pokazuje da ima odstupanja od ispoljenih osnovnih zakonitosti. Analiza varijanse za prodor polenovih cevčica u nucelus desetog dana od oprašivanja je pokazala statistički značajne interakcijske efekte oprašivač × godina. Analiza interakcijskih efekata pokazuje da je i kod ovog parametra došlo do odstupanja od osnovnih tendencija u 2011. godini.

Izuzev varijante slobodnog oprašivanja kod koje nije uočen prodor polenove cevčice u nucelus semenog zametka, kod ostalih varijanti oprašivanja dolazi do drastičnog smanjenja u broju polenovih cevčica prodrlih u nucelus semenog zametka u 2011. godini u odnosu na 2010. godinu ispitivanja. To smanjenje je bilo najevidentnije u varijanti stranooprašivanja sortom Presenta.

Tabela 7. Prodor polenovih cevčica u nucelus semenog zametka desetog dana od oprašivanja, u 2008. godini istraživanja.

Varijanta oprašivanja	Broj tučkova sa prodorom polenove cevčice u nucelus semenog zametka (%)
Pozna plava	15,79±0,56 b
Čačanska najbolja	56,67±1,92 a
Hanita	53,85±2,00 a
Slobodno oprašivanje	19,23±2,24 b

Različita mala slova u kolonama pokazuju značajne razlike za $P \leq 0,05$ primenom LSD testa.

Tabela 8. Prodor polenovih cevčica u nucelus semenog zametka, desetog dana od oprašivanja, u 2010. i 2011. godini istraživanja.

Faktor		Broj tučkova sa prodorom polenove cevčice u nucelus semenog zametka (%)	
Oprašivač (A)	Pozna plava	24,00±1,46 b	
	Čačanska najbolja	35,15±3,90 a	
	Hanita	38,37±2,78 a	
	Presenta	26,57±5,90 b	
	Slobodno oprašivanje	0,00±0,00 c	
Godina (B)	2010.	33,65±4,51 a	
	2011.	15,98±3,21 b	
Interakcija oprašivač × godina (A × B)	Pozna plava	2010.	28,00±1,89 bc
		2011.	20,00±0,20 c
	Čačanska najbolja	2010.	46,67±1,92 a
		2011.	23,63±4,52 bc
	Hanita	2010.	48,15±2,16 a
		2011.	28,57±0,02 b
	Presenta	2010.	45,45±1,32 a
		2011.	7,69±0,44 d
	Slobodno oprašivanje	2010.	0,00±0,00 e
		2011.	0,00±0,00 f
ANOVA			
A		*	
B		*	
A × B		*	

Različita mala slova u kolonama pokazuju značajne razlike za $P \leq 0,05$ primenom LSD testa.

Zvezdice u kolonama pokazuju značajne razlike za $P \leq 0,05$ (*) primenom F testa.

6.3.3. Korelaciona analiza klijavosti polena *in vitro* i broja polenovih cevčica u određenim regionima tučka

Da bi se utvrdilo postojanje povezanosti između klijavosti polena *in vitro* i *in vivo* korišćen je statistički metod jednačine regresije i koeficijenta korelacije, kao osnovnih pokazatelja korelacionih veza.

Vrednost Pirsonovog koeficijenta korelacije između broja polenovih cevčica u gornjoj trećini stubića i broja istih prodrlih u plodnik od 0,76 ukazuje da se radi o visokoj pozitivnoj korelaciji. Takođe, između broja polenovih cevčica u plodniku i broja polenovih cevčica prodrlih u nucelus semenog zametka, desetog dana od oprašivanja, utvrđena je visoka pozitivna korelacija (0,72) (Tabela 9).

Tabela 9. Pirsonov koeficijent korelacije između klijavosti polena *in vitro*, broja polenovih cevčica u tučku i prodora polenovih cevčica u nucelus.

Osobina		Kp	Pcs	Pcp	Pcn
Kp	Pirsonov koeficijent p – vrednost	1,00 p=----			
Pcs	Pirsonov koeficijent p – vrednost	0,58 p=0,060	1,00 p=----		
Pcp	Pirsonov koeficijent p – vrednost	0,43 p=0,185	0,76* p=0,006	1,00 p=----	
Pcn	Pirsonov koeficijent p – vrednost	0,21 p=0,533	0,34 p=0,300	0,72 p=0,012	1,00 p=----

Kp – klijavost polena *in vitro*; Pcs – broj polenovih cevčica u gornjoj trećini stubića; Pcp – broj polenovih cevčica u plodniku; Pcn – broj polenovih cevčica prodrlih u nucelus semenog zametka

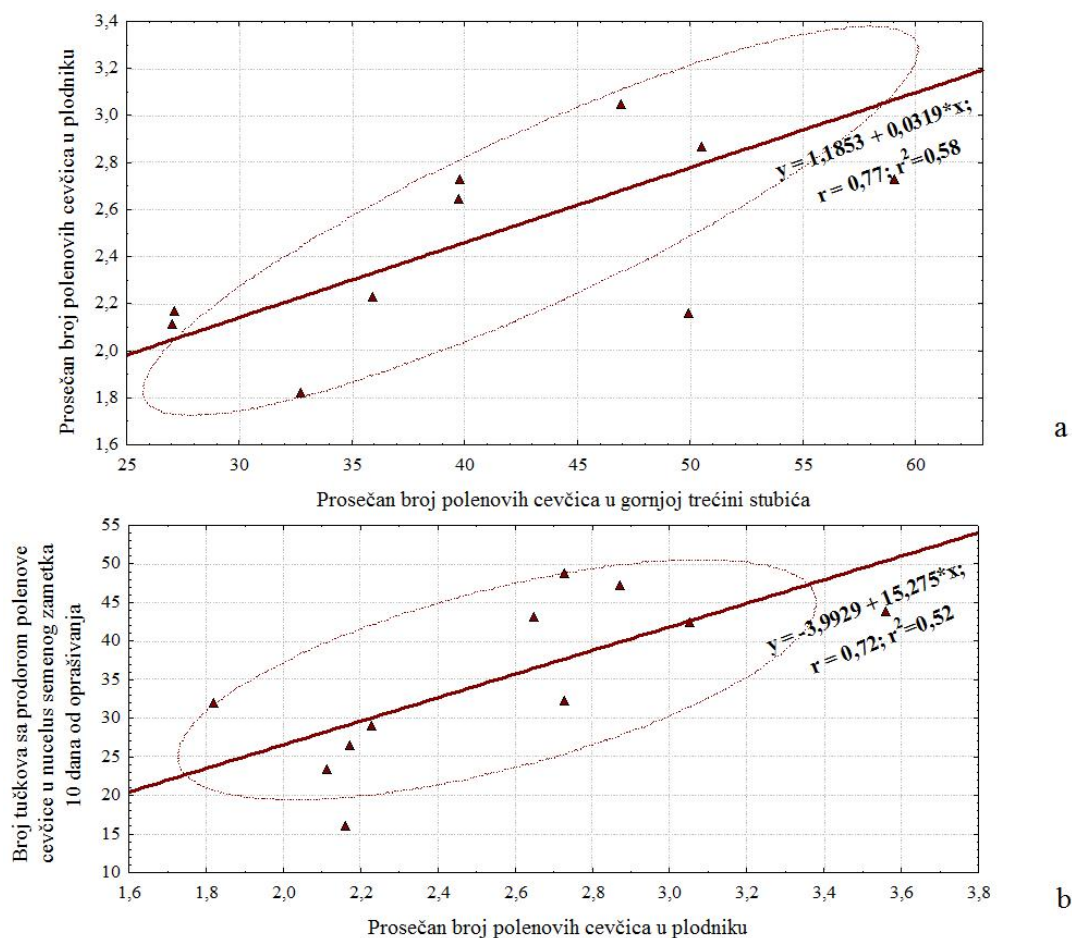
*Označene vrednosti su značajne na nivou $P < 0,05$.

Na Grafikonu 6. prikazan je dijagram rasprostiranja vrednosti broja polenovih cevčica u gornjoj trećini stubića, broja istih prodrlih u plodnik kao i broja polenovih cevčica u plodniku i broja prodrlih u nucelus semenog zametka, desetog dana od oprašivanja, sa prikazanom regresionom linijom i jednačinom linearne regresije.

Vrednost Pirsonovog koeficijenta ukazuje o jačini veze ispitivanih parametara. Međutim, pomoću njega se ne može dobiti siguran podatak koliko je broj polenovih cevčica prodrlih u plodnik uslovljen brojem polenovih cevčica u gornjoj trećini stubića. Isto tako kao i to koliko je broj polenovih cevčica prodrlih u nucelus semenog zametka uslovljen brojem polenovih cevčica prodrlih u plodnik.

Koeficijent determinacije na osnovu dobijenog Pirsonovog koeficijenta korelacije za prosečan broj polenovih cevčica prodrlih u plodnik u odnosu na broj polenovih cevčica u gornjoj trećini stubića je iznosio 0,58. To znači da je 58% dobijene vrednosti broja polenovih cevčica prodrlih u plodnik je određeno brojem polenovih cevčica u gornjoj trećini stubića, dok ostatak do 100% čini uticaj ostalih faktora (koeficijent alijentacije).

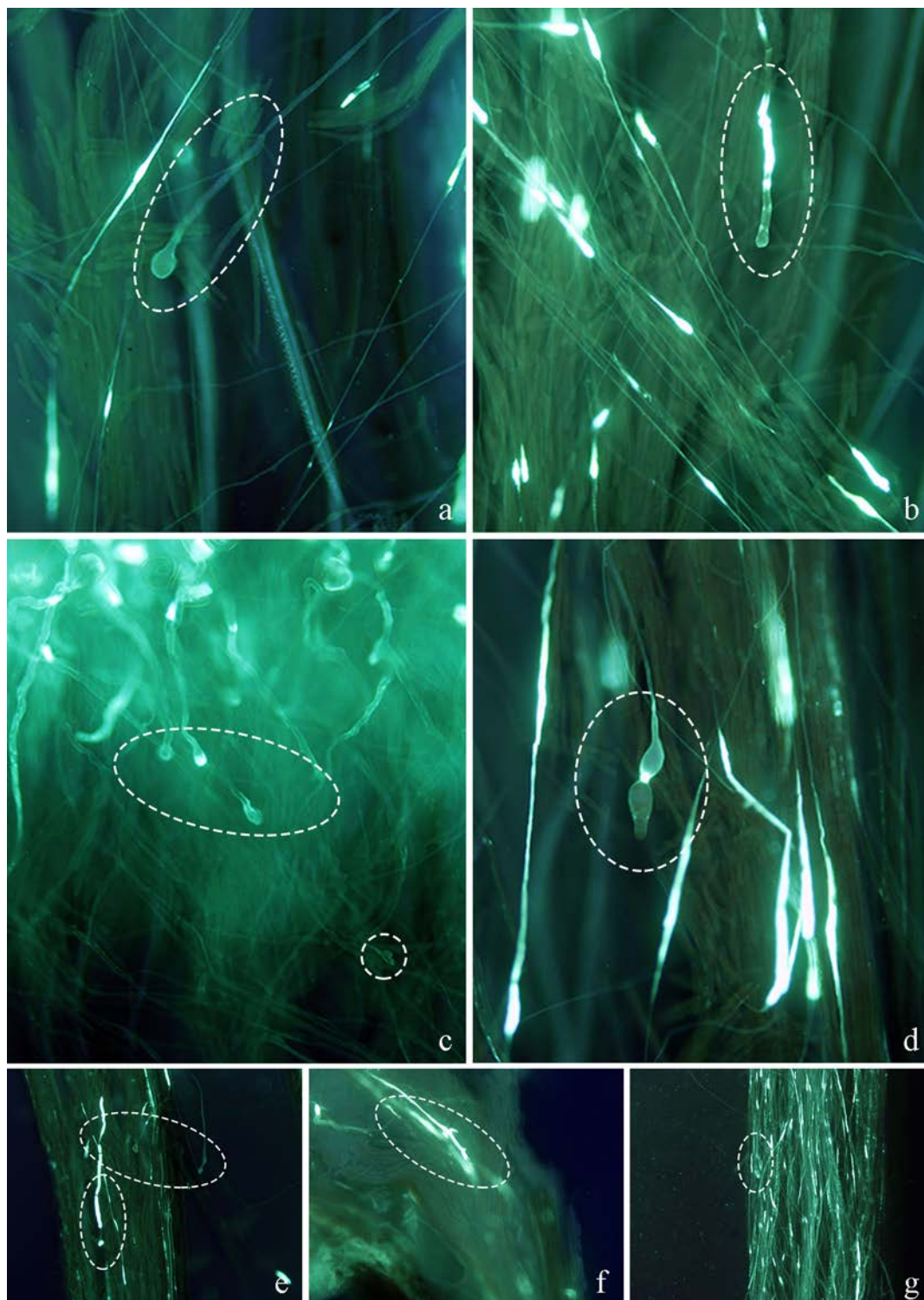
Koeficijent determinacije između prodora polenovih cevčica u plodnik i broja polenovih cevčica prodrlih u nucelus semenog zametka je iznosio 0,52. To znači da je 52% dobijenih vrednosti broja polenovih cevčica prodrlih u nucelus semenog zametka određeno sa brojem istih prodrlih u plodnik.



Grafikon 6. Prosta linearna regresija između: a) broja polenovih cevčica u gornjoj trećini stubića i prodora polenovih cevčica u plodnik; b) broja polenovih cevčica u plodniku i broja polenovih cevčica prodrlih u nucelus semenog zametka.

6.3.4. Zastupljenost inkompatibilnih polenovih cevčica u stubiću

Pojava gametofitne inkompatibilnosti praćena je nepravilnim rastom polenove cevčice, sa obilnom akumulacijom kaloze u njoj. Ispitivanjem dinamike rasta polenovih cevčica u stubiću šljive sorte Pozna plava tokom trogodišnjeg perioda, u svim varijantama oprašivanja, utvrđeno je prisustvo polenovih cevčica sa tipičnim znakovima inkompatibilnosti (Slika 9).



Slika 9. Inkompatilne polenove cevčice: a–b) tipičan proširen vrh polenove cevčice; c) njihovo prisustvo u delu žiga; d–e) nepravilan vrh polenove cevčice; f–g) grananje polenove cevčice.

U najvećem broju slučajeva inkompatibilne polenove cevčice su zaustavljale svoj rast u gornjoj trećini stubića (Slika 9a, 9b). Najveći broj inkompatibilnih polenovih cevčica se karakterisao proširenim vrhom koji je jače ili slabije fluorescirao. Takođe uočene su polenove cevčice koje su bile zadebljale celom svojom dužinom i jače su fluorescirale od ostalih polenovih cevčica. U manjem broju inkompatibilne polenove cevčice su uočene u regionu neposredno ispod žiga (Slika 9c) ili u drugoj trećini stubića.

Samo je u 2010. godini ispitivanja primećeno prisustvo inkompatibilnih polenovih cevčica u drugoj trećini istubića i to u varijanti stranooprašivanja sortom Hanita (60% od ukupnog broja inkompatibilnih polenovih cevčica je bilo u drugoj trećini stubića) i sortom Čačanska najbolja (17% od ukupnog broja inkompatibilnih polenovih cevčica je bilo u drugoj trećini stubića).

Vrh inkompatibilne polenove cevčice je najčešće bio okrugao, ali su uočene i inkompatibilne polenove cevčice sa vrhom nepravilnog oblika (Slika 9d, 9e). Osim tipičnih znakova inkompatibilnosti, u manjem broju su uočene polenove cevčice koje su imale jače ili slabije grananje (Slika 9f, 9g).

Prosečno za sve tri godine najveći broj inkompatibilnih polenovih cevčica je utvrđen u varijanti samooprašivanja (4,84%), dok je najmanji broj utvrđen u varijantama stranooprašivanja sortama Presenta i Hanita (1,10% i 1,25%) (Tabela 10).

Posmatrano po godinama ispitivanja najveći broj inkompatibilnih polenovih cevčica u varijantama samooprašivanja i stranoprašivanja je utvrđen u 2010. godini istraživanja, dok je u varijanti slobodnog oprašivanja uočen u 2008. godini.

Tabela 10. Zastupljenost inkompatibilnih polenovih cevčica u stubiću sorte šljive Pozna plava, u ispitivanim varijantama oprašivanja, po godinama ispitivanja (%).

Varijanta oprašivanja	Region stubića	2008. godina	2010. godina	2011. godina	Ukupno
Pozna plava	1/3	2,65	6,75	5,11	4,84
Čačanska najbolja	1/3	1,92	5,64	3,46	3,06
	2/3	/	1,15	/	
Hanita	1/3	1,82	1,29	0,10	1,25
	2/3	/	1,77	/	
Presenta	1/3	–	1,70	0,49	1,10
Slobodno oprašivanje	1/3	4,56	3,42	4,33	4,10

U varijanti samooprašivanja, po godinama ispitivanja broj inkompatibilnih polenovih cevčica se kretao od 2,65% do 5,11%. U varijantama stranooprašivanja broj inkompatibilnih polenovih cevčica imao je vrednosti 1,92–6,79% sa sortom Čačanska najbolja; 0,10–3,06% sa sortom Hanita i 0,49–1,79% sa sortom Presenta. U varijanti slobodnog oprašivanja broj inkompatibilnih polenovih cevčica iznosio je od 3,42 do 4,56%.

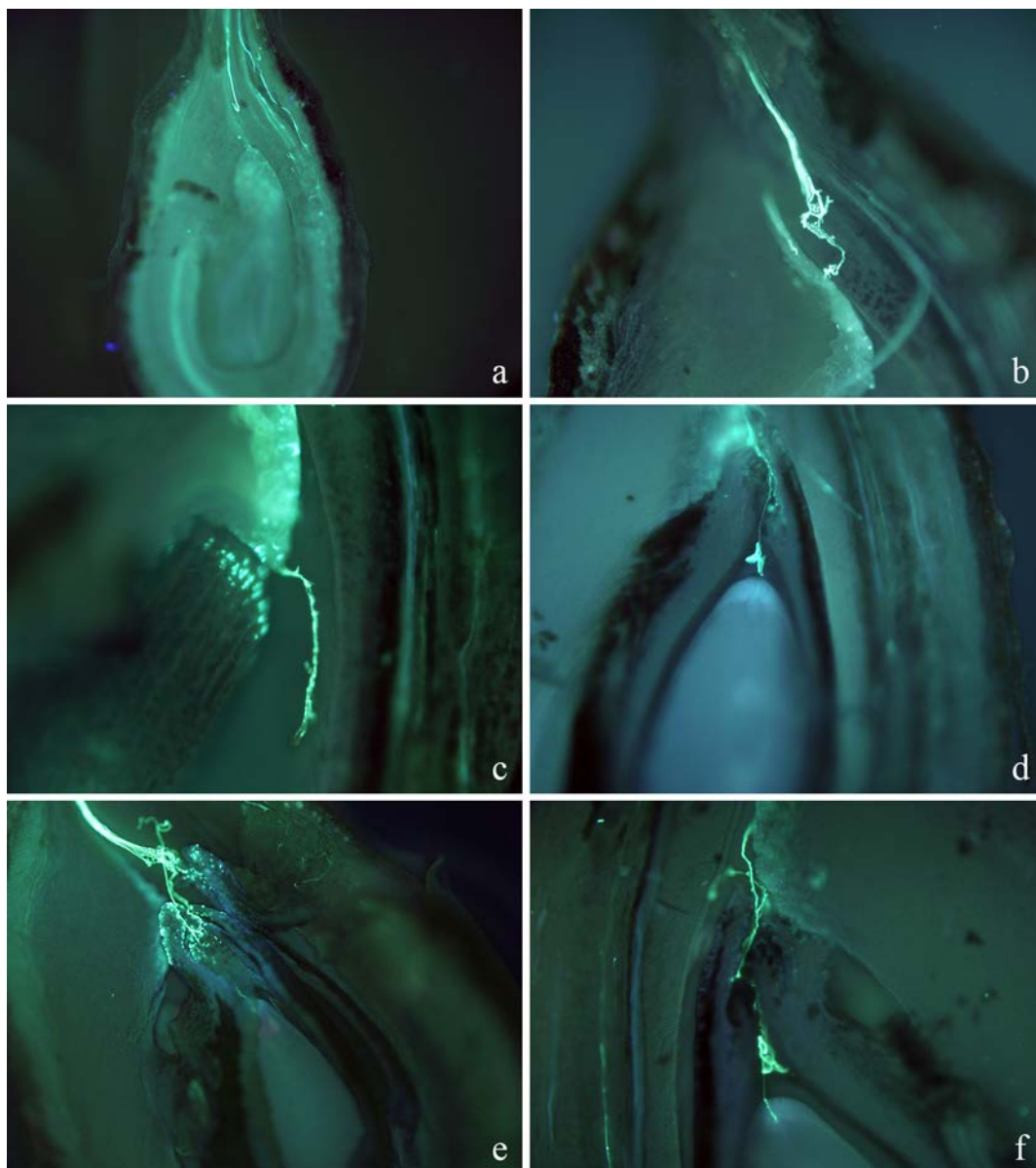
Pošto se radi o inkompatibilnim polenovim cevčicama čija je zastupljenost u odnosu na ukupan broj polenovih cevčica u gornjoj trećini stubića bila manja od 5%, njihov uticaj je neznatan, čak i na broj polenovih cevčica koje će prodrati u plodnik, pa ovde mogu imati značaja samo u opisu pojave različitih morfoloških oblika inkompatibilnih polenovih cevčica.

6.3.5. Specifičan rast polenovih cevčica u plodniku

Među polenovim cevčicama prodrim u plodnik, u svim ispitivanim varijantama oprašivanja, primećene su one koje su se odlikovale specifičnim rastom, tj. rastom koji je odstupao od normalnog. Specifičan rast polenovih cevčica je utvrđen u svim regionima plodnika kuda prolazi polenova cevčica: zona obturatora, zona mikropile, kao i u embrionovoj kesici. Specifičan rast polenovih cevčica je bio različit u zavisnosti od regiona plodnika u koji su dospale. Postojanje polenovih cevčica kojima su vrhovi okrenuti za 180° je uočeno u svim delovima plodnika (Slika 10a). Tako, u zoni obturatora polenove cevčice sa specifičnim rastom su se manje ili više granale (Slika 10b), dok se u zoni iznad mikropile i u mikropili specifičan rast polenovih cevčica odlikovao formiranjem manjeg ili većeg klupka (Slika 10d). Ni u jednoj varijanti oprašivanja nisu primećene polenove cevčice koje su u zoni obturatora formirale klupko niti su u zoni mikropile uočene polenove cevčice koje su se granale. Takođe, primećene su polenove cevčice koje su se odlikovale rastom u lokulu plodnika (Slika 10c). Nakon prodora polenove cevčice u nucelus semenog zametka naknadno prispele polenove cevčice koje su se odlikovale specifičnim rastom granale su se u zoni obturatora, a najčešće se moglo uočiti formiranje klupka iznad ili u mikropili (Slika 10e, 10f).

Specifičan rast polenovih cevčica u svakoj varijanti oprašivanja određen je kao zbirna vrednost uočenih pojava u svim terminima fiksiranja. Specifičan rast polenovih

cevčica analiziran je u odnosu na to da li u te semene zametke nije ili jeste došlo do prodora polenove cevčice u nucelus (Tabela 11).



Slika 10. Specifičan rast polenovih cevčica u plodniku: a) okretanje za 180°C; b) grananje u zoni obturadora; c) prodor u lokulu plodnika d) klupko u mikropili; e– f) grananje u zoni obturadora, klupno nad i u mikropili, u semenim zamecima u kojima je došlo do prodora polenove cevčice u nucelus.

Prosečno za sve tri godine ispitivanja najveći broj polenovih cevčica koje su se odlikovale specifičnim rastom u zoni obturadora, u semenim zamecima u kojima nije

došlo do prodora polenove cevčice u nucelus, utvrđen je u varijanti samooprašivanja (3,77%). Najmanji broj polenovih cevčica sa specifičnim rastom je uočen u varijanti stranooprašivanja sortom Hanita (0,93%). Prosečne vrednosti specifičnog rasta polenovih cevčica u zoni mikropile, u semenim zamecima u kojima nije došlo do prodora polenove cevčice u nucelus, bile su najveće u varijanti stranooprašivanja sortom Presenta (1,89%), a najmanje u varijanti stranooprašivanja sortom Hanita (0,25%).

U semenim zamecima u kojima je došlo do prodora polenove cevčice u nucelus, prosečno najveći broj polenovih cevčica sa specifičnim rastom u zoni obturatora od 2,18% je bio u varijanti oprašivanja sortom Čačanska najbolja, dok je najmanja vrednost od 0,25% utvrđena u varijanti oprašivanja sortom Hanita. U zoni mikropile u varijanti oprašivanja sortom Presenta je uočen najveći broj polenovih cevčica sa specifičnim rastom, dok je najmanji broj utvrđen u varijanti oprašivanja sortom Čačanska najbolja (3,39% i 0,67%).

U varijanti samooprašivanja i u varijanti stranooprašivanja sortom Hanita, specifičan rast u zoni obturatora i u zoni mikropile je utvrđen pre i posle prodora polenovih cevčica u nucelus semenog zametka.

U varijanti slobodnog oprašivanja samo je u jednoj godini u zoni obturatora, pre daljeg prodora polenove cevčice, uočen specifičan rast polenovih cevčica. Varijanta oprašivanja sa sortom Presenta se karakterisala time da je pojava specifičnog rasta polenovih cevčica pre i posle prodora u nucelus bila lokalizovana u zoni mikropile. U varijantama samooprašivanja i stranooprašivanja sortom Hanita, u pojedinim ispitivanim godinama, uočen je specifičan rast polenovih cevčica, izuzev u embrionovoj kesici, u svim ostalim regionima,.

Samo u varijanti stranooprašivanja sortom Čačanska najbolja, u sve tri godine ispitivanja u semenim zamecima gde nije i jeste došlo do prodora polenove cevčice u nucelus je uočen specifičan rast polenovih cevčica u zoni obturatora. U ovoj varijanti u jednoj godini je utvrđen specifičan rast polenovih cevčica u zoni mikropile, u semenim zamecima gde nije došlo do daljeg prodora polenove cevčice. Pojava specifičnog rasta polenove cevčice u embrionovoj kesici je uočena samo u ovoj varijanti oprašivanja.

Tabela 11. Specifičan rast polenovih cevčica u plodniku sorte šljive Pozna plava.

Varijanta oprašivanja	Specifičan rast polenovih cevčica u semenim zamecima u kojima nije došlo do prodora polenove cevčice u nucelus semenog zametka (%)					Specifičan rast polenovih cevčica u semenim zamecima u kojima je došlo do prodora polenove cevčice u nucelus semenog zametka (%)				
	Godina	Zona obturatora	Prosek	Zona mikropile	Prosek	Zona obturatora	Prosek	Zona mikropile	E. kesica	Prosek
Samooprašivanje	2008.		3,77	2,60	0,87	1,30	0,43			1,27
	2010.	11,32						3,77		
	2011.									
Čačanska najbolja	2008.	3,58	2,47		0,31	0,72	2,18		2,00	0,67
	2010.	1,83		0,92		1,83				
	2011.	2,00				4,00				
Hanita	2008.	2,78	0,93		0,25		0,25	0,93		0,84
	2010.			0,74		0,74				
	2011.									
Presenta	2010.		/		1,89		/	6,78		3,39
	2011.			3,77						
Slobodno oprašivanje	2008.	4,69	1,56		/		/			/
	2010.									
	2011.									

Izuzev slobodnog oprašivanja, kod ostalih varijanti oprašivanja specifičan rast polenovih cevčica, u semenim zamecima gde nije došlo do prodora polenove cevčice u nucelus, procentualno je bio zastupljeniji u zoni obturatora. Nakon prodora polenove cevčice u nucelus procenat polenovih cevčica sa specifičnim rastom je bio zastupljeniji u zoni mikropile.

6.4. Histološka ispitivanja plodnika

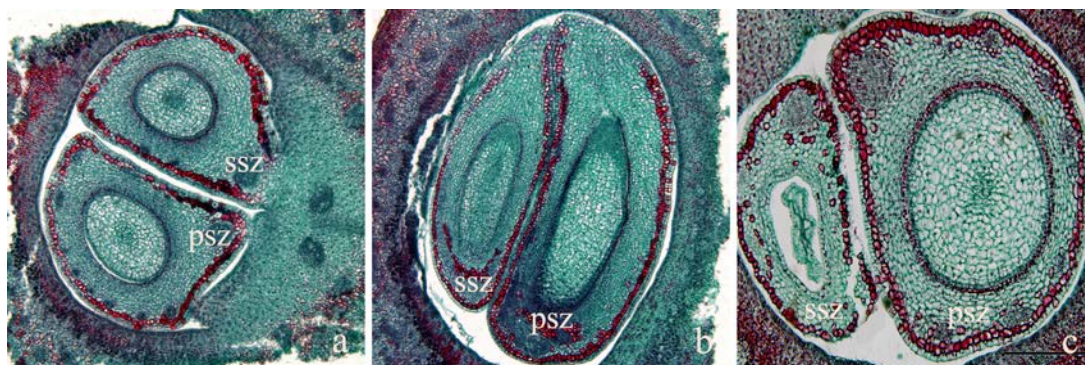
6.4.1. Položaj i morfološki izgled primarnog i sekundarnog semenog zametka u plodniku

Najznačajniji deo tučka je plodnik koji sadrži semene zametke sa embrionim kesicama. Tokom dvogodišnjih istraživanja u varijanti slobodnog oprašivanja kao i u neoprašenoj varijanti u plodniku su uočena uvek po dva semena zametka koja su sa manjim oscilacijama bila približno iste veličine na početku perioda punog cvetanja (Slika 11a). Veći i razvijeniji semeni zametak se podrazumevao kao primaran, a drugi

kao sekundaran. U slučajevima kada su oba semena zametka iste veličine, kao primaran se smatrao onaj koji je imao razvijeniji funkcionalni stadijum embrionove kesice. Već u prvim danima nakon punog cvetanja slika se drastično menjala u korist primarnog semenog zametka koji nastavljao sa daljim rastom, dok je sekundarni zahvatao proces atrofije i on je ubrzo degenerisao (Slika 11b, 11c).

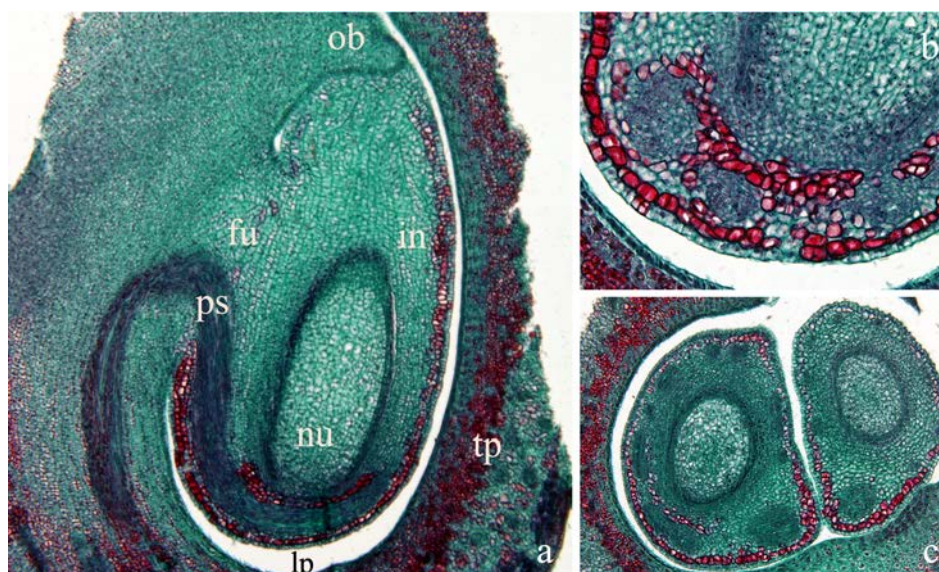
Kod šljive, kao i kod ostalih predstavnika roda *Prunus*, položaj semenih zametaka u plodniku je anatropan, a za karpelu su pričvršćene pomoću funikulusa (Slika 12a). U funikulusu je uočen veći provodni snopić, koji ide do halaznog dela gde se granao na manje snopiće koji snadbeavaju sa hranljivim materijama nucelus i integumente (Slika 12b, 12c).

Delovi plodnika – obturator i semeni zameci formiraju V oblik koji je karakterističan za anatropan položaj. Obturator, koji predstavlja protuberancu karpelarnog zida plodnika, nalazi se duž suture plodnika, počinje ispod baze stubića i pruža se do placentarnog dela iznad funikulusa. Sastoji se iz dve manje lobule, pri čemu svaka natkriljuje po jedan semeni zametak (Slika 13a).

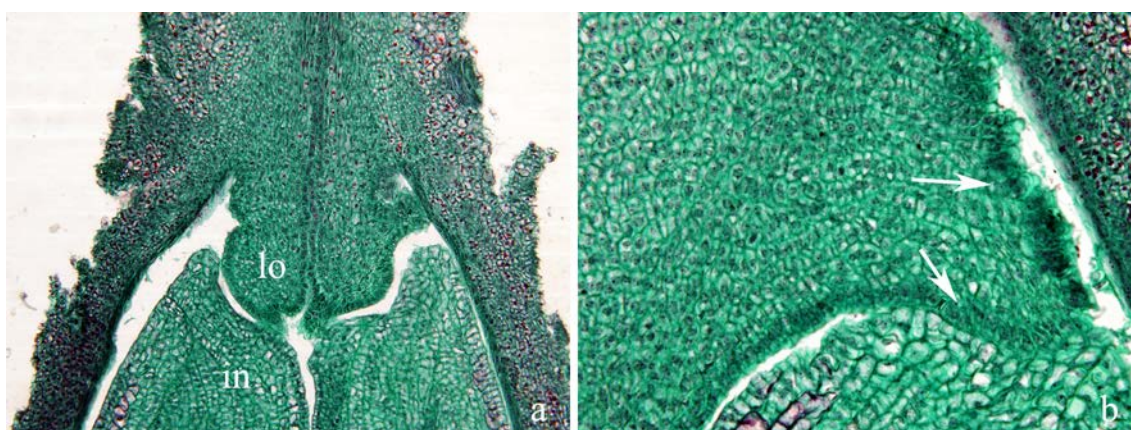


Slika 11. Izgled primarnog i sekundarnog semenog zametka kod sorte šljive Pozna plava u vreme: a) punog cvetanja; b) drugog dana od početka punog cvetanja; c) četvrtog dana od početka punog cvetanja

(psz – primarni semeni zametak, ssz – sekundarni semeni zametak).



Slika 12. Položaj i izgled: a) funikulus sa provodnim snopićem u njemu; b) provodni snopići u halazi i u c) integumentima (fu – funikulus, ps – provodni snopić, nu – nucleus, ob – obturator, lp – lokula plodnika, tp – tkivo plodnika, in – integumenti).



Slika 13. Izgled: a) lobula obturatora; b) papilarnih ćelija obturatora

(lo – lobula obturatora, in – integumenti).

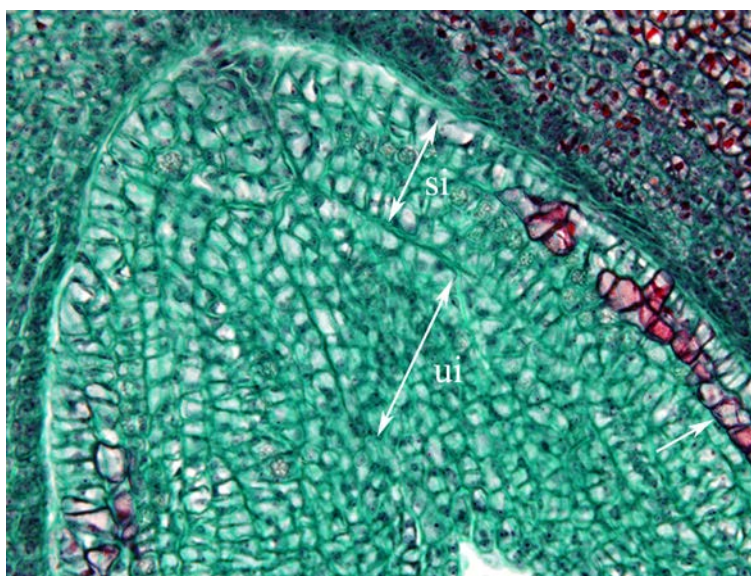
Površina obturatora zajedno sa početnim delom placente plodnika je papilarna i papile su po svojoj strukturi slične papilama na žigu stubića (Slika 13b). Provodna zona u početnom delu tkiva plodnika i obturatora imala je jače bojenje safraninom, koje se u kasnijim danima fiksiranja još više intenziviralo. Čelije provodne zone su sastavljene od izduženih ćelija sa vrlo malo intercelularnog prostora.

Semeni zameci i embrionove kesice u njima predstavljaju polarizovane strukture – sa mikropilarnim krajem, delom gde se integumenti završavaju sa otvorom i halaznim

krajem, mestom gde integumenti izostaju. Semeni zamenci su okruženi sa dva sloja integumenta. Ova dva sloja su najlakše uočljiva na mikropilarnom kraju (Slika 14). Unutrašnji sloj formira otvor mikropilu.

U vreme punog cvetanja spoljašnji integument u mikropilarnom kraju se završavao otvorom neznatno više iznad otvora unutrašnjeg integumenta, formirajući pri tome egzostomalni otvor. Oba sloja su bila sastavljena od približno istog broja ćelija (6–7). U ćelijama spoljašnjeg sloja integumenta tokom celog perioda ispitivanja uočavao se jedan sloj krupnih ćelija koje pokazuju jako bojenje safraninom, što ukazuje da u njihovom sastavu uglavnom preovladava lignin.

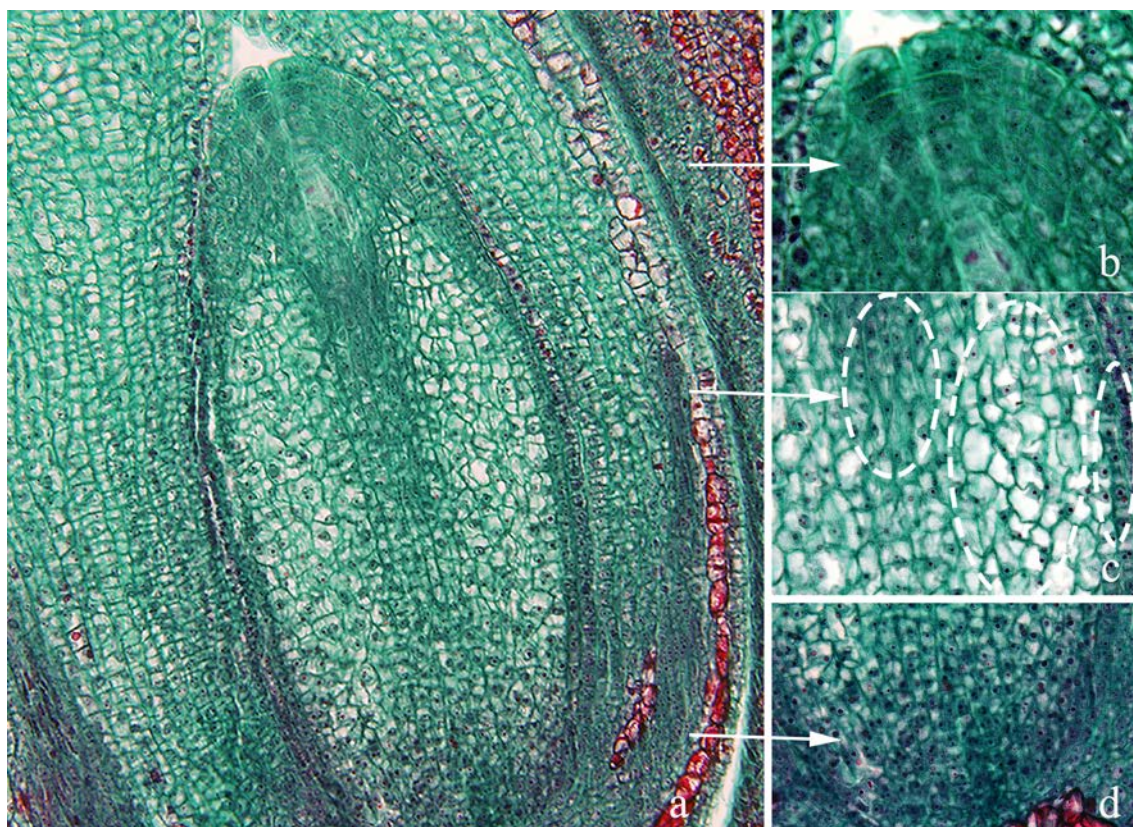
Uočeno je jače bojenje safraninom i ćelija unutrašnjeg sloja integumenta koji čine otvor mikropilu. U danima nakon punog cvetanja dolazilo je do izduživanja ćelija oba sloja integumenta u mikropilarnom kraju.



Slika 14. Slojevi integumenta na mikropilarnom kraju (si – spoljašnji sloj integumenta, ui – unutrašnji sloj integumenta).

Središnji deo semenih zametaka u kome je smeštena embrionova kesica pripada nucelus, u kome se moglo razlikovati više tipova ćelija (Slika 15a). U mikropilarnom kraju ćelije nucelusa koje se nalaze iznad embrionove kesice, formiraju sloj nucelarne kape koji je sastavljen od 4–5 u širini i 6–7 u visini izodijametričnih kompaktnih ćelija, sa citoplazmom koja se jače boji, krupnim i intezivno bojenim jedrom i jedarcetom (Slika 15b).

Sledeći tip ćelija nucelusa koji se uočavao u spoljašnjem regionu čini jedan red kompaktnih ćelija koje su bile sitnije od ćelija koje čine nucelarnu kapu (Slika 15c). Ćelije koje čine unutrašnji deo nucelusa su bile krupne, izodijametrične i slabo su među sobom bile povezane. U sebi sadrže krupnu vakuolu, dok je citoplazma u tankom sloju sa jedrom smeštena uz zid. One okružuju oko tri četvrtine embrionove kesice, a izostaju u mikropilarnom delu.



Slika 15. Raspored različitih tipova ćelija u nucelusu: a) nucelus; b) ćelije nucelarne kape; c) ćelije ispod embrionove kesice, središnjeg dela nucelusa i kompaktni spoljni sloj ćelija nucelusa; d) gusto zbijene ćelije nucelusa u halaznom delu semena zametka.

Deo nucelusnih ćelija koji je smešten ispod embrionove kesice i pruža se ka halaznom delu, naročito je bio uočljiv u danima nakon punog cvetanja, sastavljen je od izduženih do izodijametričnih slabo vakuolarizovanih ćelija.

Ćelije nucelusa u halaznom delu u danima fiksiranja su pokazivale jako bojenje safraninom, što ukazuje da je u sastavu zidova njihovih ćelija većinski zastupljen lignin (Slika 15d).

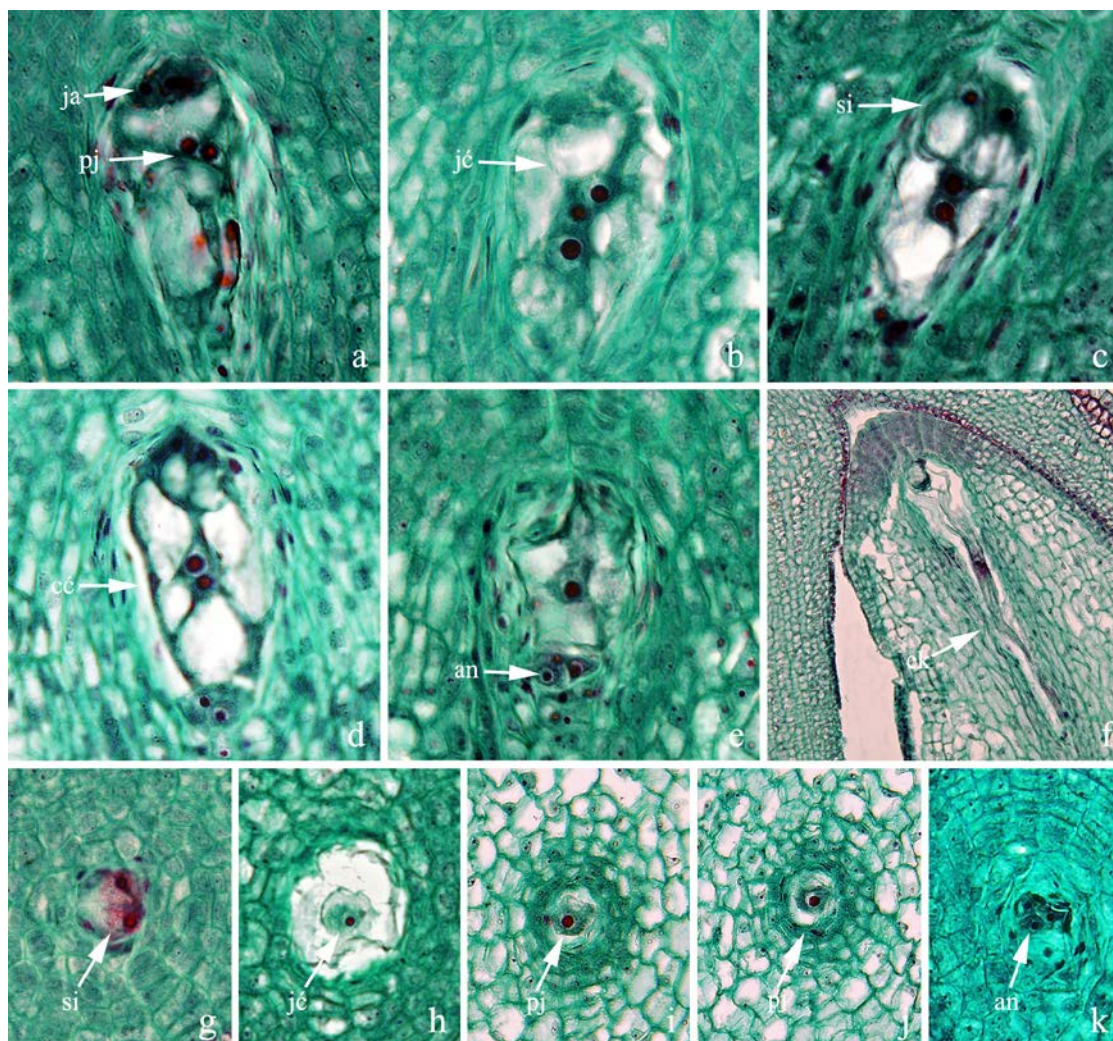
6.4.2. Organizacija normalne embrionove kesice u primarnom i sekundarnom semenom zametku

Formiranje embrionove kesice kod šljive je po *Polygonum* tipu. Nakon završenog procesa megasporogeneze, formiraju se četiri linearno postavljene haploidne makrospore. U formiranju embrionove kesice učestvuje donja makrospora. Ona nastavlja sa daljim deobama šireći se i zauzimajući položaj degenerisalih makrospora. Proces megagametogeneze karakterišu tri prepoznatljiva dešavanja: serija mitotičkih deoba koje su praćene celularizacijom nukleusa i na kraju ćelijska diferencijacija. Megagametogeneza se dešava neposredno pre ili u toku perioda punog cvetanja. Nakon prve dve mitotičke deobe formira se četvororedarna embrionova kesica u kojoj su jedra raspoređena po dva na svakom polu. U toku treće mitotske deobe, u osmojedarnoj embrionovoj kesici, fragmoplasti i ćelijska ploča se formiraju između jedara, čime se završava proces celularizacije i cela kesica ubrzo je kompletno okružena sa ćelijskim zidom.

U embrionovoj kesici su se mogla razlikovati jasno četiri različita tipa ćelija: jajna ćelija, sinergide, centralna ćelija i antipode. Ćelije jajnog aparata su u početku dosta zbijene, jedro jajne ćelije je nešto krupnije od jedara sinergida, pošto još nije došlo do vakuolarizacije (Slika 16a). Formiranjem vakuola u ćelijama jajnog aparata embrionova kesica ulazi u zreli stadijum.

Embrionova kesica, kao i semeni zametak, je polarizovana struktura sa antipodalnim ćelijama u halaznom kraju, dok se jajni aparat nalazi na mikropilarnom kraju. Same ćelije unutar embrionove kesice takođe pokazuju visoku polarizovanost, jedro sa citoplazmom u jajnoj ćeliji je lokalizovano ka halaznom polu, dok je kod sinergida i centralne ćelije jedro sa citoplazmom lokalizovano ka mikropilarnom kraju, tako da centralna ćelija i sinergide u odnosu na jajnu ćeliju imaju suprotnu polarnost. Različita polarnost jajne ćelije i centralne ćelije dovodi njihova jedra u neposrednu blizinu, što ima značaja u procesu dvojnog oplodjenja.

Jajna ćelija, jedan od glavnih elemenata embrionove kesice smeštena je u mikropilarnom delu između sinergida. Zajedno sa sinergidama čini jajni aparat. U ranoj razi formiranja embrionove kesice, dok još nije došlo do vakuolarizacije, jedro jajne ćelije je u istoj ravni sa sinergidama i nešto je krupnije od njih. U vreme kada je embrionova kesica zrela, citoplazma sa jedrom je smeštena u halaznom delu i ima srpast oblik, dok ostatak ispunjava krupna vakuola (Slika 16b i 16h).



Slika 16. Funkcionalni stadijumi embrionove kesice i njeni elementi na uzdužnim: a) rani 8-jedarni stadijum; b) izgled normalne jajne ćelije; c) kruškasti oblik sinergida; d) izgled centralne ćelije; e) antipode; f) izduživanje embrionove kesice, i poprečnim presecima: g) sinergide; h) jajna ćelija; i–j) polarna jedra; k) antipode
(ja – elementi jajnog aparata, pj – polarna jedra, jc – jajna ćelija, si – sinergide, cc – centralna ćelija, an – antipode, ek – embrionova kesica).

U odnosu na ostale elemente embrionove kesice, za jajnu ćeliju se može reći da ima najviše izraženu polarnost.

Sinergide su dve specijalizovane ćelije koje su, kao deo jajnog aparata, lokalizovane u mikropilarnom delu embrionove kesice. Citoplazma sinergida korišćenim tripletnim bojenjem se pokazala kao najgušća i skoncentrisana je oko jedra u centralnom delu, dok ostatak ka halaznom delu ispunjava krupna vakuola (Slika 16c i 16g). U mikropilarnom delu ćelijski zid sinergida formira veći broj invaginacija, filiform aparat, koji pokazuje jače bojenje safraninom. U vreme kada je embrionova kesica zrela sinergide su kruškastog oblika.

Centralna ćelija je najkrupnija ćelija u embrionovoj kesici, koju u vreme zrelosti embrionove kesice 80% ispunjavaju vakuole (Slika 16d, 16i i 16j). U proseku u centralnoj ćeliji su se mogle uočiti 3–4 krupne vakuole. Dva polarna jedra su bila smeštena u centralnom delu, bliže mikropili, dok je većina citoplazme bila u perifernom delu, mada su se kroz sredinu mogle videti citoplazmatske niti. Spajanje polarnih jedara u krupno centralno jedro uočeno je u varijanti slobodnog oprašivanja u drugoj godini ispitivanja od šestog dana od momenta punog cvetanja.

Tri antipode su smeštene u halaznom delu embrionove kesice, efemernog su karaktera i nešto su krupnije od ostalih ćelija koje ih okružuju (Slika 16e i 16k). Antipode su se mogle uočiti samo u prvim danima nakon punog cvetanja do drugog ili četvrtog dana (prva i druga godina istraživanja).

6.4.3. Funkcionalni stadijumi, embriogeneza i pojava anomalija u strukturi semenih zametaka u varijanti slobodnog oprašivanja

6.4.3.1. Funkcionalni stadijumi embrionove kesice primarnih semenih zametaka

Dvogodišnjom analizom citološke konfiguracije embrionove kesice, u varijanti slobodnog oprašivanja, utvrđeno je da se ona nalazi u petojedarnom ili četvorojedarnom stadijumu. Osmog dana od oprašivanja, u 2008. godini zastupljenost embrionovih kesica sa 5–jedarnim stadijumom bio je 12,50%. U 2010. godini osmog dana od oprašivanja, broj embrionovih kesica sa četvorojedarnim stadijumom iznosio je 25%

(Tabela 12). Desetog dana od oprašivanja se uočilo postepeno izduživanje embrionove kesice ka halaznom polu (Slika 16f).

Tabela 12. Normalna i nepravilna citološka struktura embrionove kesice primarnog semenog zametka sorte šljive Pozna plava u varijanti slobodnog oprašivanja, prvih deset dana nakon početka punog cvetanja, u 2008. i 2010. godini ispitivanja.

Stadijum	Broj primarnih semenih zametaka sa normalnom i nepravilnom ek ili nucelusom (%)												
	0. dan		2. dan		4. dan		6. dan		8. dan		10. dan		
	2008.	2010.	2008.	2010.	2008.	2010.	2008.	2010.	2008.	2010.	2008.	2010.	
Normalna ek i nucelus													
4 jedra				10,00									
8 jedara	14,29			10,00									
8-jedarna ek, rana faza	28,58	30,00	10,00	10,00									
Zrela ek	14,29	20,00	10,00	40,00		10,00							
5-jedarna ek	14,29		50,00	10,00	60,00	40,00		20,00	12,50				
4-jedarna ek							10,00			25,00			
3-jedarna ek					10,00	10,00	50,00	20,00	50,00	37,50	50,00	20,00	
2-jedarna ek								10,00	12,50	12,50	10,00	10,00	
Rana faza embriona												10,00	
Nepravilna ek ili nucelus													
Nepravilno formirana ek		40,00	30,00	10,00	30,00	20,00	30,00	10,00	25,00				
Poremećaj polarizacije u 8-jedarnoj ek	14,29	10,00		10,00		20,00	10,00	10,00		25,00			
Degeneracija jajnog aparata, ostali elementi ek normalno razvijeni	14,29							20,00			40,00	50,00	
Degeneracija cele ek								10,00				10,00	
Normalna ek, degeneracija nucelusa													
Broj analiziranih ek	7	10	10	10	10	10	10	10	8	8	10	10	
Broj semenih zametaka sa:	normalnom ek i nucelusom	71,45	50,00	70,00	80,00	70,00	60,00	60,00	50,00	75,00	75,00	60,00	40,00
	nepravilnom ek i nucelusom	28,58	50,00	30,00	20,00	30,00	40,00	40,00	50,00	25,00	25,00	40,00	60,00

ek – embrionova kesica

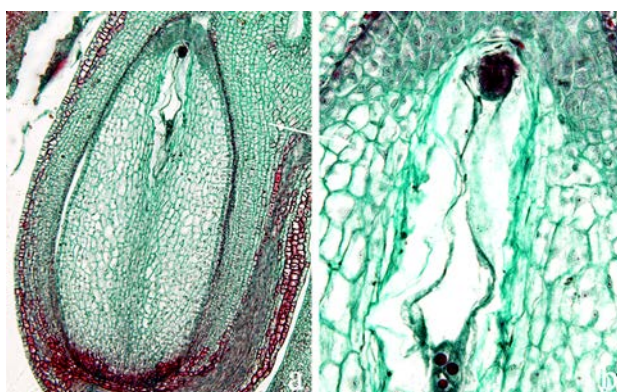
6.4.3.2. Rani stadijum embriogeneze

U 2008. i 2010. godini ispitivanja uočen je citološki stadijum embrionove kesice, označen kao trojedarni, u kome je došlo do degeneracije jedne ili obe sinergide

sa zadržanom normalnom citološkom konfiguracijom jajne ćelije. Polarna jedra su bila smeštena blizu jedna drugom. Ovaj stadijum uočen je već četvrtog dana od momenta punog cvetanja, i u obe godine je iznosio 10%. Od četvrtog dana od početka punog cvetanja pa do do osmog dana broj embrionovih kesica sa ovim stadijumom je imao linearni porast (50% u prvoj i 37,50% u drugoj godini). U 2008. godini desetog dana od momenta punog cvetanja broj embrionovih kesica sa trojedarnim stadijumom je imao iste vrednosti kao i osmog dana. U 2010. godini desetog dana od početka punog cvetanja broj embrionovih kesica sa trojedarnim stadijumom je bio manji i iznosio je 20%.

U 2010. godini na osnovu funkcionalnog stanja embrionove kesice, njenog morfološkog izgleda, šestog dana od momenta punog cvetanja, kod 10% ispitanih uzoraka može se govoriti o ranim postoplodnim procesima. Embrionova kesica se nalazila u dvojedarnom stadijumu (degenerisale sinergide, krupna jajna ćelija i polarna jedra spojena u centralno jedro). Osmog i desetog dana od momenta punog cvetanja u obe godine ispitivanja, broj embrionovih kesica sa ovakvom citološkom konfiguracijom je bio približno isti i iznosio je 12,50% i 10,00%.

Desetog dana od oprašivanja u 2010. godini ispitivanja kod 10% uzoraka uočeni su vrlo rani stupnjevi embriogeneze. Uporedo sa procesima embriogeneze dešava se i proces formiranja endosperma koji karakteriše serija deoba jedara smeštenih u perifernom delu citoplazme (Slika 17).

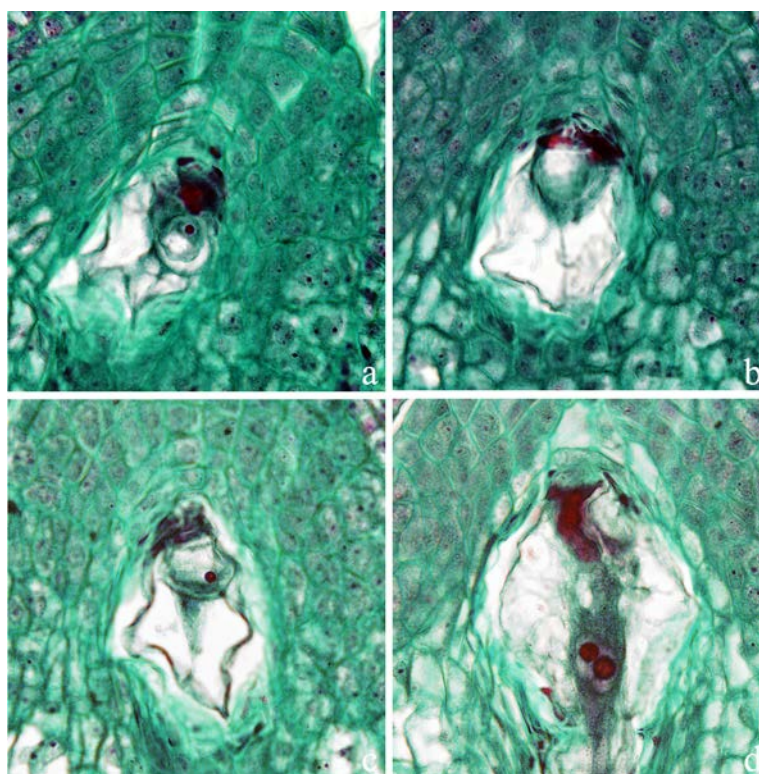


Slika 17. Rani stadijum embriogeneze (a i b).

6.4.3.3. Pojava defektnih primarnih semenih zametaka

Tokom dvogodišnjih ispitivanja u varijanti slobodnog opašivanja pored semenih zametaka koji su imali normalnu strukturu uočene su oni koji su u svojoj građi bili defektni. Pod defektnim su smatrani oni semeni zameci koje nisu funkcionalni, tj. u kojima su uočene nepravilnosti u strukturi embrionove kesice, znaci degeneracije pojedinih njenih elemenata ili znaci degeneracije ćelija nucelusa.

Nepravilnosti u strukturi embrionove kesice uočene su u obe godine ispitivanja i odnosile su se na: pomerenu srpastu zonu citoplazme jajne ćelije za 90° ili 180° (Slika 18a); veći broj jedara u embrionovoj kesici nepravilno raspoređenih, skoncentrisanih u sredini ili na polovima; nepotpunu konfiguraciju, gde je najčešće nedostajao neki od elemenata jajnog aparata. Broj semenih zametaka sa defektima u 2008. godini kretao se od 25,00% do 30,00%, a u 2010. od 10% do 50% (Tabela 12).



Slika 18. Nepravilnosti u strukturi embrionove kesice primarnih semenih zametaka: a) pomereni zona citoplazme jajne ćelije za 180° ; i znaci degeneracije: b) degeneracija obe sinergide; e) dezintegracija vakuole jajne ćelije; f) degeneracija jajnog aparata.

Ako se izuzmu antipode čija je degeneracija normalna pojava u prvim danima nakon punog cvetanja, primećena je pojava degeneracije pojedinih elemenata ili cele embrionove kesice. Najveći udeo degenerativnih procesa uočen je u elementima jajnog aparata. Moglo se izdvojiti više stepena degeneracije: dezintegracija vakuola, dok je ostatak ćelije zajedno sa jedrom zadržao normalan izgled; smežurano jedro sa tankom zonom citoplazme koja je imala jače bojenje; tamnije bojena amorfna masa u kojoj osim nukleolusa nije bilo moguće ništa više prepoznati. Najviši stepen degeneracije je skupljena bezoblična jako bojena masa bez ijedne prepoznatljive strukture (Slika 18b, 18c i 18d).

Degeneracija jajnog aparata je uočena nultog dana u 2008. godini ispitivanja kod 14,29% uzoraka. U 2010. godini šestog dana od momenta punog cvetanja kod 20% uzoraka je uočena degeneracija jajnog aparata. Desetog dana od početka punog cvetanja degenerisan jajni aparat bio je utvrđen kod 40% analiziranih uzoraka u 2008. godini i 50% uzoraka u 2010. godini ispitivanja. Degeneracija cele embrionove kesice je primećena samo u 2010. godini ispitivanja kod 10% semenih zametaka i to u kasnijim danima nakon punog cvetanja (Tabela 12).

Procenat uočenih defektnih primarnih semenih zametaka je rastao u danima nakon punog cvetanja i njihova zastupljenost utiče na broj funkcionalnih, što dalje ima direktan uticaj na broj onih koje će biti oplodene.

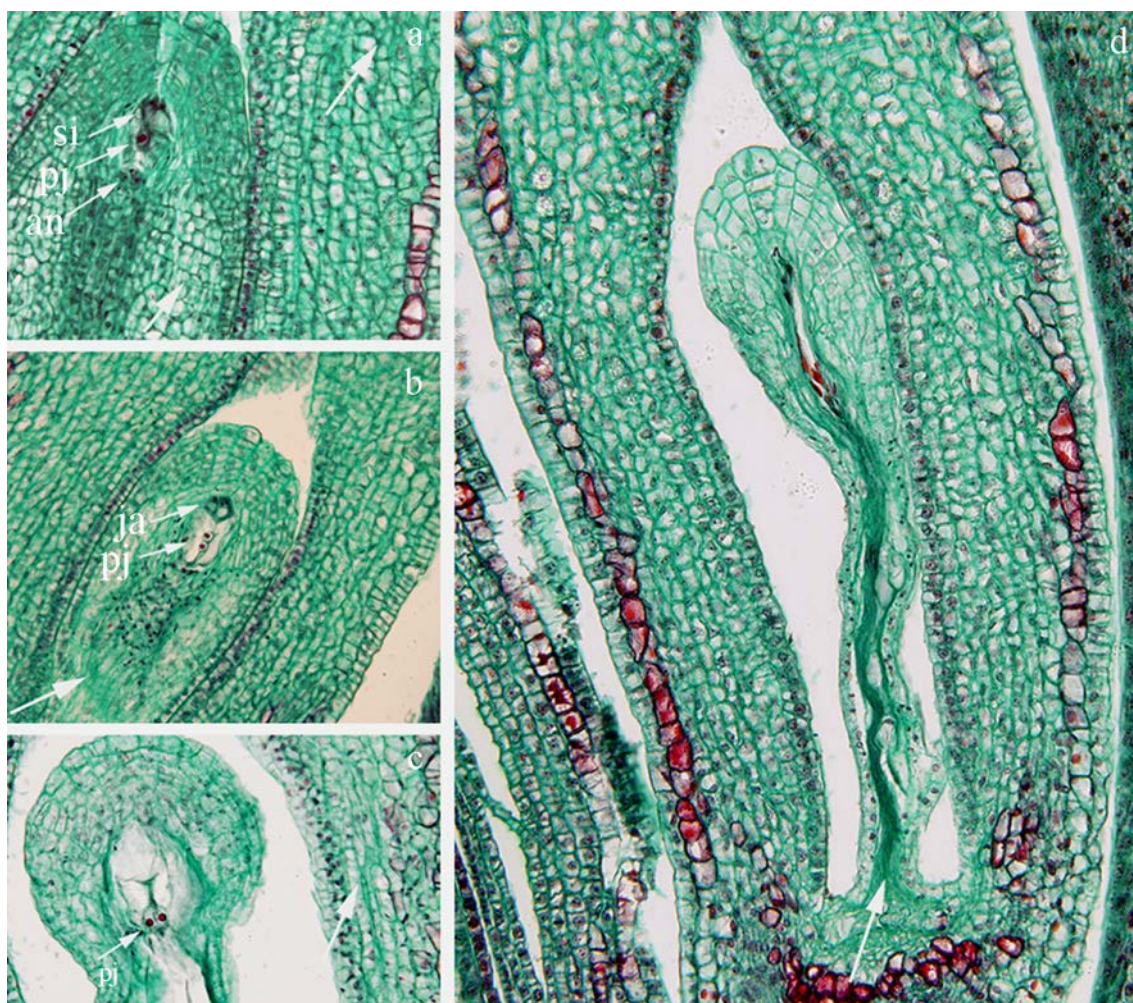
6.4.3.4. Pojava defektnih sekundarnih semenih zametaka

Za razliku od primarnih semenih zametaka kod kojih je funkcionalnost, u najvećem broju slučajeva dovodena, u vezu sa iregularnim procesima u samoj embrionovoj kesici, kod sekundarnih semenih zametaka se uočila sasvim drugačija slika. Proces koji su doveli do pojave defektnog semenog zametka dešavali su se prvo u ćelijama nucelusa, dok su elementi embrionove kesice imali relativno normalnu citološku organizaciju.

Dva najčešća znaka koja su ukazivala na defektan sekundarni semeni zametak. U obe godine istraživanja, četvrtog dana od početka punog cvetanja i defektan sekundarni semeni zametak je zaostajao u razvoju sa pojavom degeneracije ćelija

nucelusa. U 2008. godini, četvrtog dana od početka punog cvjetanja, kod 80% sekundarnih semenih zametaka uočeno je njihovo zaostajale u razvoju.

Iako je u takvim semenim zamecima embrionova kesica imala normalnu citološku organizaciju, ćelije nucelusa su pokazivale različit stepen degeneracije (Slika 19a, 19b, 19c). U 2010. godini broj ćelija nucelusa sa znacima degeneracije bio je još veći pa je šestog dana od početka punog cvjetanja kod svih analiziranih semenih zametaka uočena njihova degeneracija.



Slika 19. Degeneracija ćelija nucelusa i integumenata u sekundarnom semenom zametku: a) rana faza degeneracije; b) degeneracija ćelija nucelusa; c) degeneracija nucelusa i integumenta; d) degenerisani nucelus

(ja – elementi jajnog aparata, pj – polarna jedra, si – sinergide, an – antipode).

Mada je pojava degeneracija ćelija nucelusa jedan od prvih znakova pojave defektnih sekundarnih semenih zametaka i elementi embrionove kesice su vrlo brzo degenerisali (Slika 19d).

6.4.4. Vitalnost, funkcionalni stadijumi i anomalije u strukturi semenih zametaka neoprašenih cvetova

U neoprašenoj varijanti, kod oba semena zametka, primenom fluorescentno-mikroskopske metode (trogodišnji period) i citološkog bojenja (dvogodišnji period) utvrđena je dužina njihove vitalnosti kao i postojanje funkcionalnih citoloških stadijuma embrionove kesice.

Fluorescentno-mikroskopska metoda se zasniva na fluorohromnom bojenju plodnika sa fluorescentnom bojom, anilin plavim i fluorescenciji tog spoja pod UV svetlom. Fluorescencija se zasniva na vezivanju anilina za kalozu koja je prisutna u spoljašnjim ćelijama integumenta. Intezitet fluorescencije tog spoja u određenim delovima semenog zametka je indikator njenog funkcionalnog stadijuma, pri čemu autori ove metode navode stadijume razvoja fluorescencije od halazanog dela, zatim sledi širenje sa spoljne strane, odnosno strane koja je suprotna funikulusu ka mikropili, a potom se širi i zahvata ceo semeni zametak.

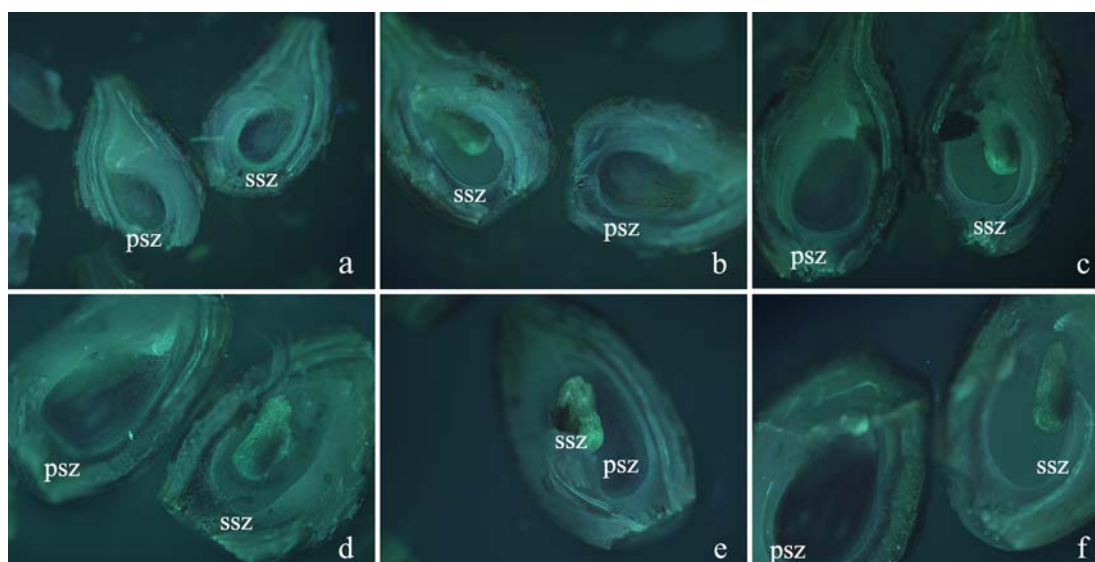
Druga korišćena metoda za ispitivanje dužine vitalnosti semenih zametaka je ispitivanje dinamike funkcionalnih citoloških stadijuma embrionove kesice u neoprašenoj varijanti prvih deset dana od početka punog cvetanja. Kao funkcionalni stadijumi računali su se osmojedarni i petojedarni stadijum, jer se ova dva stadijuma razvoja embrionove kesice računaju kao spremna za oplodjenje u momentu dospevanja polenove cevčice do nje.

6.4.4.1. Vitalnost primarnih semenih zametaka i funkcionalni stadijumi embrionove kesice

Trogodišnja ispitivanja primarnog semenog zametka korišćenjem fluorohromnog bojenja, pokazala su visok procenat njihove vitalnosti, koji se zadržao sve do desetog dana od početka punog cvetanja. Nije uočena fluorescencija čak ni u halaznom delu semenog zametka, mestu gde se prvo javlja i koja je znak početnog

gubitka vitalnosti (Slika 20a–20f). Na osnovu dobijenih rezultata, primenom ove metode za primarne semene zametke se može reći da su 100% vitalni.

Dobijeni dvogodišnji rezultati ispitivanja funkcionalnih stadijuma embrionove kesice, u primarnom semenom zametku, su pokazali da se oni u vreme punog cvetanja nalaze u ranoj fazi formiranja zrele embrionove kesice. Viši procenat embrionovih kesica u tom stadijumu u godinama ispitivanja je utvrđen u 2008. godini (Tabela 13). Drugog dana od početka punog cvetanja funkcionalnost embrionovih kesica se menjala u korist 5–jedarnog stadijuma (došlo je do degeneracije antipoda), koji je jedino bio prisutan u 2008. godini, dok su se u 2010. godini istog dana uočavali rani osmojedarni, osmojedarni i petojedarni stadijumi embrionove kesice.



Slika 20. Vitalnost semenih zametaka u danima od početka punog cvetanja: a) nulti dan; b) drugi dan; c) četvrti dan; d) šesti dan; e) osmi dan; f) deseti dan

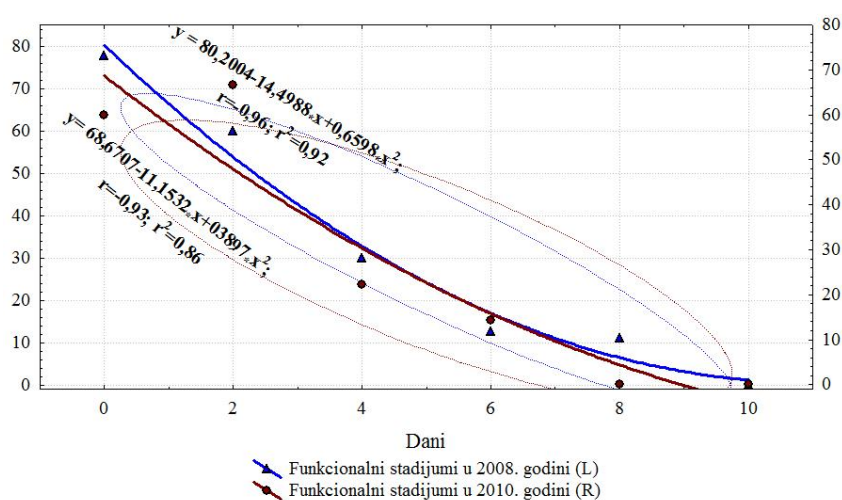
(psz – primarni semeni zametak; ssz – sekundarni semeni zametak).

Drastičan pad funkcionalnog 5–jedarnog stadijuma embrionove kesice utvrđen je u 2008. godini, četvrtog dana od početka punog cvetanja (30,00%). Šestog dana u obe godine uočen je manji procenat petojedarnog stadijuma, dok je osmog dana samo u 2008. godini u 11,11% uzoraka uočen petojedarni stadijum. U ostalim ispitivanim uzorcima u 2008. i 2010. godini u istom terminu usled citoloških promena u embrionovim kesicama može reći se da su one izgubile svoju funkcionalnost.

Tabela 13. Normalna i nepravilna citološka struktura embrionove kesice primarnog semenog zametka neoprašenih cvetova sorte šljive Pozna plava, prvih deset dana nakon početka punog cvjetanja, u 2008. i 2010. godini ispitivanja.

Stadijum	Broj primarnih semenih zametaka sa normalnom i nepravilnom ek ili nucelusom (%)											
	0. dan		2. dan		4. dan		6. dan		8. dan		10. dan	
	2008.	2010.	2008.	2010.	2008.	2010.	2008.	2010.	2008.	2010.	2008.	2010.
Normalna ek i nucelus												
4 jedra	11,11											
8 jedara	11,11											
8-jedarna ek, rana faza	55,56	50,00		11,11								
Zrela ek				22,22								
5-jedarna ek	11,11	10,00	60,00	33,33	30,00	22,22	12,50	14,29	11,11			
Nepravilna ek ili nucelus												
Nepravilno formirana ek	11,11	30,00		11,11				28,57				
Poremećaj polarizacije u 8-jedarnoj ek											10,00	
Degeneracija jajnog aparata, ostali elementi ek normalno razvijeni		10,00	40,00	22,22	60,00	77,78	75,00	57,15	88,89	77,78	50,00	71,43
Degeneracija cele ek							12,50			22,22	40,00	28,57
Normalna ek, degeneracija nucelusa					10,00							
Broj analiziranih ek	9	10	10	9	10	9	8	7	9	9	10	7
Broj semenih zametaka sa:	normalnom ek i nucelusom	88,89	50,00	50,00	66,66	20,00	11,11	11,11	0,00	0,00	0,00	0,00
	funkcionalna ek	66,67	50,00	50,00	66,66	20,00	11,11	11,11	0,00	0,00	0,00	0,00
	nepravilnom ek i nucelusom	11,11	40,00	50,00	33,33	80,00	88,89	88,89	100,00	100,00	100,00	100,00

ek – embrionova kesica



Grafikon 7. Nelinearna regresija između funkcionalnih stadijuma embrionove kesice i dana nakon punog cvjetanja neoprašenih cvetova, ispitivane sorte šljive, u dvogodišnjem periodu.

Ukoliko se utvrđeni funkcionalni stadijumi predstave zbirno, funkcionalna zavisnost od dana ispitivanja statistički se najbolje prikazuje regresionom krivom (Grafikon 7). Dobijene vrednosti pokazuju postojanje visoke negativne korelacije između dana nakon punog cvetanja i ispitivanih funkcionalnih citoloških stadijuma embrionove kesice. Dobijene vrednosti koeficijenta korelacije i determinacije u 2008. godini iznosile su -0,96 i 0,92, dok su te vrednosti bile nešto niže u 2010. godini i iznosile su od -0,93 i 0,86.

Na osnovu dobijenih rezultata o postojanju funkcionalnih stadijuma embrionove kesice može se govoriti do osmog dana od početka punog cvetanja.

6.4.4.2. Nepravilnosti u strukturi primarnih semenih zametaka

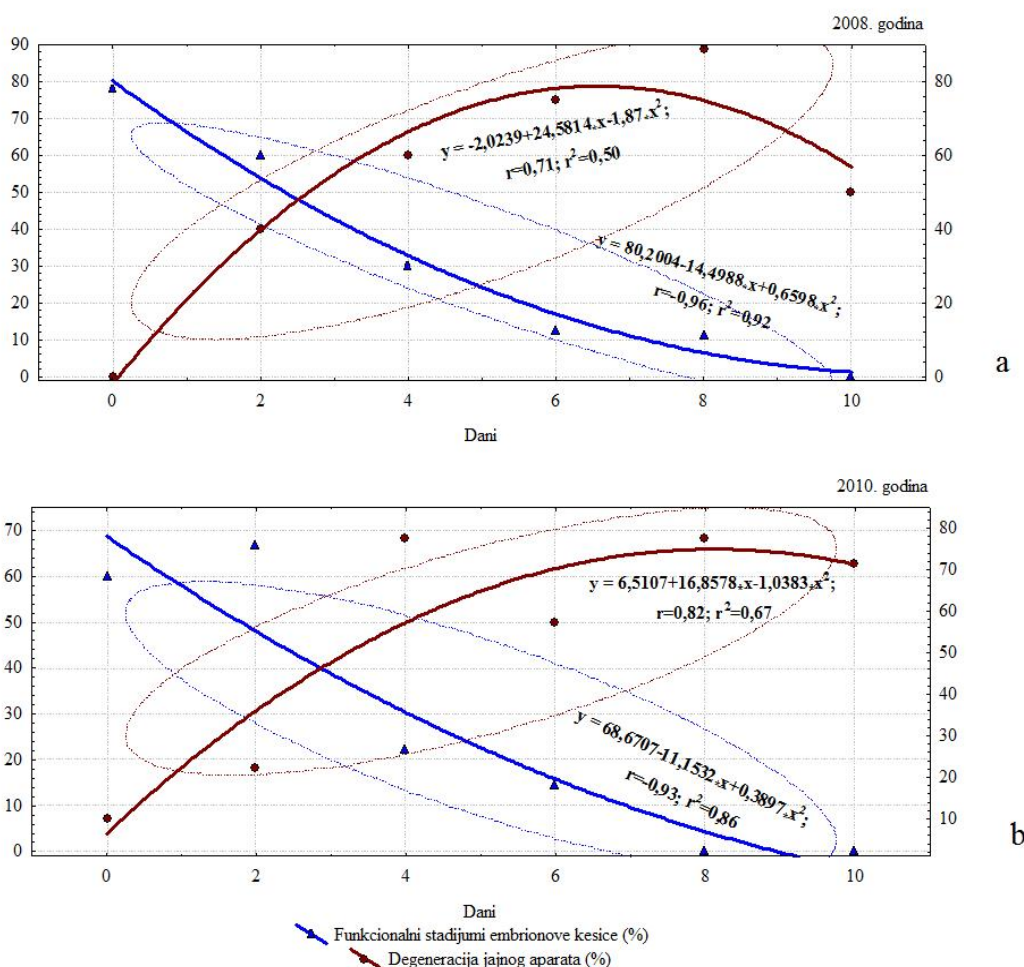
Uporedo sa ispitivanjem funkcionalnih stadijuma u neoprašenim semenim zamecima beležena je pojava nepravilnosti ili degeneracije elemenata embrionove kesice i ćelija nucelusa. U obe godine ispitivanja nepravilnosti su se, u najvećem procentu, odnosile na pojavu degeneracije elemenata jajnog aparata, počev od drugog dana od početka punog cvetanja (Tabela 13).

Pojava degeneracije elemenata jajnog aparata uočena je u 2008. godini kod 10% analiziranih uzoraka nultog dana fiksiranja (momenat punog cvetanja). Drugog dana od početka punog cvetanja, u obe godine ispitivanja uočena je degeneracija elemenata jajnog aparata (40% i 10%). Osmog dana od početka punog cvetanja, u obe godine, uočen je maksimalan broj semenih zametaka sa degeneracijom jajnog aparata (88,89% u 2008. godini i 77,78% u 2010. godini ispitivanja). Već desetog dana, u obe godine, osim degeneracije jajnog aparata, uočena je i početna degeneracija ćelija nucelusa.

U manjem broju tokom dvogodišnjeg ispitivanja je uočena nepravilno formirana embrionova kesica ili poremećaj polarizacije u embrionovoj kesici.

Pošto su u najvećem broju anomalije u semenom zametku vezane za pojavu degeneracije elemenata embrionove kesice, zavisnost njihovog pojavljivanja od dana ispitivanja najbolje je statistički opisana regresionom linijom. U obe godine ispitivanja koeficijent korelacije se kretao u rangu vrlo visoke pozitivne korelacije (0,71 i 0,82; Grafikon 8). Koeficijent determinacije u prvoj godini iznosio je 0,50, dok je u drugoj

godini imao vrednost od 0,67. Istovremeno, na grafikonu je prikazano kretanje funkcionalnih stadijuma embrionove kesice u zavisnosti od dana nakon punog cvetanja.



Grafikon 8. Prosta nelinearna regresija između funkcionalnih stadijuma embrionove kesice, pojave degeneracije elemenata jajnog aparata i dana nakon punog cvetanja neoprašenih cvetova sorte Pozna plava: a) 2008. godina; b) 2010. godina.

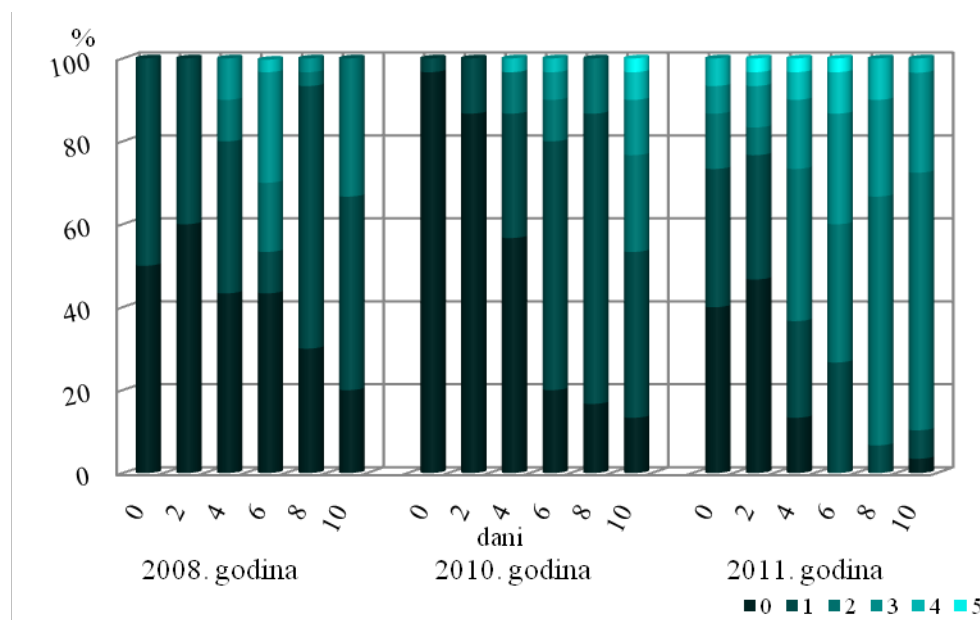
6.4.4.3. Vitalnost sekundarnih semenih zametaka i funkcionalno stanje embrionove kesice

Za razliku od primarnih semenih zametaka koji u trogodišnjim ispitivanjima korišćenjem fluorescentog bojenja nisu pokazali znake gubitka svoje vitalnosti, kod sekundarnih semenih zametaka se dobila drugačija slika (Grafikon 9). Najveći broj semenih zametaka koji nisu fluorescirali bio je u danu početka punog cvetanja (Slika 20a). Počev od dana punog cvetanja semeni zameci su imali različit intenzitet

fluorescencije, koji je u obe godine bio lokalizovan u halaznom delu, dok se u 2011. godini kretao od halaznog dela do fluorescencije celog semenog zametka. Intenzitet fluorescencije u danima nakon punog cvetanja je bio približno ujednačen u 2008. i 2010. godini i uočavao se u halaznom i bočnom delu (Slika 20b i 20c). Četvrtog i šestog dana od početka punog cvetanja u obe godine je u određenom procentu uočena fluorescencija u mikropilarnom kraju, da bi potom izostala osmog dana. U malom broju su uočeni semeni zameci koji su fluorescirali (slabijim ili jačim intenzitetom) celom svojom površinom (Slika 20e).

U 2011. godini ispitivanja u danima nakon punog cvetanja fluorescencija semenih zametaka je u visokom stepenu bila zastupljena u halaznom, bočnom delu i mikropilarnom kraju (Slika 20d).

Postojanje funkcionalnih stadijuma embrionove kesice u sekundarnom semenom zametku utvrđeno je u danu punog cvetanja i drugog dana od početka punog cvetanja. Kao funkcionalni stadijum u danu početka punog cvetanja, u obe godine istraživanja, uočen je 8-jedarni stadijum kod 57,7% i 44,44% semenih zametaka (2008. i 2010. godina) (Tabela 14).



Grafikon 9. Vitalnost sekundarnih semenih zametaka neoprašenih cvetova sorte šljive Pozna plava, tokom trogodišnjih ispitivanja.

Tabela 14. Normalna i nepravilna citološka struktura embrionove kesice sekundarnih semenih zametka neoprašenih cvetova sorte šljive Pozna plava prvih deset dana nakon punog cvetanja, u 2008. i 2010. godini ispitivanja.

Stadijum	Broj sekundarnih semenih zametaka sa normalnom i nepravilnom ek ili nucelusom (%)											
	0. dan		2. dan		4. dan		6. dan		8. dan		10. dan	
	2008.	2010.	2008.	2010.	2008.	2010.	2008.	2010.	2008.	2010.	2008.	2010.
Normalna ek i nucelus												
4 jedra	14,86	11,11										
8 jedara	28,57	22,22		12,50		10,00						
8-jedarna ek, rana faza	42,86	33,33										
Zrela ek	14,86	11,11	10,00									
5-jedarna ek			20,00									
Nepravilna ek ili nucelus												
Nepravilno formirana ek		11,11	20,00		33,33						11,11	
Poremećaj polarizacije u 8-jedarnoj ek		11,11	10,00		11,11		10,00					10,00
Degeneracija jajnog aparata, ostali elementi ek normalno razvijeni			20,00	25,00	11,11	10,00	10,00		10,00		11,11	
Degeneracija cele ek				12,50		10,00		10,00				
Normalna ek, degeneracija nucelusa			20,00	25,00	44,44	70,00	80,00	90,00	90,00	100,00	77,78	90,00
Broj analiziranih ek	7	9	10	8	9	10	10	10	10	9	9	10
Broj semenih zametaka sa:	normalnom ek i nucelusom	100,00	77,77	30,00	12,50	0,00	10,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	funkcionalnom ek	57,72	44,44	30,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	nepravilnom ek i nucelusom		22,22	70,00	62,50	100,00	80,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

ek – embrionova kesica

Prisustvo funkcionalnih embrionovih kesica u 2008. godini, drugog dana od početka punog cvetanja, je uočeno u 30,00% semenih zametaka. Od četvrtog dana u 2008. godini i drugog dana u 2010. godini ispitivanja na osnovu citološke organizacije embrionove kesice nije se više moglo govoriti o postojanju funkcionalnih stadijuma.

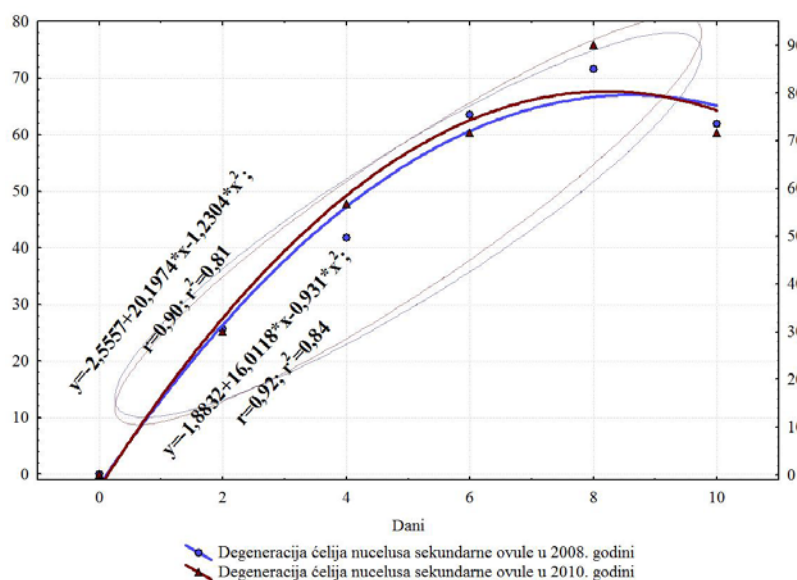
6.4.4.4. Nepravilnosti u strukturi sekundarnih semenih zametaka

U danu početka punog cvetanja u 2010. godini istraživanja, su uočene nepravilnosti u strukturi embrionove kesice kod 22,22% sekundarnih semenih zametaka. One su se odnosile na poremećaj u broju jedara u embrionovoj kesici i poremećaj u polarizaciji elemenata jajnog aparata.

Počev od drugog dana od početka punog cvetanja, u obe godine ispitivanja, rastao je broj semenih zametaka u kojima je uočena degeneracija ćelija nucelusa.

Osmog dana od početka punog cvetanja od ukupnog broja analiziranih sekundarnih semenih zametaka kod 90,00% u 2008. godini i 100,00% u 2010. godina je uočena degeneracija ćelija nucelusa. U pojedinačnim slučajevima, u obe godine, je uočena degeneracija elementa jajnog aparata, cele embrionove kesice i nepravilnosti u samoj strukturi (Tabela 14).

Pošto je pojava degenerativnih procesa u sekundarnom semenom zametku, u najvećem stepenu, vezana za ćelije nucelusa, njihova zavisnost od dana nakon punog cvetanja je najbolje opisana regresionom krivom (Grafikon 10).



Grafikon 10. Prosta nelinearna regresija degeneracije ćelija nucelusa sekundarnog semenog zametka u zavisnosti od dana nakon punog cvetanja, kod neoprašenih cvetova sorte šljive Pozna plava.

U obe godine istraživanja dobile su se visoke vrednosti koeficijenta korelacije u rangju vrlo jake povezanosti, između ispitivanih parametara. Dobijeni koeficijent korelacije i determinacije u 2008. godini istraživanja iznosio je 0,92 i 0,84, dok su se u 2010. godini dobile niže vrednosti (0,90 i 0,81).

6.5. Inicijalno i finalno zametanje plodova

Najviši broj inicijalno zametnutih plodova u 2008. godini ispitivanja dobijen je u varijanti samooprašivanja, a finalno zametnutih plodova u varijanti stranooprašivanja sortom Čačanska najbolja (Tabela 15). Kod svih varijanti oprašivanja u 2008. godini ispitivanja broj finalno zametnutih plodova bio je ispod 10%.

U 2010. i 2011. godini istraživanja, u varijanti stranooprašivanja sortom Presenta kao oprašivačem, dobijen je najviši broj inicijalno (69,54% i 51,85%) i finalno zametnutih plodova (41,45% i 30,92%) (Tabela 16). Najniži broj inicijalno i finalno zametnutih plodova, u obe godine, dobijen je u varijanti slobodnog oprašivanja (12,28% i 5,14%; 0,79% i 2,83%). U varijantama stranooprašivanja sortama Hanita i Čačanska najbolja u obe godine dobijeni su visoke vrednosti inicijalnog i finalnog zametanja plodova. Varijanta samooprašivanja je imala manje zametanje plodova u obe godine.

Po godinama ispitivanja veće vrednosti zametanja plodova su dobijene u 2010. godini istraživanja. Statistička analiza je pokazala značajan uticaj varijante oprašivanja, godine kao i njihovih međusobnih interakcija na broj zametnutih plodova.

Analiza varijanse za inicijalno i finalno zametanje plodova pokazala je statistički značajni efekat interakcije oprašivač \times godine. Značajnost interakcijskih efekata u analizi inicijalnog i finalnog zametanja plodova pokazuje da ima odstupanja od ispoljenih osnovnih zakonitosti.

Analiza interakcijskog efekta za inicijalno zametanje plodova sorte šljive Pozna plava ukazuje da je došlo do odstupanja od osnovnih zakonitosti u 2011. godini kada je u varijanti samooprašivanja i stranooprašivanja sortom Presenta utvrđen veći pad u broju inicijalno zametnutih plodova.

Sa sortama Hanita i Čačanska najbolja kao oprašivačima je dobijena slična tendencija inicijalnog zametanja plodova, koja je imala manji pad u 2011. godini. Usaglašena varijacija inicijalnog zametanja plodova je dobijena i u varijanti slobodnog oprašivanja, ali je bila na različitom nivou.

Tabela 15. Inicijalno i finalno zametanje plodova sorte šljive Pozna plava u 2008. godini istraživanja (%).

Varijanta oprašivanja	Inicijalno zametanje	Finalno zametanje
Pozna plava	73,54±3,15 a	5,83±1,06 ns
Čačanska najbolja	68,77±2,70 a	8,11±1,63 ns
Hanita	67,27±1,13 a	5,98±4,75 ns
Slobodno oprašivanje	38,01±6,37 b	2,98±2,23 ns

Različita mala slova u kolonama pokazuju značajne razlike za $P \leq 0,05$ primenom LSD testa.

Tabela 16. Inicijalno i finalno zametanje plodova sorte šljive Pozna plava u 2010. i 2011. godini istraživanja (%).

Faktor		Inicijalno zametanje	Finalno zametanje	
Oprašivač (A)	Pozna plava	34,63±3,73 c	22,80±3,66 b	
	Čačanska najbolja	46,58±1,68 b	29,07±3,43 ab	
	Hanita	51,98±2,56 ab	30,04±3,60 ab	
	Presenta	60,70±2,70 a	36,19±1,96 a	
	Slobodno oprašivanje	8,71±3,50 d	1,81±2,11c	
Godina (B)	2010.	47,74±3,80 a	31,05±3,85 a	
	2011.	33,30±3,27 b	23,22±2,53 b	
Interakcija oprašivač × godina (A × B)	Pozna plava	2010.	47,53±1,45 bc	33,24±1,09 ab
		2011.	21,74±1,54 d	12,35±3,13 c
	Čačanska najbolja	2010.	51,34±2,55 bc	40,11±2,39 a
		2011.	41,82±0,45 c	18,03±0,51 c
	Hanita	2010.	58,01±4,10 ab	37,57±1,26 a
		2011.	45,94±1,86 bc	22,50±6,08 bc
	Presenta	2010.	69,54±2,50 a	41,45±1,45 a
		2011.	51,85±1,66 bc	30,92±2,73 ab
Slobodno oprašivanje	2010.	12,28±7,14 e	0,79±2,97 d	
	2011.	5,14±1,80 e	2,83±1,81 d	
ANOVA				
A		*	*	
B		*	*	
A × B		*	*	

Različita mala slova u kolonama pokazuju značajne razlike za $P \leq 0,05$ primenom LSD testa.

Zvezdice u kolonama pokazuju značajne razlike za $P \leq 0,05$ (*) primenom F testa.

Izuzev u varijanti slobodnog oprašivanja u ostalim varijantama je utvrđen manji broj finalno zametnutih plodova u 2011. godini, pri čemu je drastičniji pad uočen u varijanti samooprašivanja i u varijanti stranooprašivanja sortom Čačanska najbolja.

6.5.1. Korelaciona analiza između prodora polenovih cevčica u nucelus semenog zametka, desetog dana od oprašivanja, inicijalnog i finalnog zametanja plodova

Dobijene vrednosti Pirsonovog koeficijenta korelacije ukazale su na postojanje statistički značajnog uticaja broja polenovih cevčica prodrlih u nucelus desetog dana od oprašivanja na broj inicijalno i finalno zametnutih plodova (Tabela 17).

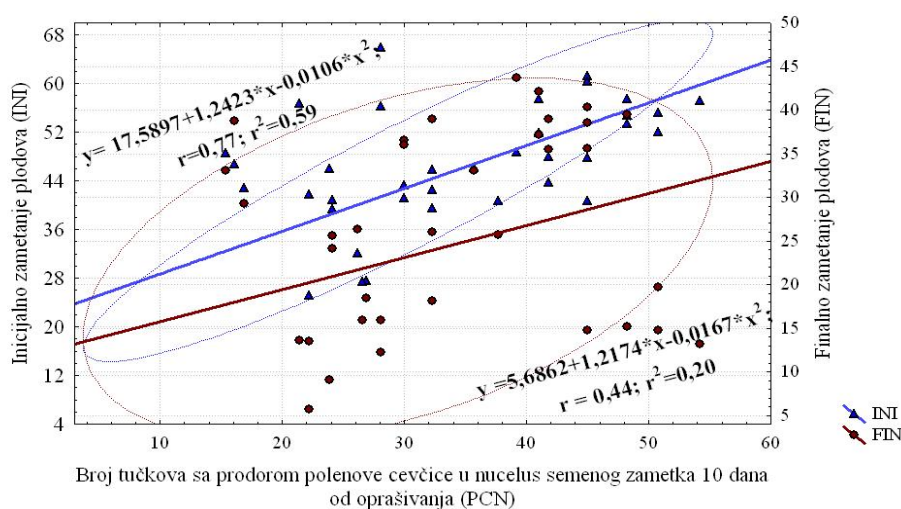
Tabela 17. Vrednosti Pirsonovog koeficijenta korelacije između prodora polenovih cevčica u nucelus, desetog dana od oprašivanja, inicijalnog i finalnog zametanja plodova.

Osobina		Pcn	Ini	Fin
Pcn	Pirsonov koeficijent	1,00		
	p- vrednost	p=----		
Ini	Pirsonov koeficijent	0,77*	1,00	
	p- vrednost	p=0,000	p=----	
Fin	Pirsonov koeficijent	0,44	0,39	1,00
	p- vrednost	p=0,003	p=0,011	p=----

Pcn – broj polenovih cevčica prodrlih u nucelus semenog zametka, desetog dana od oprašivanja;

Ini – inicijalno zametanje plodova; Fin – finalno zametanje plodova

*Označene vrednosti su značajne na nivou $P < 0,05$.



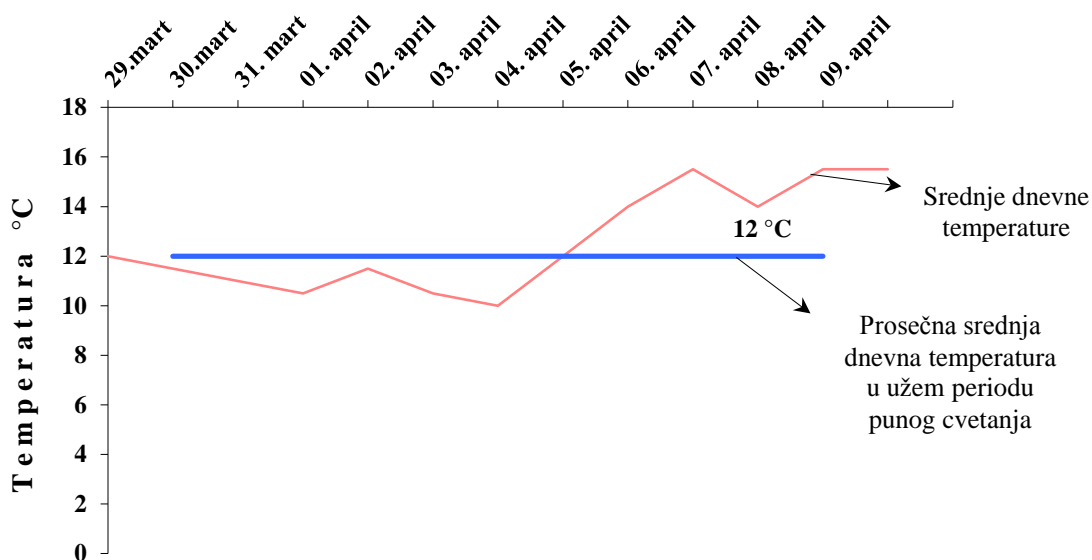
Grafikon 13. Linearna zavisnost broja inicijalno i finalno zametnutih plodova od broja polenovih cevčica prodrlih u plodnik, desetog dana od oprašivanja, kod sorte šljive Pozna plava.

Dijagram broja tučkova sa prodorom polenovih cevčica prodrlih u plodnik, inicijalno i finalno zamenutih plodova, zajedno sa linijom regresije prikazan je u Grafikonu 13.

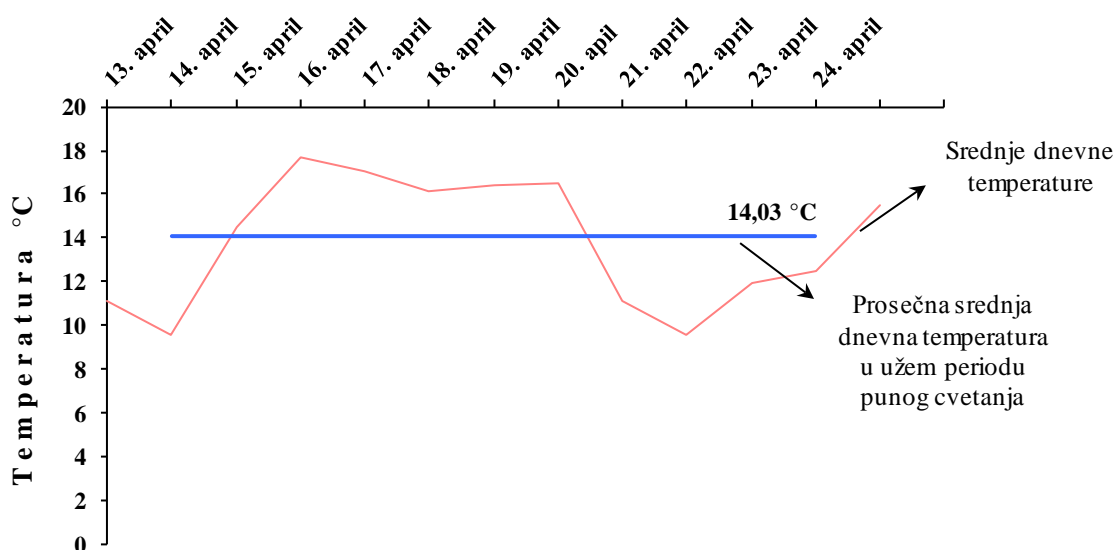
Veza između prodora polenovih cevčica u nucelus i inicijalnog zametanja se kretala u rangu vrlo visoke povezanosti od 0,77, dok je koeficijent determinacije iznosio 0,59. Veza između prodora polenovih cevčica u nucelus i finalnog zametanja kao i veza između inicijalnog i finalnog zametanja se kretala u rangu srednje povezanosti (0,44 i 0,39), dok je koeficijent determinacije za ove dve analizirane zavisnosti iznosio je 0,20 i 0,18.

6.6. Temperaturna kretanja u toku trajanja podfaze punog cvetanja

Tokom trajanja ogleda u poljskim uslovima, prvih deset dana od početka punog cvetanja beležena su temperaturna kretanja. Posmatrano za sve tri godine najviša vrednost za prosečnu srednju dnevnu temperaturu u ispitivanom periodu dobijena je u 2010. godini istraživanja i iznosila je 14,03°C (Grafikon 15).

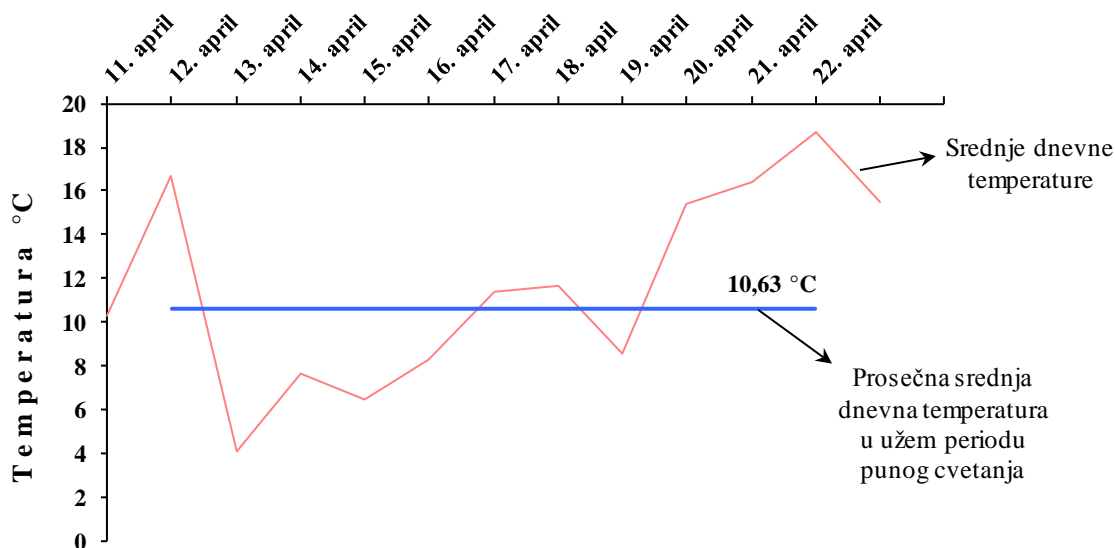


Grafikon 14. Dinamika srednjih dnevnih temperatura u prvih deset dana od početka punog cvetanja, kod sorte šljive Pozna plava, u 2008. godini istraživanja.



Grafikon 15. Dinamika srednjih dnevnih temperatura u prvih deset dana od početka punog cvetanja, kod sorte šljive Pozna plava, u 2010. godini istraživanja.

Najniža prosečna srednja dnevna temperatura u istom periodu zabeležena je u 2011. godini i iznosila je 10,63°C (Grafikon 16). U 2008. godini prosečna srednja vrednost u ispitivanom periodu iznosila je 12°C (Grafikon 14).



Grafikon 16. Dinamika srednjih dnevnih temperatura u prvih deset dana od početka punog cvetanja, kod sorte šljive Pozna plava, u 2011. godini istraživanja.

Najmanje oscilacije srednjih dnevnih temperatura utvrđene su u 2008. godini i kretale su se od 10°C do 15,5°C. U 2010. godini nultog i prvog dana od početka punog cvetanja srednje dnevne temperature su iznosile oko 11°C. U narednih šest dana srednje dnevne temperature su bile između 14,45°C i 17,67°C, a posle toga su bile opet oko 11°C.

Najveće temperaturne oscilacije zabeležene su u 2011. godini. Posle temperatura od 10°C i 16°C na početku punog cvetanja, naredna četiri dana srednje dnevne temperature su imale vrednosti od 4,03°C do 8,2°C, da bi nakon toga bile zabeležene temperature od 11,35°C pa sve do 18,17°C.

7. DISKUSIJA

7.1. Klijavost polena *in vitro*

Ispitivanje kvaliteta polena ima značaja ne samo u programima hibridizacije, već i u razumevanju problema sterilnosti, kao i u evolucionoj ekologiji (Rodriguez-Riano i Dafni, 2000).

Za obezbeđivanje visoke rodnosti voćaka, osim neophodnosti poznavanja procesa oplodjenja, značajno je i poznavanje kvaliteta polena sorti koje se gaje u zasadu. Poznavanje funkcionalne sposobnosti polena je veoma važno sa praktične strane gledišta, za postizanje visoke i redovne rodnosti, jer ponašanje polena *in vitro* može poslužiti kao dobar pokazatelj njegovog ponašanja *in vivo*. Stoga je veoma bitno naći optimalan medijum u kome će klijavost polena i rast polenovih cevčica biti najbolja (Hormaza i Herrero, 1999; Irenaeus i Mitra, 2013). U zasadima gde je glavna sorta samobesplodna, jedan od najbitnijih faktora za uspešnu proizvodnju je pravilan odabir sorti oprašivača. To znači da pored kompatibilnosti sa glavnom sortom, te sorte treba da imaju i približno isto vreme cvetanje i dobru klijavost polena.

U literaturi se do sada može naći nekoliko opisanih eksperimentalnih procedura za ispitivanje funkcionalne sposobnosti polena. Pored citoplazmatskog bojenja, enzimskih reakcija (Dafni i Firmage, 2000), kao osnovni pokazatelj kvaliteta polena Stajić et al. (1989) navode ispitivanje klijavosti polena *in vitro*. Kod različitih vrsta voćaka korišćen je različit sastav medijuma za ispitivanje klijavosti polena. Optimalan medijum je onaj u kome je klijavost polena maksimalna, a prskanje polenovog zrna minimalno (Alcaraz et al., 2011). U ovom radu korišćen je medijum koji je sadržao 12% saharozu, jer se ova koncentracija pokazala kao optimalna za ispitivanje klijavosti polena *in vitro* kod pojedinih predstavnika roda *Prunus* (Cerović, 1989). Osim nutritivne uloge saharoza ima značaja i u osmoregulaciji.

Osim karakteristika medijuma ispitivan je uticaj različitih temperatura na klijanje polenovih zrna *in vitro*. Samim tim utvrđivanje optimalne temperature za

određene faze reproduktivnog procesa može ukazati na poreklo vrste ili na njenu adaptaciju (Irenaeus i Mitra, 2013). Uticaj temperature na klijavost polena *in vitro* zavisi od vrste i sorte. Optimalna temperatura za klijavost polena i rast polenovih cevčica zavisi od vrste, dok varira između sorti (Loupassaki et al., 1997; Mert, 2009).

Ispitivanjem uticaja različitih temperatura kod četiri sorte breskve maksimalna klijavost polena na temperaturi od 10°C dobijena je nakon 8 h, na 20°C posle 2 h, dok je na 30°C maksimum bio već posle 1 h (Hedhly et al., 2005b). Kod višnje optimalna temperatura za klijavost polena *in vitro* se kreće od 15 do 20°C (Cerović i Ružić, 1992a). Kod jedanaest ispitivnih sorti šljive u zavisnosti od temperature kojoj je polen bio izložen dobijena je statistički značajna razlika u klijavosti polena (Koskela et al., 2010).

Za utvrđivanje dobre klijavosti polena i maksimalne dužine polenove cevčice različitih genotipova, neophodno je poznavanje optimalne temperature za dobijanje te klijavosti (Acar i Kakani, 2010). Sakata et al. (2010) su utvrdili da visoke temperature u vreme razvoja antera kod ječma i *Arabidopsis* redukuju endogenu sintezu auksina, dovodeći do sterilnosti polena, pošto egzogeno dodat auksin obnavlja fertilitet polena. Niske temperature tokom razvoja cveta, dovode do pojave defektnih reproduktivnih organa. U vreme mikrosporogeneze niske temperature dovode do mejotičkih iregularnosti. Mejotičke hromozomske iregularnosti koje uključuju pojavu univalenata, multivalenata mogu se uočiti tada u velikim proporcijama kod fragmentacije nukleolusa. Stadijum razvoja polena od mejotičke deobe do kasne mikrosporocitne faze je najosetljiviji na temperaturna kolebanja (Irenaeus i Mitra, 2013).

Na klijavost polena *in vitro* u velikoj meri se može odraziti dejstvo spoljašnjih faktora neposredno pre ili u vreme cvetanja. Kod kajsije je utvrđena negativna korelacija između klijavosti polena i vremena cvetanja. Genotipovi koji kasnije cvetaju imaju slabiju klijavost polena za razliku od genotipova koji ranije cvetaju (Hedhly et al., 2005b). Mičić et al. (1988), ispitivanjem uticaja dva načina čuvanja polena u laboratorijskim uslovima (u suvom stanju i povremenim vlaženjem – na svaka 24 h) iznose dužu vitalnost polena sorte Požegača, u odnosu na polen sorte Stanley. Autori zaključuju da bi se to moglo uzeti u obzir u područjima gde ima čestih klimatskih promena sa vlažnim i suvim periodima tokom perioda cvetanja. U takvim uslovima bi se sorta Požegača pokazala kao bolji oprašivač u odnosu na Stanley. Ispitivanja

klijavosti polena kod morfološki deformisanih ili atipičnih cvetova šljive pokazala su da nema razlike u klijavosti u odnosu na polen tipičnih cvetova (Mičić i Đurić, 1998).

Temperaturni stres (visoke ili niske temperature u odnosu na optimalnu) tokom razvoja antera je povezan sa metabolizmom ugljenih hidrata, dovodeći do smanjivanja rastvorljivog šećera, što utiče na lošu klijavost polena (Pressman et al., 2002). Cerović (1991a) navodi postojanje korelacije između odvijanja procesa mikrosporogeneze i klijavosti polena *in vitro* i *in vivo*. Značajna korelacija između temperature u vreme cvetanja i klijavosti polena je utvrđena kod nekih sorti šljiva (Keulemans, 1984). Negativan uticaj na klijavost polena je pokazala primena fungicida u vreme fenofaze cvetanja kod nekih vrsta voćaka (Cerović et al., 1999). Osim temperature, na klijavost polena ima uticaja vlažnost kao i sastav vazduha (Stanley i Linskens, 1974).

U ovom radu prosečni trogodišnji rezultati ispitivanja klijavosti polena imali su vrednosti od 23,18%, kod sorte Pozna plava, do 47,45% kod sorte Čačanska najbolja. Prosečna klijavost polena sorte Hanita u trogodišnjem periodu iznosila je 45,03%, dok je dvogodišnji prosek za sortu Presenta iznosio 46,48%. Ako se uzmu u obzir navodi Wertheim (1996) i Surányi (2006) koji iznose da klijavost polena ispod 25% ukazuje na slabu klijavost, sorta Pozna plava je pokazala slabu klijavost. Ostale sorte šljiva korišćene kao oprašivači u ovom istraživanju su imale zadovoljavajuću klijavost polena *in vitro*.

Utvrđena klijavost polena se slaže sa dobijenim rezultatima ispitivanja klijavosti polena *in vitro* većeg broja hibrida i sorti šljiva u agroekološkim uslovima Čačka, koje su imale vrednosti od 25,6% do 45,4% (Ogašanović, 1985; Kuzmanović, 2008; Đorđević et al., 2012; Glišić et al., 2012). Milošević (2013) ispitivanjem klijavosti polena *in vitro* sorte šljive Hanita navodi nešto niže vrednosti od 36,60%. Više vrednosti klijavosti polena *in vitro* navode Surányi (2006) za 24 sorte šljive od 0–64,4%, Sharafi (2011) kod 5 ispitivanih sorti šljive iznosi vrednosti 46,2–71,6%, dok Nikolić et al. (2012) kod 6 sorti šljiva navode vrednosti 30,1–67,4%.

Pojava interakcijskih efekata sorta \times godina, kao što je bilo i očekivano, ukazuje na postojanje sorte specifičnosti koja se ispoljila kroz karakteristike polena korišćenih genotipova, a došla je do izražaja u interakciji sa spoljašnjim faktorima koji su imali uticaja u početnim fazama reproduktivnog procesa.

Kod odabira potencijalnog oprašivača, pored neophodnosti preklapanja vremena cvetanja sa glavnom sortom u zasadu, dve su karakteristike još poželjne, a to je: produkcija velike količine i visok kvalitet polena. Mazzeo et al. (2014) navodi postojanje visoke pozitivne korelacije između kvantiteta polena i zametanja plodova. Veća količina polena na žigu tučka favorizuje oplodjenje, kao i kompeticiju između muških gametofita.

Prašenje antera kod šljive počinje dva dana nakon punog cvetanja i traje do 5 dana, manje intenzivno je do 11 h, a najintenzivnije je u periodu 12–14 h (Nyéki i Soltész, 1996). Kod entomofilnih vrsta voćaka prašenje antera je u velikoj meri uslovljeno vremenskim prilikama, naročito temperaturom i padavinama. Niske temperature u vreme punog cvetanja smanjuju prašenje antera. Kiša, osim što dovodi do spiranja polena sa antera, ukoliko traje duže, dovodi do prskanja polenovih zrna u anterama, usled povećanja osmotskog pritiska (Nyéki i Soltész, 1996). Isti autori navode da prašenje nastupa ponovo par sati nakon prestanka padavina.

7.2. Morfometrija polena

Veličina polenovog zrna je manja od 0,1 mm i značajno se razlikuje među biljnim vrstama. Polen entomofilnih biljaka, osim što je veći od polena anemofilnih biljaka, karakteriše se egzinom koja ima različitu skulpturu i ornamentaciju (Iwanami et al., 1988). Istraživanja su pokazala da je kvalitet, morfologija, arhitektura polenovog zrna kao i njegova hemijska kompozicija pod velikim uticajem visokih temperatura (Hedhly et al., 2008).

Dužina polenovog zrna kod ispitivanih sorti šljive u ovom radu se kretala od 53,99 μm do 60,14 μm , dok se širina kretala od 28,22 μm do 29,84 μm . Približne rezultate dužine polenovog zrna od 54,37 μm i širine od 25,00 μm kod četiri ispitivana genotipa šljive sorte Požegača navode Čalić et al. (2013). Mičić (1988) kod tri ispitivane sorte šljive navodi manje vrednosti dužine polenovih zrna od 42,20 do 49,50 μm , dok je širina polena iznosila 25,17–28,00 μm . Mada je dužina polenovih zrna kod ispitivanih sorti u ovom radu dosta varirala, na osnovu dobijenih vrednosti sva se mogu svrstati u grupu krupnih zrna.

Kod svih analiziranih sorti u ovom radu, polenova zrna posmatrana iz ekvatorijalnog pogleda imaju izdužen elipsoidni oblik. Ovakav oblik polenovog zrna se slaže sa dosadašnjim rezultatima autora koji su analizirali polen različitih sorti šljive, i pri tome je oblik karakterisan kao izduženi rotacioni elipsoid ili zrno pšenice (Mičić, 1988; Mičić et al., 1988), eliptično-zašiljen (Gilani et al., 2010; Čalić et al., 2013) ili cilindričan (Evrenosoğlu i Misirli, 2009).

Na osnovu dobijenih vrednosti odnosa dužina/širina polenovog zrna za polenova zrna sorti Čačanska najbolja, Hanita i Presenta se može reći da su izdužena, dok je polenovo zrno sorte Pozna plava 'perprolatnog' oblika (2,06). U dosadašnjoj literaturi analizom odnosa dužina/širina polenovog zrna kod različitih genotipova ili sorti šljive navodi se da su ona spljošteno sferičnog oblika (Gilani et al., 2010), mada najveći broj autora govori o 'prolatnom' obliku polenovog zrna (Evrenosoğlu i Misirli, 2009; Geraci et al., 2012; Čalić et al., 2013). Hebda i Chinnappa (1994) navode da analizom morfologije polena 128 vrsta u okviru 80 rodova iz familije *Rosaceae* oblik varira od izduženog do spljošteno elipsoidnog, mada je kod većine vrsta zastupljen sferoidan oblik polena.

Ispitivanja dužine kolpe su pokazala postojanje razlika kod ispitivanih sorti od 44,93 μm , kod sorte Hanita, do 50,47 μm kod sorte Pozna plava. Dobijeni rezultati se slažu sa rezultatima drugih autora gde dužina kolpe iznosi 80–90% dužine polenovog zrna (Gilani et al., 2010; Čalić et al., 2013).

Analizom morfologije polena kod većeg broja predstavnika roda *Prunus*, različiti autori iznose značaj karakteristika egzine u taksonomskoj i filogenetskoj klasifikaciji (Arazani et al., 2005; Gilani et al., 2010). Skulptura egzine kod svih ispitivanih sorti šljive je strijatna sa širim ili užim grebenima podeljenim brazdama. Sorta šljive Pozna plava imala je najveću širinu brazdi i grebena, a samim tim i najmanji broj grebena na 100 μm^2 ekvatorijalnog područja, dok je sorta Hanita imala najmanju širinu grebena i brazdi, a najveći broj grebena na 100 μm^2 ekvatorijalnog područja. Kod sorte Čačanska najbolja širina grebena i brazdi je bila približno ista, dok je kod sorte Presenta bila nešto veća širina grebena u odnosu na širinu brazde. Najduži i najviše paralelni grebeni koji se pružaju skoro do polova utvrđeni su kod sorte Hanita, dok su kod tri ostale sorte grebeni kratki do srednje dugi i granaju se.

Mićić et al. (1989), ispitivanjima kod trinaest autohtonih i dve standardne sorte šljive na području Bosne, utvrdili su da zastupljenost između grebena i broja tektatnih otvora nije međusobno uslovljena. Isti autori navode nepostojanje korelacije između ornamentike i osnovnih fenotipskih karakteristika ispitivanih sorti. Geraci et al. (2012) su utvrdili postojanje pozitivne korelacije između varijabilnosti ornamentike egzine i oblika ploda analiziranih sorti šljive. Postojanje velike varijabilnosti u ispitivanim parametrima analiziranih sorti šljive, autori dovode u vezu sa njihovim hibridnim poreklom.

Hebda et al. (1991) navode da zrela polenova zrna u suvom stanju imaju stalnu formu koja je konzervativna karakteristika vrste. Analizom morfoloških karakteristika polena sorti šljive u ovom radu, u prvom redu oblika, veličine, otvora kolpi i kao najznačajnije skulpture egzine, svaka sorta je pokazala sortnu specifičnost koja može biti iskorišćena zajedno sa drugim morfološkim karakteristikama u njenom opisu i karakterizaciji.

7.3. Dinamika rasta polenovih cevčica *in vivo*

Oslobađanje polenovih zrna iz antera, njihov transport i dospevanje na žig tučka čini proces oprašivanja. Žig u vreme svoje zrelosti primi znatno veće količine polena nego što je potrebno za oplodjenje jedne ili više jajnih ćelija. U određenim uslovima može doći do izostanka oprašivanja (Burd, 1994) što može biti uslovljeno pojedinačno ili u kombinaciji usled: nedostatka polena, izostajanja oprašivanja ili nedostatka oprašivača (Wilcock i Neiland, 2002). Stoga ovi autori iznose tri faze u kojima se može desiti izostanak oprašivanja: faza pre prašenja, prašenje i period nakon prašenja. Larson i Barrett (2000) navode postojanje prirodnog nivoa kada dolazi do izostajanja oprašivanja i da on ne samo varira između sličnih vrsta već i između iste vrste, u zavisnosti od mesta i godine, zaključujući pri tome da je okuženje u kome se dešava oprašivanje veoma varijabilno.

Uspeh seksualne reprodukcije kod Angiospermi zavisi od serije zavisnih događaja: dospevanja polenovog zrna i adhezije na žig tučka, njegove hidratacije i klijavosti, rasta polenove cevčice kroz tkivo stubića i plodnika i na kraju prodora

polenove cevčice u semeni zametak i oslobađanje spermatičnih jedara u embrionovu kesicu i procesa dvojnog oplodjenja.

Progama faza koja počinje dospevanjem polenovog zrna na žig tučka, karakteriše se specifičnim interakcijama između muškog gametofita i ženskog sporofita (de Graaf et al., 2001). Ispitivanjem intenziteta oprašivanja u varijanti slobodnog oprašivanja (1, 7. i 13. dana nakon punog cvetanja), kod osam analiziranih sorti šljive, sedmog dana je utvrđen znatno veći intenzitet oprašivanja nego prvog dana, zbog čega autor navodi da oprašivanje treba posmatrati kao kontinuiran proces (Keulemans, 1994).

Polenovo zrno je naizgled jednostavan, polu-autonoman jednoćelijski organ koji ima funkciju da dostavi spermatična jedra do semenog zametka i omogući oplodjenje (Cheung i Wu, 2008). U sebi sadrži jedro, citoplazmu sa organelama, ćelijsku membranu i ćelijski zid, ali za razliku od ostalih biljnih ćelija u sebi ne sadrži hloroplaste. U momentu dospevanja polenovog zrna na žig tučka ono je smežurano i u sebi sadrži dve ćelije, veću (vegetativna ćelija sa jedrom u sebi) i manju ćeliju (generativna ćelija sa jedrom u sebi). Pod svetlosnim mikroskopom generativno jedro je okruglasto, dok je vegetativno izduženo. Posmatranje polena elektronskim mikroskopom omogućilo je jasnije sagledavanje sadržaja polena ukazujući da generativna ćelija ima nezavisnu citoplazmu okruženu kompletno razvijenom ćelijskom membranom (Iwanami et al., 1988). Drugom mitotičkom deobom polena ili "mitotičkom deobom polenove cevčice" dolazi do deobe generativnog jedra na dva spermatična jedra.

Nakon dospevanja polenovog zrna na žig tučka dolazi do bubrenja polenovog zrna usled apsorpcije vode. U prvim momentima, iako postoji apsorpcija vode, biološka funkcija ćelijske membrane polena nije još aktivna, tako da se koriste šećeri, aminokiseline i enzimi prisutni u polenu. Nakon oporavka, odnosno, uspostavljanja biološke funkcije, plazma membrana postaje polupropustljiva. Postepeno turgorov pritisak u polenu raste dovodeći do formiranja polenove cevčice kroz jednu od tri kolpe. Kada se uspostavi balans između apsorpcije vode i sinteze materija koje ulaze u sastav polenove cevčice, one nastavljaju da se izdužuju. Međutim, ukoliko je prevelik pritisak unutar polenove cevčice dolazi do njenog prskanja. Unutar polenovog zrna koje klija postoji stalno kretanje protoplazme koje se pretpostavlja da ima ulogu u dostavljanju neophodnih elemenata formiranih na Goldži vezikulama za izdgradnju polenove cevčice (Iwanami et al., 1988). Polenove cevčice nakon formiranja gotovo uvek rastu kroz

stubić ukazujući na postojanje faktora koji usmeravaju njihov rast. Precizan, brz i usmeren rast polenovih cevčica u stubiću i plodniku je složen proces koji uključuje integraciju većeg broja signala i interakciju većeg broja komponenti (McClure i Franklin-Tong, 2006). Polenove cevčice kroz ECM primaju signale od strane ženskog sporofita i gametofita (de Graaf et al., 2001). Pošto su polenovim cevčicama za rast neophodne hranljive materije iz stubića nije neočekivano da je njihov rast u smeru u kom su one dostupne (Herrero, 2000).

U procesu interakcije tučak–polen učestvuje veći broj proteina koji imaju različitu funkciju, vremenski i prostorno usmeravajuću koja mora uključiti i prijem tih signala i njihovu transdukciju (Swanson et al., 2004). Smatra se da hemocijanin, mali bazni protein, ima početnu ulogu u vođenju polenove cevčice (Kim et al., 2003).

Potvrđeni prenosilac signala za usmeren rast polenovih cevčica je citosolni jon kalcijuma (Ca^{2+}). Pored ovog jona ključne ćelijske komponente uključene u usmeren rast polenovih cevčica su aktinski citoskelet, hidrosiprolin i sekretorni proteini koji su neophodni za prepoznavanje i odbacivanje sopstvenog polena (Fu et al., 2001; Sanchez et al., 2004). Takođe, u ECM se nalaze i proteaze koje štite tučak od raznih patogena (Atkinson et al., 1993). U osnovi za ECM se kaže da je “odskočna daska” u interakciji tučak – polen, formirajući optimalne uslove i fiziološko okruženje za klijavost polena i rast polenove cevčice.

Rast polenovih cevčica zavisi od balansa između rastegljivosti ćelijskog zida i turgorovog pritiska (Holdaway-Clarke i Hepler, 2003). Rast polenovih cevčica se dešava u vršnom delu koji može brzo da uvećava i smanjuje svoj volumen u zavisnosti od ekstracelularnih uslova (Zonia i Munnik, 2004). Tokom rasta polenove cevčice periodični poprečni zidovi od kaloze izoluju protoplast polena sa njegovim sadržajem u vršnom delu izdužujuće polenove cevčice.

Rezultati istraživanja su pokazali da se rast polenove cevčice odvija u dva pravca (Zonia i Munnik, 2004). Proces endocitoze se dešava u vršnom kao i u delu neposredno iza gde se dešava i proces egzocitoze, ukazujući time da se rast polenovih cevčica ne dešava na samom vrhu. Zona neposredno iza vrha polenove cevčice u kojoj se dešava proces egzocitoze se pruža od 3–10 μm ispod. Nakon izduživanja polenove cevčice krupna vakuola se formira u bazalnom delu, gde takođe postoji cirkulacija protoplazme, koja se dešava u više pravaca.

7.3.1. Prosečan broj polenovih cevčica u stubiću i plodniku

Analiza rasta polenovih cevčica u ovom radu pokazala je da se prosečan broj polenovih cevčica u gornjoj trećini stubića za trogodišnji period kretao od 19 (varijanta slobodnog oprašivanja) do 62 (varijanta stranooprašivanja). Nije utvrđeno postojanje korelacija između klijavosti polena *in vitro* i broja polenovih cevčica u gornjoj trećini stubića. Do sličnih rezultata su došli i Hormaza i Herrero (1996) koji su kod ispitivanih sorti trešnje konstatovali bolju klijavost polena *in vitro* u odnosu na početnu klijavost u *in vivo* uslovima. Keulemans (1994) navodi da na klijavost polena *in vivo* značajno utiče temperatura, usled čega su vrednosti klijavosti polena *in vivo* često niže od klijavosti *in vitro*. Nepostojanje pozitivne korelacije između ova dva analizirana parametra može se objasniti tako da klijavost polena *in vitro* može ukazati na njegovo potencijalno ponašanje u *in vivo* uslovima. Da li će se potencijal polena ispoljiti zavisi od velikog broja faktora: muškog gametofita, interakcije gametofit – sporofit, ženskog sporofita, kao i od temperaturnih uslova. Analiza koeficijenta korelacije je izračunata iz uzorka, pa se postavlja pitanje njegove signifikantnosti za celu populaciju. Pošto nije rađen koeficijent osnovnog skupa po kome bi se utvrdilo da li je izračunata vrednost dovoljno reprezentativna za donošenje nepristrasne ocene, dobijena vrednost predstavlja samo hipotezu o vrednosti istog koeficijenta osnovnog skupa.

Kod svih ispitivanih varijanti oprašivanja tokom trogodišnjeg perioda utvrđeno je drastično smanjenje broja polenovih cevčica prodljih u plodnik, u odnosu na broj u gornjoj trećini stubića. Smanjenje broja polenovih cevčica prodljih u plodnik bilo je od 10 do 19 puta u ispitivanim varijantama oprašivanja. U radovima većeg broja autora do sada kod različitih vrsta voćaka, ispitivanjem rasta polenovih cevčica u tučku navodi se smanjenje u broju istih u donjim delovima stubića ili u plodniku: mandarine (Distefano et al., 2010); badema (Socias i Company i Alonso, 2004; Alonso i Socias i Company, 2005; Ortega et al., 2010), višnje (Cerović i Ružić, 1992a), trešnje (Radičević, 2013), kajsije (Herrero, 1992); šljive (Kuzmanović 2008, Nikolić i Milatović, 2010). Hormaza i Herrero (1994) navode da je smanjenje broja polenovih cevčica naročito drastično kod onih vrsta gde je broj polenovih zrna koja su klijala na žigu tučka daleko veći nego broj semenih zametaka koji treba da se oplode.

Herrero (1992) navodi da razlog za smanjenja broja polenovih cevčica duž stubića leži u provodnom tkivu stubića, koje ima levkastu formu. Stoga je smanjenje hranljivih materija u ECM, kao i rezervnih materija uslovljeno redukcijom fizičkog prostora, kao i rezervama ugljenih hidrata u tom regionu. Anatomske promene u bazi stubića imaju ulogu u favorizaciji kompeticije između polenovih cevčica i selekcije polena sa mogućim evolucionim i adaptibilnim pozitivnim uticajem (Hedhly et al., 2007; 2009).

Nezavisno od anatomske strukture stubića i njenog uticaja na broj polenovih cevčica, koeficijent korelacije je pokazao postojanje jake pozitivne korelacije između prosečnog broja polenovih cevčica u gornjoj trećini stubića i u plodniku (0,76). To govori o velikom uticaju prosečnog broj polenovih cevčica u gornjoj trećini stubića (nezavisna promenljiva) na broj polenovih cevčica prodrlih u plodnik (zavisna promenljiva). Međutim, koeficijent determinacije od 58% ukazuje da je u ovolikom procentu zavisna promenljiva uslovljena nezavisnom promenljivom, dok ostatak od 42% čini uticaj ženskog sporofita.

Ispitivanjima kod kajsije Albuquerque et al. (2004) navode nepostojanje korelacije između prosečnog broja polenovih cevčica klijalih na žigu i broja polenovih cevčica prodrlih u semeni zametak. Isti autori su uočili brži rast polenovih cevčica kod onih sorti kod kojih je u vreme punog cvetanja konstatovan zreliji stadijum razvoja semenog zametka.

Analizom prosečnog broja polenovih cevčica u tučku i u plodniku najveće vrednosti su dobijene u varijanti stranooprašivanja, dok su najniže utvrđene u varijantama samooprašivanja i slobodnog oprašivanja, tokom sve tri godine ispitivanja. Najveći prosečan broj polenovih cevčica u stubiću (61,15) i u plodniku (3,15) sorte šljive Pozna plava utvrđen je sa sortom Hanita kao oprašivačem. Potom su najveće vrednosti utvrđene pri oprašivanju sortom Presenta (48,34; 2,60) i Čaćanska najbolja (37,81, 2,44). U varijantama samooprašivanja i slobodnog oprašivanja utvrđeno je prosečno manje od trideset polenovih cevčica u gornjoj trećini stubića, a u plodniku manje od dve. Dobijeni rezultati jasno ukazuju na postojanje uticaja genotipa oprašivača na ispitivani parametar.

Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima autora koji navode veće vrednosti prosečnog broja polenovih cevčica u varijanti stranooprašivanja kod: višnje (Cerović, 1994); trešnje (Radičević, 2013) i šljive (Kuzmanović, 2008; Milošević, 2013).

Razlog za male vrednosti prosečnog broja polenovih cevčica u varijanti slobodnog oprašivanja, ako se izuzme donekle i prisustvo sopstvenog polena, je mala kvantitativna zastupljenost polena na žigu tučka. U varijantama slobodnog oprašivanja i samooprašivanja je bio najmanji prosečan broj polenovih cevčica u stubiću i u plodniku, i u ovim varijantama je utvrđeno i najmanje smanjenje u njihovoj brojnosti u plodniku, u odnosu na ostale ispitivane varijante oprašivanja.

Analiza varijanse ukazuje da postoji statistički značajan uticaj interakcije oprašivač \times godina na prosečan broj polenovih cevčica u stubiću i u plodniku. Analizom prosečnog broja polenovih cevčica tokom dvogodišnjeg perioda uočava se usaglašena tendencija prosečnog broja polenovih cevčica u varijantama stranooprašivanja (sortama Hanita i Čačanska najbolja) i samooprašivanja koje, iako su na različitim nivoima, imaju istu tendenciju. Nasuprot njima, u varijantama stranooprašivanja sortom Presenta i slobodnog oprašivanja utvrđena je suprotna tendencija, odnosno u 2011. godini ispitivanja prosečan broj polenovih cevčica je bio veći u odnosu na 2010. godinu. Moguće objašnjenje za ispoljene razlike prosečnog broja polenovih cevčica u gornjoj trećini stubića treba tražiti u delovanju ekoloških faktora, u prvom redu temperature, tokom trajanja fenofaze cvetanja.

U 2011. godini temperatura u periodu cvetanja je bila izuzetno niska, što je i mogući razlog manjeg prosečnog broja polenovih cevčica kod prva tri gore navedena oprašivača. Veći prosečan broj polenovih cevčica u 2011. godini u varijanti oprašivanja sortom Presenta može biti objašnjen njenim poreklom, s obzirom na to da ovaj genotip potiče iz hladnijeg klimata. U varijanti slobodnog oprašivanja on može biti objašnjen time da su niže temperature u periodu punog cvetanja uslovile i produženo cvetanje određenih sorti šljive, a samim tim i njihovo preklapanje u vremenu cvetanja sa sortom Pozna plava, čime je dostupnost i količina polena bila veća.

Pojava interakcijskih efekata oprašivač \times godina za prosečan broj polenovih cevčica u plodniku kod ispitivanih varijanti oprašivanja pokazuje da je došlo do odstupanja od osnovnih tendencija u 2011. godini, kada se u varijantama stranooprašivanja uočava smanjenje u broju polenovih cevčica prodlih u plodnik, dok se

kod samooprašivanja i slobodnog oprašivanja konstatuje veći broj polenovih cevčica prodljih u plodnik. Moguće objašnjenje za ispoljenu razliku prosečnog broja polenovih cevčica prodrlih u plodnik, treba tražiti, isto kao i za prosečan broj polenovih cevčica u gornjoj trećini stubića, u delovanju ekoloških faktora, u prvom redu temperature, tokom trajanja fenofaze cvetanja.

7.3.2. Dinamika rasta polenovih cevčica u tučku

Drugi kvantitativni parametar kojim je analizirana efikasnost rasta polenovih cevčica u tučku sorte šljive Pozna plava jeste dinamika, odnosno, brzina rasta polenovih cevčica u ispitivanim varijantama oprašivanja. Na osnovu dobijenih trogodišnjih i dvogodišnjih rezultata, može se zaključiti da je najbolja dinamika rasta dobijena u varijanti stranooprašivanja. Po godinama ispitivanja najviše vrednosti dinamike rasta polenovih cevčica u ispitivanim regionima tučka u varijanti stranooprašivanja i samooprašivanja su dobijene u 2010. godini istraživanja, dok je u varijanti slobodnog oprašivanja najbolja dinamika utvrđena u 2008. godini istraživanja.

U 2008. godini ispitivanja u varijanti stranooprašivanja (Hanita i Čačanska najbolja) počev od nultog dana od oprašivanja uočava se linearan trend rasta polenovih cevčica. Drugog dana od oprašivanja polenove cevčice se uočavaju u drugoj trećini stubića, četvrtog dana u trećoj trećini stubića, šestog dana u tkivu plodnika, osmog dana u mikropili i desetog dana u nucelusu, gde se u obe varijante konstatuje u preko 50% tučkova prodor polenove cevčice u nucelus semenog zametka. Približno ista ali slabija dinamika rasta polenovih cevčica u istoj godini je uočena u varijanti samooprašivanja i slobodnog oprašivanja. Drugog i četvrtog dana od oprašivanja u ove dve varijante oprašivanja polenove cevčice su se uočavale u drugoj trećini stubića, šestog dana u tkivu plodnika, osmog dana u tkivu plodnika i u mikropili, a desetog dana u nucelusu (u obe varijante bilo je manje od 20% tučkova sa prodorom polenove cevčice u nucelus semenog zametka).

U 2010. godini ispitivanja, u varijanti stranooprašivanja (Hanita, Čačanska najbolja i Presenta) i samooprašivanja utvrđen je isti trend rasta polenovih cevčica, iako su dobijene različite vrednosti. Drugog, četvrtog i šestog dana od momenta oprašivanja, dobijena je ista tendencija rasta polenovih cevčica kao i u 2008. godini ispitivanja. Osmog i desetog dana od oprašivanja u ove tri navedene varijante oprašivanja utvrđen

je prodor polenove cevčice u nucelus semenog zametka. U varijanti stranooprašivanja broj tučkova sa prodorom polenove cevčice u nucelus semenog zametka se kretao 8–49%, a kod samooprašivanja je imao vrednosti 18–28%. Varijanta slobodnog oprašivanja je imala najslabiju dinamiku rasta polenovih cevčica, gde su, zaključno sa osmim danom od momenta oprašivanja, najduže polenove cevčice uočene u trećoj trećini stubića. Desetog dana od oprašivanja, u manje od 50% tučkova, je uočen prodor polenove cevčice u tkivo plodnika.

U 2011. godini ispitivanja, dinamika rasta polenovih cevčica u varijanti stranooprašivanja (Hanita, Čačanska najbolja i Presenta) i samooprašivanja je bila slična dinamici rasta polenovih cevčica utvrđenoj kod stranooprašivanja u 2008. godini ispitivanja. Desetog dana od oprašivanja u 2011. godini, u svim ispitivanim varijantama je uočen drastično manji broj tučkova (manje od 30%) u kojima polenove cevčice prodiru u nucelus. Dinamika rasta polenovih cevčica u varijanti slobodnog oprašivanja se u velikoj meri podudarala sa dinamikom rasta u 2010. godini, s tom razlikom da je desetog dana od oprašivanja u ovoj godini u manje od 30% tučkova uočen prodor polenove cevčice u tkivo plodnika.

U dosadašnjoj literaturi kod različitih vrsta voćaka autori navode brži rast polenovih cevčica u varijanti stranooprašivanja: kod masline (Vuletin Selak et al., 2014), višnje (Cerović, 1992; 1994), trešnje (Radičević, 2013) i šljive (Stott et al., 1973; Kuzmanović, 2008; Jia et al., 2008). Kod badema sreću se oprečni rezultati ispitivanja brzine rasta polenovih cevčica u varijantama samooprašivanja i stranooprašivanja, od bržeg rasta u varijanti stranooprašivanja (Godini, 1981; Alonso i Socias i Company, 2005, Ortega et al., 2010), bržeg rasta pri samooprašivanju (Martínez-García et al., 2012), do toga da između ispitivanih varijanti oprašivanja nije uočena razlika u brzini rasta (Socias i Company i Felipe, 1987; Dicenta et al., 2002).

Kod predstavnika roda *Prunus* rast polenovih cevčica u stubiću je brži u odnosu na plodnik, iako je prostorno kraći put koji polenove cevčice treba da pređu u plodniku nego u stubiću (Herrero, 1992). Kod kajsije Rodrigo i Herrero (2002) navode da se u ispitivanim varijantama oprašivanja polenove cevčice uočavaju u bazi stubića za tri do četiri dana, a da se njihov prodor u nucelus uočava sedmog dana od momenta oprašivanja. Do sličnih rezultata se došlo i analizom dinamike rasta polenovih cevčica kod breskve, gde polenove cevčice stižu do baze stubića za sedam dana, da bi potom

mirovale sve dok ćelije obturatora ne uđu u sekrecionu fazu (Herrero i Arbeloa, 1989). Kod višnje polenove cevčice se u bazi stubića uočavaju dva do tri dana nakon oprašivanja, dok se prodor u nucelus uočava šestog do osmog dana posle oprašivanja (Stösser i Anvari, 1981). Međutim, Cerović (1994) kod višnje analizom dinamike rasta polenovih cevčica, u tri varijante oprašivanja, navodi znatno raniji prodor polenovih cevčica u semeni zametak, već četvrtog dana od oprašivanja.

Visoka pozitivna korelacija (0,72) ukazuje da postoji jaka veza između broja polenovih cevčica u plodniku i broja polenovih cevčica prodrlih u nucelus semenog zametka. Koeficijent determinacije od 52% pokazuje da se u ovom procentu može objasniti broj polenovih cevčica prodrlih u nucelus sa brojem polenovih cevčica prodrlih u plodnik. Dobijena vrednost koeficijenta determinacije nešto je niža nego vrednost dobijena za zavisnost prodora polenovih cevčica u plodniku u odnosu na broj polenovih cevčica u stubiću, ukazujući time da je u ovom stadijumu još veći uticaj ženskog gametofita. Matematički model je pokazao da maksimalna udaljenost na kojoj ženski gametofit može da privuče polenove cevčice svojim sekretornim produktima nije previše velika (Higashiyama, 2002).

Ispitivanja na izolovanim embrionovim kesicama kod *Torenia fournieri* nakon laserskog odstranjivanja sinergida pokazala su da su one neophodne i dovoljne za privlačenje polenovih cevčica. Jajna ćelija i centralna ćelija ili nisu uključene ili nisu u mogućnosti da proizvedu dovoljnu količinu sekreta koji ima ulogu u usmerenom rastu polenovih cevčica (Dresselhaus i Márton, 2009).

Osim postojanja jake pozitivne korelacije broja polenovih cevčica prodrlih u nucelus desetog dana od oprašivanja, analiza varijanse je pokazala postojanje i interakcijskih efekata u odnosu oprašivač × godina za prodor polenovih cevčica u nucelus. Kod svih analiziranih varijanti oprašivanja kod kojih je uočen prodor polenovih cevčica u nucelus semenog zametka primećen je linearni trend pada broja polenovih cevčica u 2011. u odnosu na 2010. godinu ispitivanja.

U varijanti stranooprašivanja sortama Hanita i Čačanska najbolja uočen je paralelizam tendencija, dok su odstupanja uočena u samooprašivanju i sa sortom Presenta kao oprašivačem. Mogući uzrok ovakvih interakcijskih veza može se tražiti kako u interakcijskim odnosima muški gametofit : ženski sporofit tako i u uticanju spoljašnjih faktora, u prvom redu temperature, na završne korake u progamnoj fazi.

7.3.3. Zastupljenost inkompatibilnih polenovih cevčica u stubiću

Autoinkompatibilnost ili samobesplodnost kod voćaka sprečava samooplođenje prepoznavanjem i odbacivanjem sopstvenog ili genetski identičnog polena (McClure i Franklin-Tong, 2006). Genetska kontrola autoinkompatibilnosti je regulisana multialelnim *S*-lokusom, kod koga je kompatibilnost ukrštanja određena haploidnim genomom polena i diploidnim genomom tučka. Zaustavljanje rasta polenove cevčice se dešava ukoliko je *S*-alel koji poseduje polenovo zrno zajednički sa jednim od dva *S*-alela tučka. Dva kompletno različita *S*-lokus gena su uključena u prepoznavanje i odbacivanje sopstvenog polena: *S*-RNaza (glikoprotein sa ribonukleaznom aktivnošću) kao *S*-komponenta tučka i *F*-box gen, *SLF* (*S*-lokus *F*-box) (kod *Prunus mume*) i *SFB* (*S*-haplotip-specifičan *F*-box gen) (kod *Prunus dulcis*, *Prunus avium* i *Prunus cerasus*), kao *S*-komponenta polena, čija funkcija u samobesplodnoj reakciji još nije utvrđena (Hauck et al., 2006).

Samim tim što gametofitni sistem inkompatibilnosti sprečava samooplođenje dovodeći do smanjenog zametanja plodova, oprašivanje sa kompatibilnim polenom je izuzetno bitno. Kod voćaka pojava autoinkompatibilnosti isključuje jednosortne zasade i zahteva prisustvo dva ili tri kompatibilna oprašivača (Dicenta et al., 2002). Ispitivanje samooplodnosti, kao i pogodnosti određenih oprašivača najčešće je određivano zametanjem plodova ili ispitivanjem rasta polenovih cevčica u stubiću nakon oprašivanja. Identifikacija *S*-RNaza i *SFB* gena omogućila je karakterizaciju *S*-haplotipa kod predstavnika familije *Rosaceae* pomoću PCR analize. Ova metoda je nezavisna od perioda cvetanja i sezone, jer se kao materijal za analizu koristi vegetativo tkivo (Kitasiba et al., 2007).

Korišćenjem fluorescentno mikroskopske metode bojenja sa anilin plavim broj inkompatibilnih polenovih cevčica se kretao od 1,10% u varijanti stranooprašivanja sortom Presenta, do 4,84% kod samooprašivanja. U najvećem broju slučajeva inkompatibilne polenove cevčice su zaustavljale rast u gornjoj trećini stubića. Izuzev slobodnog oprašivanja, u 2010. godini oprašivanja, kod ostalih varijanti oprašivanja, osim što je utvrđen najveći broj inkompatibilnih polenovih cevčica, u varijanti stranooprašivanja sortama Hanita i Čačanska najbolja su uočene inkompatibilne polenove cevčice u drugoj trećini stubića. Približno isti broj inkompatibilnih polenovih

cevčica utvrđen je u varijanti samooprašivanja i slobodnog oprašivanja u sve tri godine ispitivanja, što je verovatno uslovljeno, pored ostalog, i prisustvom sopstvenog polena na žigu u varijanti slobodnog oprašivanja. Nešto manji broj inkompatibilnih polenovih cevčica u varijanti stranooprašivanja sortom Čačanska najbolja (3,06), se može objasniti time da je ona roditelj sorte Pozna plava. Najmanji broj (manje od 1,3%) inkompatibilnih polenovih cevčica je utvrđen u varijanti stranooprašivanja sortama Presenta i Hanita.

Gametofitni sistem inkompatibilnosti uključuje nepravilno ponašanje polenovih cevčica i veliko taloženje kaloze u njima (Ünal et al., 2013). Kod ovog sistema inkompatibilnosti reakcija odbacivanja polena se najčešće dešava u gornjoj trećini stubića i praćena je jakom depozicijom kaloze u zidovima polenovih cevčica, širim kaloznim čepićima kao i njenim taloženjem u samom vrhu dovodeći do formiranja karakterističnog proširenja vrha polenove cevčice.

Dobijeni rezultati se slažu sa rezultatima ispitivanja kod većeg broja predstavnika roda *Prunus*: višnje (Cerović 1992, 1994), kajsije (Milatović i Nikolić 2005, 2007b), šljive (Kuzmanović 2008; Milošević 2013; Đorđević et al., 2014), gde je pojava inkompatibilnih polenovih cevčica vezana uglavnom za region gornje trećine stubića. Ispitivanjem samooplodnosti kod 37 sorti kajsije Milatović i Nikolić (2007b) navode prisustvo inkompatibilnih polenovih cevčica koje zaustavljaju rast u nižim delovima plodnika. Isti rezultati pojave inkompatibilnih polenovih cevčica u donjim delovima tučka uočeni su kod osam sorti kajsije analiziranih u varijantama samooprašivanja i stranooprašivanja (Milatović et al., 2010).

Kuzmanović (2008), analizom rasta polenovih cevčica u stubiću sorte šljive Čačanska lepotica u tri varijante oprašivanja (slobodno oprašivanje, stranooprašivanje i samooprašivanje) konstatuje prisustvo inkompatibilnih polenovih cevčica u gornjoj trećini stubića od 12,1 do 17%. Milošević (2013), ispitivanjem rasta polenovih cevčica u stubiću kod tri sorte šljive je utvrdio prisustvo inkompatibilnih polenovih cevčica kod 3,70–23,81% tučkova.

Nikolić i Milatović (2010) analizom rasta polenovih cevčica kod 18 sorti evropske šljive, na osnovu toga da li su polenove cevčice stigle u bazu stubića ili ne, su izvršili podelu ispitivanih sorti u dve grupe: samooplodne i samobesplodne. Za samooplodnu sortu je smatrana ona kod koje je u bazi većine stubića uočena bar jedna

polenova cevčica, dok je kod samobesplodnih sorti zaustavljanje rasta polenovih cevčica bilo u gornjoj trećini stubića.

López et al. (2001), korišćenjem iste metode fluorohromnog bojenja, navode da kada u najmanje 25–30% tučkova ima prodora polenove cevčice u plodnik analizirana sorta se može smatrati kao samooplodna.

Zbog tri komponente genoma teško je naći istu alelnu formulu ili strukturu za dve domaće šljive, pošto svaki genom poseduje svoj *S*-gen sa multiplim alelima. Zbog tog razloga svaka sorta šljive, koja ima fertilan polen, može biti oprašivač drugoj sorti šljive, ali u različitom stepenu (Selesses i Bonnet, 1994). Zbog poliploidije i kompleksne strukture genoma domaća šljiva je poslednja proučena vrsta iz subfamilije *Prunoideae* (Selesses i Bonnet, 1994; Botu et al., 2002; Hegedüs i Halász, 2007; Tao i Iezzoni, 2010). Iz tog razloga još nisu definisane kompatibilne grupe kod šljive i nema pouzdanih informacija o genetičkom diverzitetu samobesplodnih alela (Kota i Lācis, 2013).

7.3.4. Specifičan rast polenovih cevčica u plodniku

U dosadašnjoj literaturi, kod predstavnika roda *Prunus* rast polenovih cevčica se opisuje kao klasičan, u kome polenove cevčice rastu pravo i ne račvaju se. Pojava da se polenove cevčice uvijaju, manje ili više granaju je najčešće opisivana kao haotičan, specifičan rast ili anomalije u rastu polenovih cevčica (Herrero, 2000). Tokom rasta polenovih cevčica u plodniku uočljive su promene u nekoliko struktura koje su u neposrednoj interakciji sa polenovim cevčicama.

Praćenjem rasta polenovih cevčica u ispitivanim varijantama oprašivanja je uočen specifičan rast u zoni obturatora, dok se u semenom zametku to uočavalo u egzostomi (otvor koga čini spoljašnji sloj integumenta), mikropili (otvor unutrašnjeg sloja integumenta), nucelusu kao i u samom megagametofitu, na osnovu čega se može govoriti o postojanju određene kontole u rastu polenovih cevčica od strane ženskog sporofita i gametofita.

Sporofitna kontrola rasta polenovih cevčica u plodniku je regulisana u dve zone: tkivu plodnika i sporofitnom tkivu semenog zametka. Faza razvoja ćelija u tim strukturama igra glavnu ulogu u regulaciji. Sekretorna struktura koja ima ulogu u

usmerenom rastu polenovih cevčica u plodniku je obturator. On predstavlja protuberancu karpelarnog zida plodnika i čini vezu između egzostome semenog zametka i baze stubića. Polenova cevčica raste po površini ćelija placente oslanjajući se na njihove sekretorne produkte. Prisustvo arabinogalaktana (Gane et al., 1995) ukazuje da je sastav sekretornih produkata ćelija placente sličan onom u intercelularnim prostorima stubića. Ulaskom ćelija obturatora u sekretornu fazu dolazi do isčezavanja skroba i pojave kaloze, koja se postepeno širi zahvatajući ceo obturator (Arbeloa i Herrero, 1987). Ispitivanjem rasta polenovih cevčica u plodniku višnje sorte Čačanski rubin pojava njihovog specifičnog rasta je prvo uočena u regionu obturatora, u čijim ćelijama je utvrđeno prisustvo skrobnih zrna (Cerović, 1994). Međutim, autor navodi da nije uočena fluktuacija u pogledu hidrolize skrobnih zrna, tako da se primenjenom tehnikom ne može jasno potvrditi njihova neposredna uloga u kontroli rasta polenovih cevčica. Kod nekih sorti trešnje i višnje ispitivanjem rasta polenovih cevčica u plodniku u zoni obturatora je utvrđen čest slučaj njihovog uvijanja, grananja i prestanka daljeg usmerenog kretanja ka mikropili (Stösser i Anvari, 1981).

U ovom radu prvo je u regionu obturatora bila uočena pojava specifičnog rasta polenovih cevčica u plodniku. Jedino je u varijanti oprašivanja sortom Čačanska najbolja uočen specifičan rast polenovih cevčica u ovom regionu pre i nakon prodora polenove cevčice u nucelus semenog zametka. U varijanti oprašivanja sortom Presenta u ovom regionu nisu uočene polenove cevčice koje su se odlikovale specifičnim rastom. U varijanti slobodnog oprašivanja samo je u jednoj godini, i u ovom regionu, uočen specifičan rast polenovih cevčica. U varijantama samooprašivanja i stranooprašivanja sortom Hanita uočen je specifičan rast pre i nakon prodora polenove cevčice u nucelus semenog zametka samo u jednoj godini, s tim da ni u jednoj varijanti nije u istoj godini uočen specifičan rast u ta dva regiona. Ono što je zajedničko za sve varijante oprašivanja jeste da se specifičan rast u tom regionu karakterisao manjim ili većim grananjem polenovih cevčica.

Za pojavu specifičnog rasta polenovih cevčica u plodniku postoje dva potencijalna, ali ne i isključiva, objašnjenja. Jedno od njih može biti da je rast polenove cevčice u plodniku pod uticajem hemotropnih činilaca i da variranja u njihovom intezitetu dovodi do grananja polenovih cevčica. Drugo moguće objašnjenje je to da je

rast polenovih cevčica u stubiću duž longitudinalnih ćelija provodnog tkiva, dok se u plodniku one susreću sa drugačijim tipom ćelija (O'Brien, 1994).

Kod badema je uočen pozitivan uticaj prisustva polenovih cevčica u tučku na stadijum razvoja semenih zametaka (Pimienta i Polito, 1983). Nasuprot ovim autorima, Herrero i Arbeloa (1989) navode da promene u tučku utiču na rast polenovih cevčica, kao i da je pojava njihovog haotičnog kretanja vezana za stadijum razvoja semenih zametaka, kao i da polenove cevčice prodiru samo u zrele semene zametke (Herrero, 1992).

Pojava specifičnog rasta polenovih cevčica u mikopili u semenim zamecima sorte šljive Pozna plava u kojima nije ili jeste došlo do prodora u nucelus semenog zametka se karakterisala formiranjem klupka od polenove cevčice, koji je bio manje ili više zadebljao.

Sekrecija ćelija placente plodnika i semenog zametka je neophodna za dalji rast polenovih cevčica. Kod nekih voćaka sekrecija je prisutna od početka punog cvetanja, dok se kod drugih dešava u određeno vreme, tj., kada ćelije dostignu određeni stepen razvoja (Herrero, 2000). Smatra se da je usmereno kretanje polenovih cevčica u mikopili pod uticajem atraktanata od strane sinergida (Higashiyama i Hamamura, 2008). Unutrašnji sloj integumenta naleže direktno na nucelus i u mikropilarnom delu formira otvor mikropilu. Spoljašnji sloj integumenta se nastavlja na unutrašnji i on takođe formira otvor u mikropilarnom kraju, egzostomu. Nedugo potom ćelije egzostome ulaze u sekretornu fazu koja je praćena pojavom kaloze. Prema navodima Herrero (2000) samo semeni zameci kod kojih je skrob prisutan u ćelijama egzostome u vreme kada polenove cevčice stignu do njih su u stanju da uđu u sekretornu fazu. Isti autor navodi da samo u ove semene zametke prodiru polenove cevčice. Nakon prodora u egzostomu polenove cevčice nailaze na ćelije unutrašnjeg sloja integumenta koje čine mikropilu. Ove ćelije se u vreme punog cvetanja ne razlikuju od okolnih ćelija. Ulazak u sekretornu fazu i pojava eksudata u mikropilarnom kanalu praćena je prodorom polenovih cevčica. Istraživanja su pokazala da samo one ćelije do mikropilarnog kanala koje imaju skrob u sebi mogu ući u sekretornu fazu (Cerović, 1994). Za uspešan prodor polenovih cevčica neophodna je sekrecija ćelija u oba sloja (Herrero, 2000). Gradijent γ amino buterne kiseline (GABA) smatrao se kao jedan od atraktanata u usmerenom rastu

polenovih cevčica u mikropilarnom regionu, sve dok *in vitro* ispitivanja nisu pokazala da on nema uticaja na usmeren rast polenovih cevčica (Palanivelu et al., 2003).

Nakon prolaska kroz mikropilu polenova cevčica prodire u ženski gametofit kroz jednu od sinergida. Sinergide luče atraktante koji vode polenovu cevčicu do ženskog gametofita (Higashiyama et al., 2003). Prema Weteringsu i Russellu (2004) one verovatno sadrže faktore koji kontrolišu prestanak daljeg rasta polenove cevčice, njihovo pražnjenje i fuziju gameta. Higashiyama i Hamamura (2008), smatraju da su atraktanti formirani od strane sinergida specifični za vrstu voćaka. Ispitivanja *in vitro* na *Torenia fournieri* su pokazala da kada se njihovi semeni zameci pomešaju sa semenim zamecima drugih vrsta, polenove cevčice pokazuju tendenciju da rastu ka embrionim kesicama njihove vrste. Higashiyama et al. (2006) navode da su atraktanti specifični za vrstu voćaka, i da svaka vrsta ima drugačije molekule kao atraktante, što objašnjavaju kao reproduktivnu barijeru.

Pojava specifičnog rasta polenovih cevčica u zoni mikropile, pre i nakon prodora polenove cevčice u nucelus semenog zametka, primećena je izuzev u varijanti slobodnog oprašivanja, kod svih ostalih ispitivanih varijanti oprašivanja. Samo u ovom regionu plodnika polenove cevčice u varijanti stranooprašivanja sortom Presenta su pokazivale specifičan rast. Ispitivanjem rasta polenovih cevčica u plodniku sorte šljive Čačanska lepotica u tri varijante oprašivanja broj polenovih cevčica koje su se karakterisale specifičnim rastom se kretao od 6,7 do 7,9% (Đorđević et al., 2010).

Dugo vremena kao potencijalni atraktanti su smatrani joni Ca^{2+} , uglavnom zbog njihove velike koncentracije u sinergidama (Dumas i Gaude, 2006). Međutim, ispitivanja uticaja različitih koncentracija jona Ca^{2+} u *in vitro* uslovima su pokazala nepostojanje njihovog uticaja na usmeren rast polenovih cevčica, stoga Higashiyama et al. (2006) zaključuju da oni ili nemaju uticaja kao atraktanti ili su deo veće grupe atraktanata. Različita *in vitro* ispitivanja su pokazala da se usmeren rast polenovih cevčica i oslobađanje spermatičnih jedara pre može podvesti pod specifičnost same vrste, nego da se to generalno vezuje za jone Ca^{2+} ili GABA (Dresselhaus i Mårton, 2009). Nakon prodora polenove cevčice u jednu od sinergida, privlačenje polenovih cevčica prestaje iako je prisutna još jedna sinergida (Higashiyama et al., 2001). Autor navodi da se atraktanti ili više ne luče, ili dolazi do njihove degradacije, i/ili dolazi do odbijanja u rastu polenovih cevčica.

Kod kukuruza je identifikovan prvi gen koji od strane ženskog gametofita kodira potencijalne atraktante polenovih cevčica u mikropilarnom delu (*ZmEAI-Zea mays EGG APPARATUSI*). Taj gen je specifično izražen u jajnom aparatu, čija funkcija opada nakon oplodjenja (Punwani i Drews, 2008). *ZmEAI* kodira mali protein od 94 aminokiseline za koji se pretpostavlja da je plazma membranski protein lokalizovan na mikropilarnim ćelijama nucelusa zrele embrionove kesice.

7.4. Histološka ispitivanja plodnika

7.4.1. Položaj i morfološki izgled primarnog i sekundarnog semenog zametka u plodniku

Kod predstavnika roda *Prunus* u plodniku se nalaze dva semena zametka i oplodjenje jednog od njih je neophodno za zametanje plodova jer oni nemaju mogućnost zametanja partenokarpnih plodova (Hartmann i Neumuller, 2009). Dva semena zametka su prisutna u plodniku, ali se samo jedan dalje razvija u seme, dok drugi degeneriše neposredno posle punog cvetanja (Arbeloa i Herrero, 1991). U vreme punog cvetanja oba semena zametka imaju približno istu količinu skrobnih zrna, ali potom u jednom od njih dolazi do naglog smanjenja nivoa skroba što je praćeno pojavom kaloze. Taj semeni zametak ubrzo zahvata proces degeneracije i on atrofira, dok drugi nastavlja sa razvojem u plodniku (Rodrigo i Herrero, 1998).

Na osnovu dvogodišnjih ispitivanja plodnika sorte šljive Pozna plava, u oprášenoj i u neoprášenoj varijanti, može se zaključiti da se radi o normalnoj morfološkoj strukturi koja je do sada opisana kod većeg broja predstavnika roda *Prunus*: badema (Cousin i Mataoui, 1998), breskve (Arbeloa i Herrero, 1991), kajsije (Rodrigo i Herrero, 1998) i višnje (Cerović, 1994), a koja se karakteriše prisustvom dva semena zametka u plodniku koja su za zid placentе pričvršćena pomoću funikulusa. Tokom dvogodišnjih ispitivanja nisu primećeni plodnici koji su u sebi imali veći broj semenih zametaka. Semeni zametak kao specijalizovana struktura, nastaje od placentе zida plodnika i u njemu se unutar nucelusa formira embrionova kesica. Tri osnovne strukture koje čine semeni zametak su: nucelus, dva integumenta i funikulus (Reiser i Fischer, 1993). Činjenica da se kod većine Angiospermi embrionova kesica nalazi

unutar jasno diferenciranih struktura semenog zametka ukazuje da ova tkiva imaju ulogu tokom razvoja embrionove kesice, odnosno tokom njenog formiranja. Analiza tkiva semenog zametka kod breskve je pokazala su ona daleko od pasivnih struktura i da prolaze kroz određeni broj promena tokom trajanja životnog veka cveta (Arbeloa i Herrero, 1991). Autori iznose da semeni zamecak osim što ima zaštitnu ulogu, ima značaja i kao izvor hranljivih materija. Kvalitet cveta je definisan kao njegov kapacitet da postane plod i ovaj parametar je u direktnoj vezi sa rezervama skoba u semenom zametku (Rodrigo i Herrero, 1998).

Da bi se ispitaio uticaj ishranjenosti cveta na razvoj semenog zametka u periodu nakon punog cvetanja, kod kajsije je ispitan sadržaj skroba u njima u dve varijante, oprašenoj i neoprašenoj (Rodrigo et al., 2000). Dobijeni rezultati su pokazali, sa jedne strane, da devetog dana nakon oprašivanja kod oprашenih i neoprašenih cvetova dolazi do povećanja težine semenih zametaka ukazujući time da je početni razvoj cveta nezavistan od oprašivanja i oplodjenja. Sa druge strane, zastupljenost skrobnih zrna u ćelijama nucelusa je pokazao jaku negativnu korelaciju sa težinom semenih zametaka, odnosno, nivo skroba je opadao kako je njihova veličina rasla.

Semeni zameci su sastavljene iz dva sloja integumenta – spoljašnjeg i unutrašnjeg. Dosadašnji rezultati su pokazali da osim zaštitne imaju i nutritivnu ulogu tokom trajanja reproduktive faze. Embrionova kesica u nucelusu je pokrivena sa nekoliko slojeva ćelija, koji sačinjavaju nucelusnu kapu.

7.4.2. Organizacija normalne embrionove kesice u primarnom i sekundarnom semenom zametku

Tokom megasporogeneze diploidna megaspore prolazi kroz proces mejotičke deobe formirajući četiri haploidne megaspore. Tokom megagametogeneze megaspore najbliža halaznom delu se dalje razvija u haploidni ženski gametofit (Lersten, 2004).

Proces megasporogeneze nije uočen u ovom istraživanju, obzirom da se završava pre početka punog cvetanja. Megagametogeneza se karakteriše serijom od tri mitotske deobe, gde dolazi do deobe jedara bez deobe citoplazme, tako da se nakon treće deobe formira krupna koenocitna ćelija, sa krupnom vakuolom u sredini i rasporedom jedara $4n+4n$, tj. po četiri jedra na mikropilarnom i halaznom polu. Tokom

treće mitotske deobe ili neposredno po njenom završetku formiraju se fragmoplasti i ćelijske ploče između sestrinskih i nesestrinskih jedara tako da je uskoro cela embrionova kesica okružena ćelijskim zidom. Proces celularizacije embrionove kesice se dešava odmah nakon završetka treće mitotske deobe (Russell, 1993). U ovoj fazi jasno se mogla uočiti polarizacija jedara na dva pola, pri čemu su u halaznom delu jedra postavljena jedno iznad drugog u pravcu mikropila – halaza, dok se jedra u mikropilarnom kraju nalaze jedna do drugih. Tokom procesa celularizacije jedna ćelijska ploča se formira između dve sinergide, a druga između jajne ćelije i centralnog jedra. Polarnost elemenata embrionove kesice uspostavlja se nakon završene celularizacije osmojedarnog stadijuma (Yang et al., 2010). Isti autori navode postojanje gradijenta auksina tokom procesa celularizacije embrionove kesice za koji smatraju da ima uticaja na proces ćelijske diferencijacije unutar embrionove kesice kod vrsta roda *Arabidopsis*.

U varijanti slobodnog oprašivanja i varijanti bez oprašivanja u 2008. godini, nultog dana fiksiranja (vreme punog cvetanja), utvrđeni su pojedinačni slučajevi u kojima je stadijum embrionove kesice bio četvororedarni ili osmojedarni. U 2010. godini ispitivanja u vreme punog cvetanja, u ove dve ispitivane varijante, jedra su zauzimala položaj formiranja rane osmojedarne faze zrele embrionove kesice.

Stadijum zrelosti semenog zametka u vreme punog cvetanja je genotipski zavisna karakteristika i ključna komponenta od koje zavisi oplodjenje i zatanje plodova. U oplemenjivačkim programima se mora ispitati stadijum zrelosti semenih zametaka, uzimajući to kao indikator adaptacije i pogodnosti kao roditeljske kombinacije (Albuquerque et al., 2002). U vreme kada se za embrionovu kesicu kaže da je zrela to znači da je ona sedmoćelijska ili osmojedarna, odnosno da se na mikropilarnom kraju nalazi jajni aparat koga čine dve sinergide i jajna ćelija; u halaznom kraju se nalaze tri antipode, a u centralnom delu dva polarna jedra.

Stadijum embrionove kesice kada još nije došlo do vakuolarizacije elemenata jajnog aparata u obe godine ispitivanja je u vreme punog cvetanja bio najzastupljeniji. U ovoj fazi jajna ćelija i sinergide su bile približno iste veličine i oblika. Lokalizacija sinergida je bila u mikropilarnom kraju, dok je jajna ćelija smeštena nekoliko mikrometara niže ka halaznom delu. Ka mikropilarnom delu ćelijski zid sinergida je zadebljao i sa invaginacijama u obliku prstiju. Ova struktura je nazvana filiform aparat,

koji je kod korišćenog tripletnog bojenja pokazao veći afinitet bojenja safraninom. Do sada je u literaturi uloga filiform aparata najčešće dovođena u vezu sa usmerenim kretanjem polenovih cevčica. U svom sastavu on sadrži veći broj supstanci uključujući celulozu, hemicelulozu, pektin, kalozu i proteine (Huang i Russell, 1992).

Zrele sinergide su polarizovane, jedro i veći deo citoplazme je lokalizovan ka mikropilarnom delu, dok je krupna vakuola lokalizovana ka halaznom delu. Kruškastog su oblika i nalaze se sa strane jajne ćelije. Citoplazma sinergida je bogata ribozomima, plastidama, mitohondrijama, endoplazmatičnim retikulumom i Goldži kompleksom, što ukazuje na veoma visoko aktivni tip ćelija (Punwani i Drews, 2008). Zid sinergida u halaznom delu ka jajnoj i centralnoj ćeliji na pojedinim mestima čini samo plazma membrana, što se dovodi u vezu sa komunikacijom i/ili kretanjem hranljivih materija između njih. Zrele sinergide sadrže veliki broj sekretornih organela kao što su endoplazmatični retikulum, Goldži kompleks a takođe i veliki broj vezikula u proksimalnom delu filiform aparata (Higashiyama, 2002).

Zrela jajna ćelija je ovalnog, izduženog oblika smeštena između dve sinergide. Kao i one, izrazito je polarizovana, sa srpastom citoplazmom u halaznom delu. U mikropilarnom delu u najvećem broju slučajeva uočena je jedna krupna vakuola, mada su uočeni slučajevi i sa manjim brojem vakuola. Sve jajne ćelije sa normalnom strukturom u sebi su sadržale krupno okruglo jedro sa krupnim nukleolusom. Krupni nukleolus ukazuje na amplifikaciju rDNA i na izuzetno visoki potencijal za formiranje ribozoma (Russell, 1993). Isti autor navodi da u neoplođenim jajnim ćelijama nisu uočeni poliribozomi, ukazujući da se mali broj proteina aktivno sintetiše u zreloj jajnoj ćeliji.

Tokom dvogodišnjeg ispitivanja u varijati slobodnog oprašivanja i u neoprašenoj varijanti samo je u tri uzorka uočeno spajanje polarnih jedara u krupno centralno jedno. U svim ostalim slučajevima polarna jedra su bila blizu jedno drugom najčešće raspoređena u mikropilarnom kraju centralne ćelije i prostorno su veoma blizu jedra jajne ćelije. U centralnom jedru, u danima nakon punog cvetanja uočavao se veći broj vakuola. U dosadašnjoj literaturi se navodi da spajanje polarnih jedara u krupno centralno jedro dešava neposredno pre ili u toku dvojnog oplodjenja (Cerović, 1994; Egea i Burgos, 2000; Alburquerque et al., 2002; Alburquerque et al., 2006).

Prisustvo antipoda u analiziranim varijantama uočeno je do drugog dana od momenta punog cvetanja. U kasnijim danima uočena je sporadično jedna ili dve antipode, a u najvećem broju slučaja sve tri antipode su bile degenerisale. Prisustvo antipoda je bilo više uočljivo u varijanti slobodnog oprašivanja u odnosu na neoprašenu varijantu u prvim danima punog cvetanja, nakon čega dolazi do njihove degeneracije.

7.4.3. Funkcionalni stadijumi, embriogeneza i pojava anomalija u strukturi semenih zametaka u varijanti slobodnog oprašivanja

Normalna osmojedarna citološka građa embrionove kesice u varijanti slobodnog oprašivanja uočena je u prvom danima nakon punog cvetanja uporedo i sa petojedarnim stadijumom u obe godine ispitivanja. Već drugog dana od početka punog cvetanja utvrđen je veći broj semenih zametaka sa petojedarnim stadijumom embrionove kesice.

U 2008. i 2010. godini ispitivanja počev od četvrtog dana od početka punog cvetanja uočeni su semeni zameci u kojima je došlo do degeneracije jedne sinergide i početne ili kompletne degeneracije druge sinergide. Pri tome jajna ćelija i polarna jedra su imala normalnu citološku konfiguraciju. U nešto većem broju prisustvo ovakvih semenih zametaka uočeno je u 2008. godini ispitivanja i kretao se od 10% do 50%, dok je u 2010. godini utvrđen manji broj ovakvih semenih zametaka (10–37,50%). Šestog dana od početka punog cvetanja u 2010. godini, a osmog i desetog dana od početka punog cvetanja u obe godine uočen je dvojedarni stadijum embrionove kesice u kome je došlo do spajanja dva polarna jedra u centralno jedro. Ono što je primećeno u obe godine ispitivanja je nagli prelaz iz petojedarnog stadijuma u trojedarni (skoro bez četvorojedarnog stadijuma), a potom prelaz u dvojedarni stadijum embrionove kesice (jajna ćelija i centralno jedro).

U literaturi proces dvojnog oplodjenja se dovodi u vezu sa degeneracijom jedne od sinergida i sa spajanjem polarnih jedara u centralno jedro. Međutim, u ovom radu kod većeg broja semenih zametaka primećena je degeneracija obe sinergide, dok je kod malog broja semenih zametaka utvrđeno spajanje polarnih jedara u centralno jedro. Programirana ćelijska smrt sinergide se dešava neposredno pre ili nakon prodora polenove cevčice u nju.

Prema Yang et al. (2010) degeneracija sinergida može biti fizički ili fiziološki proces. Fizički proces čini sam kontakt polenove cevčice sa sinergidom što dovodi do oštećenja njene ćelijske membrane, dok fiziološki proces čine različiti signali od strane polenove cevčice koji difunduju u sinergidu i dovode do njene degeneracije. Na fiziološkom nivou, interakcija polenova cevčica – sinergida koja kulminira u prestanku daljeg rasta polenove cevčice, njenom pucanju i oslobađanju sadržaja u sinergidu nije u potpunosti razjašnjena. Tokom degeneracije sinergide u njoj dolazi do reorganizacije citoskeleta, tako da se formiraju dve aktinske korone, koje se pružaju od sredine sinergida do jajne ćelije i centralnog jedra. One označavaju put kojim će se kretati spermatična jedra pa samim tim imaju ulogu u direktnoj migraciji jedara ka jajnoj ćeliji i centralnom jedru (Russell, 1993; 1996). Oslobađanje i migracija spermatičnih jedara do dva ženska gameta, procesi plazmogamije i kariogamije, a zatim razvoj semena koji uključuje inicijaciju ćelijskog ciklusa, transkripciju i translokaciju u zigot, su glavni koraci u procesu dvojnog oplodjenja (Berger, 2008; Higashiyama i Hamamura, 2008).

U 2010. godini desetog dana od početka punog cvetanja uočen je u jednom uzorku rani stadijum embriogeneze, sa prisutnim jedrima budućeg endosperma.

Analizom semenih zametaka u varijanti slobodnog opašivanja, pored onih koje su imale normalnu strukturu embrionove kesice, uočene su i one koje su u svojoj građi bile defektne. Pod defektnim su smatrali oni semeni zameci koji nisu funkcionalni, u kojima su uočene nepravilnosti u strukturi embrionove kesice, znaci degeneracije pojedinih njenih elemenata ili znaci degeneracije ćelija nucelusa i integumenata.

Najveći udeo uočenih defektnih primarnih semenih zametaka odnosio se na pojavu nepravilnosti u strukturi embrionove kesice koje su se kretale 10–40% u obe godine ispitivanja, s tim da je već 40% defektnih semenih zametaka primećeno u 2010. godini nultog dana fiksiranja (puno cvetanje). Nepravilnosti u građi embrionove kesice u najvećem delu su se odnosile na pojavu većeg broja jedara nepravilno raspoređenih bilo na polovima ili u centralnom delu embrionove kesice. Sledeća anomalija koja je primećena u obe godine jeste poremećaj polarizacije jajne ćelije, pri čemu je citoplazma sa jedrom bila okrenuta ka mikropilarnom kraju.

Degenerativni procesi koji su se odnosili na neke od elemenata embrionove kesice su sporadično uočeni u danima nakon punog cvetanja, sve do desetog dana, kada

je u 2008. i u 2010. godini u relativno visokom broju analiziranih uzoraka uočena degeneracija elemenata jajnog aparata (40% u 2008. i 50% u 2010. godini ispitivanja).

Eaton (1959), analizom funkcionalnih stadijuma kod trešnje sorte Windsor, navodi da se kod većine analiziranih uzoraka embrionove kesice nalaze u zreлом osmojedarnom stadijumu, da bi već nakon drugog i četvrtog dana od početka punog cvetanja u 50% i 80% uzoraka došlo do njihove degeneracije. Kod sorte trešnje Satohnishiki, analizirane iz dva proizvodna područja u Japanu, u 50% analiziranih uzoraka u vreme punog cvetanja, embrionove kesice su bile u osmojedarnom stadijumu, da bi drugog i četvrtog dana od početka punog cvetanja kod 30% i 80% uzoraka došlo do degeneracije embrionovih kesica u području koje je imalo višu temperaturu u periodu punog cvetanja (Beppu i Kataoka, 2011). Broj semenih zametaka sa degeneracijom elemenata embrionove kesice ili nucelusa, kod trešnje, značajno raste ukoliko su u vreme punog cvetanja visoke temperature (Beppu et al., 2001). Analizom semenih zametaka kod japanske šljive u vreme punog cvetanja u 29,7% od 74 uzorka embrionove kesice su bile degenerisane, dok u čak 45,9% uzoraka semeni zameci u sebi nisu imali embrionovu kesicu (Jia, et al., 2008). Kod sorte kajsije Trevatt Blue, u vreme punog cvetanja, pored pojave degeneracije embrionovih kesica (u oko 50% analiziranih semenih zametaka) Lillecrapp et al. (1999) navode i pojavu anomalija u strukturi semenih zametaka.

7.4.4. Vitalnost, funkcionalni stadijumi i anomalije u strukturi semenih zametaka neoprašenih cvetova

U neoprašenoj varijanti u prvih deset dana od početka punog cvetanja, u trogodišnjem periodu korišćenjem fluorescentnog bojenja anilin plavim i u dvogodišnjem periodu korišćenjem tripletnog bojenja po Gerlach-u ispitana je vitalnost primarnog i sekundarnog semenog zametka kroz dva parametra: pojavu njihove fluorescencije i dužinu trajanja funkcionalnih stadijuma embrionove kesice. U slučaju primarnog semenog zametka, korišćeno fluorescentno bojenje anilin plavim je pokazalo u sve tri godine odsustvo fluorescencije, na osnovu čega se moglo zaključiti da su oni 100% vitalni.

Međutim, analiziranjem funkcionalnih stadijuma u dvogodišnjem periodu, dobijena je sasvim drugačija slika. U vreme punog cvetanja, u obe godine, u najvećem broju analiziranih primarnih semenih zametaka embrionova kesica je bila u ranoj osmojedarnoj fazi, kada još nije došlo do vakuolarizacije njenih ćelija. U manjem stepenu, u obe godine, uočen je petojedarni stadijum. Već drugog, četvrtog i šestog dana od početka punog cvetanja u 2008. godini kao funkcionalan stadijum bio je petojedarni (60%, 30% i 12,50%). U 2010. godini, drugog dana od početka punog cvetanja utvrđeni su u određenom broju svi stadijumi od ranog osmojedarnog do petojedarnog, s tim da je sa 33,33% najzastupljeniji bio petojedarni stadijum. Četvrtog dana od početka punog cvetanja smanjivao se broj funkcionalnih stadijuma, da bi šestog dana on iznosio 14,29%. Osmog dana od početka punog cvetanja u 2008. godini uočen je u 11,11% uzoraka funkcionalan petojedarni stadijum embrionove kesice, dok u 2010. godini u ovom terminu fiksiranja nisu konstatovani funkcionalni stadijumi.

Analizom dobijenih funkcionalnih stadijuma drugog dana od momenta punog cvetanja u 2008. godini nije uočen osmojedarni stadijum embrionove kesice, već ima prelaz od ranog osmojedarnog (nultog dana) do petojedarnog stadijuma.

U 2010. godini u najvećem broju je uočen rani osmojedarni stadijum embrionove kesice, u vreme punog cvetanja. Drugog dana od početka punog cvetanja su bili zastupljeni svi funkcionalni stadijumi, uključujući i petojedarni. Degeneracija antipoda u obe godine ispitivanja se dešavala do trećeg dana od momenta punog cvetanja.

U 2008. i u 2010. godini ispitivanja dobijena visoka negativna korelacija zavisnosti funkcionalnih stadijuma embrionove kesice od dana nakon početka punog cvetanja ($r=-0,96$ i $r=-0,93$). Koeficijent determinacije od 92% u 2008. godini ukazuje da je funkcionalno stanje bilo u velikoj zavisnosti od dana ispitivanja. U 2010. godini vrednost ovog koeficijenta bila je nešto niža (86%), što ukazuje je na ispitivane funkcionalne stadijume u toj godini bio veći uticaj drugih faktora.

Nepodudaranje rezultata korišćenjem ove dve metode u analizi vitalnosti primarnih zametaka semenih navodi i Cerović (1991b) ispitivanjima kod dve sorte višnje. Kao mogući razlog on navodi nepostojanje dovoljnog praga u primarnom semenom zametku da bi se ispoljila pojava fluorescencije.

Analiza semenih zametaka kod, dve sorte japanske šljive, u vreme punog cvetanja pokazala je da je u 50% uzoraka kao funkcionalni stadijum bila je zrela osmojedarna embrionova kesica (Jia et al., 2013). Prema Furukawa i Bukovac (1989) kao funkcionalni semeni zameci se mogu smatrati oni koji u vreme punog cvetanja imaju embrionovu kesicu sa više od četiri jedra u sebi. Nasuprot njima, Albuquerque et al. (2000) podrazumevaju kao vitalne one semene zametke koji u sebi imaju osmojedarnu, izduženu embrionovu kesicu. Cerovic i Micic (1999) ukazuju da je broj normalnih i dobro razvijenih embrionovih kesica u vreme punog cvetanja u direktnoj vezi sa uspehom oplodjenja kod višnje. Kod sorti kajsije gajenih u uslovima mediteranske klime u vreme punog cvetanja semeni zameci se nalaze u nezrelom stadijumu, o zrelih semenim zamecima se može govoriti između trećeg i šestog dana od momenta punog cvetanja (Egea i Burgos, 1994, 1998; Albuquerque et al., 2002).

Ruiz i Egea (2007) su kod svake ispitivane sorte kajsije uočili veliku razliku u razvojnim stadijumima embrionove kesice u vreme punog cvetanja. To autori dovode u vezu sa adaptivnim mehanizmima svake od njih na moguće nepovoljne klimatske uslove. Ispitivanjem funkcionalnih stadijuma u vreme punog cvetanja, kod devet sorti kajsije, Albuquerque et al. (2002) su utvrdili postojanje razlika koje vezuju za vreme cvetanja ispitivanih sorti. Pri tome ranocvetne sorte imaju veći udeo funkcionalnih stadijuma za razliku od sorti koje kasnije cvetaju. To autori dovode u vezu sa vremenom koje je neophodno za njihovo mirovanje na niskim temperaturama (Albuquerque et al., 2002). Nava et al. (2009) su kod sorte breskve Granada utvrdili da je embrionova kesica u vreme punog cvetanja nezrela, i da se od trećeg do šestog dana od momenta punog cvetanja nalazi u petojedarnom ili osmojedarnom stadijumu. Analizom funkcionalnih stadijuma embrionovih kesica u semenim zamecima kod sedam sorti japanske šljive, je utvrđeno da su one nezrele kod sorti koje su ranije cvetale, dok sorte koje su cvetale kasnije su imale odmakliji stadijum u formiranju zrele embrionove kesice (Ruiz et al., 2010).

Nasuprot funkcionalnim stadijumima, u ovom radu je uočena pojava degeneracije pojedinih elemenata embrionove kesice, u prvom redu elemenata jajnog aparata. Sporadično su uočeni semeni zameci sa anomalijama u građi embrionove kesice ili sa poremećajem u polarizaciji jajnog aparata, dok je degeneracija elemenata jajnog aparata pokazala linearan trend rasta u zavisnosti od dana ispitivanja. Počev od

nultog dana u 2010. godini u 10% uzoraka, a potom od drugog dana od početka punog cvetanja u obe godine uočena je degeneracija jajnog aparata (40% i 22,22%) koja je imala maksimum osmog dana od momenta punog cvetanja (88,89% i 77,78%). Osmog dana od početka punog cvetanja u 2010. godini u 22,22% uzoraka uočena je degeneracija cele embrionove kesice, dok je desetog dana od početka punog cvetanja ona uočena u 40% uzoraka u 2008. godini, a u 28,58% uzoraka u 2010. godini ispitivanja.

Za razliku od funkcionalnih stadijuma, koeficijent korelacije za pojavu degeneracije jajnog aparata u zavisnosti od dana ispitivanja pokazao je pozitivnu korelaciju, u obe godine ispitivanja ($r=0,71$ i $r=0,82$). Međutim, koeficijent determinacije u prvoj godini je imao vrednosti od 50%, dok je u drugoj godini imao nešto višu vrednost od 67%.

Posmatrana pojava degeneracije elemenata jajnog aparata imala je visok skok između drugog i četvrtog dana od momenta punog cvetanja u 2010. godini, što se može dovesti u vezu sa temperaturnim kretanjima u to vreme. Prosečne srednje dnevne temperature od drugog dana do četvrtog od početka punog cvetanja su bile preko $17,5^{\circ}\text{C}$, što je moglo dovesti do naglog porasta semenih zametaka sa degenerisanim jajnim aparatom.

Ispitivanjem pojave defektnih semenih zametaka kod četiri sorte avokada (od kojih se jedna karakteriše redovno niskim prinosima), kao mogući razlog niskog finalnog zametanja, Tomer i Gottreich (1976) su naveli pojavu degeneracije jajnog aparata, koju su uslovno podelili u pet kategorija. Na visokim temperatura degeneracija semenih zametaka je brža, što je uslovljeno njihovim nedovoljnim snabdevanjem hranljivim materijama. Morenol et al. (1992) navode da reakcija semenih zametaka na visoku temperaturu reflektuje genotipske karakteristike same sorte, dodajući da one sorte koje pokazuju manju osetljivost na visoke temperature imaju visok prag tolerancije, a ujedno i stabilniji rod.

Degeneracija jajnog aparata kod badema se dešava petog dana od momenta punog cvetanja u neoprašenoj varijanti, jer su uzorci uzeti šestog i osmog dana već imali kompletno degenerisan jajni aparat (Korkmaz et al., 2001). Kod četiri sorte kajsije, prvih šest dana od početka punog cvetanja, broj semenih zametaka u kojima nisu uočeni elementi jajnog aparata je bio statistički značajan (Albuquerque et al., 2004), dok se

kod sorte kajsije Moniquí Fino degenerisane primarni semeni zameci konstatuju šestog dana od momenta punog cvetanja (Burgos et al., 1993). Nezreo semeni zametak u vreme punog cvetanja kod višnje se navodi kao razlog slabog zametanja plodova (Furukawa i Bukovac, 1989).

Guerra et al. (2010) navode da emaskulacija cvetova u nekim kombinacijama oprašivanja ispitivanih sorti japanske šljive (*Prunus salicina*) dovodi do rane degeneracije semenih zametaka. Isti autori navode da je rana degeneracija oba semena zametka uzrok ženske sterilnosti i razlog za slabo ili nikakvo zametanje plodova.

Vitalnost semenih zametaka kod većine vrsta voćaka može biti smanjena ili usled njihovog nepravilnog razvoja ili usled rane degeneracije embrionove kesice. Kod nekih sorti trešnje degeneracija embrionove kesice je uočena već drugog dana od momenta punog cvetanja (Eaton, 1959). Previše kratak period vitalnosti jajnog aparata kod višnje ima direktni uticaj na oplodjenje i značajniji je nego neadekvatno oprašivanje (Dyś, 1984).

Ispitivanjem vitalnosti semenih zametaka kod dve sorte šljive Brooks i Italian Morenol et al. (1992) navode da se radi o sortama koje proizvode dve vrste cvetova: jake i slabe. Kod sorte Brooks koja ima krupne cvetove i ranije cveta nije utvrđen uticaj etefona (biljnog regulatora rasta) na produžavanje vitalnosti semenih zametaka. To je objašnjeno time da pošto ova sorta već proizvodi jake cvetove, pa produžavanje vitalnosti semenih zametaka nije moguće. Nasuprot nje, sorta Italian ima slabe cvetove i pokazalo se da etefon ima uticaja na produženje vitalnosti semenih zametaka.

Histološkom analizom morfološki deformisanih ili atipičnih cvetova kod dve sorte šljive, gajene u agroekološkim uslovima Čačka, Mičić i Đurić (1998) ukazuju na atrofiju semenih zametaka, koja se uočavala u podfazi punog cvetanja. Prvi znaci atrofije su bili izraženi u tkivu nucelusa, u centralnom i halaznom delu, da bi se potom širili na integumente. U to vreme histocitološka konfiguracija embrionove kesice je bila u nenarušenom stanju. Isti autori navode da se normalna struktura embrionove kesice relativno duže zadržava, ukazujući time da atrofija semenih zametaka nije nastala kao posledica poremećaja u razvoju.

U ovom radu već u vreme punog cvetanja korišćenjem fluorohromnog bojenja sa anilin plavim u sve tri godine ispitivanja uočena je početna fluorescencija sekundarnih semenih zametaka u halaznom delu, koja se u danima posle postepeno

širila i zahvatala ceo semeni zametak. Ispitivanjem funkcionalnih stadijuma uočeni su stadijumi od četvororedarnog, u formiranju zrele embrionove kesice, do petoredarnog stadijuma, uglavnom u vreme punog cvetanja. Drugog i četvrtog dana od početka punog cvetanja u par slučajeva uočeni su stadijumi od osmoredarnog do petoredarnog.

Analizom citološke organizacije embrionove kesice neoprašenih cvetova sorte šljive Pozna plava, već nultog dana kod manjeg broja uzoraka uzoraka su uočene embrionove kesice sa degeneracijom nekih od njenih elemenata koja nije prelazila 25%. Ono što je uočeno u obe godine u strukturi sekundarnog semenog zametka, kako u varijanti slobodnog oprašivanja, tako i u neoprašenoj varijanti počev od drugog dana od početka punog cvetanja jeste degeneracija ćelija nucelusa, koja je maksimum imala između šestog i desetog dana od početka punog cvetanja.

Koeficijent korelacije između degeneracije ćelija nucelusa i zavisnosti od dana nakon punog cvetanja, u neoprašenoj varijanti, u obe godine je bio visoko pozitivan ($r=0,90$ i $r=0,92$).

Kod sorte badema Nonpareil početna degeneracija sekundarnog semenog zametka se uočavala nakon četvrtog dana od momenta punog cvetanja, da bi se desetog dana moglo govoriti o njihovoj kompletnoj degeneraciji (Pimienta i Polito, 1983). Degeneracija 70% sekundarnih semenih zametaka kod trešnje se uočava već nakon prvog dana od momenta punog cvetanja, dok se 100% degenerisanih semenih zametaka uočava već četvrtog dana od početka punog cvetanja (Hedhly et al., 2007). Egea i Burgos (2000) navode da je degeneracija sekundarnih semenih zametaka genetički programirana i zavisi od genotipa.

7.5. Inicijalno i finalno zametanje plodova

Vremenski uslovi u vreme oprašivanja imaju uticaja na receptivnost stigme, fertilnost semenog zametka, trajanje njene vitalnosti i u krajnjoj liniji na zametanje plodova (Furukawa i Bukovac, 1989). Sa druge strane, postoji veći broj genotipski zavisnih faktora koji imaju veze sa biologijom cvetanja, a koji takođe mogu uticati na zametanje plodova, kao što su produkcija i opadanje cvetnih pupoljaka, vreme cvetanja, stadijum razvoja semenog zametka u vreme cvetanja, klijavost polena, deformisani tučkovi (Ruiz i Egea, 2008).

Inicijalno i finalno zametanje plodova je pod velikim uticajem sorte, dok dani oprašivanja nakon punog cvetanja nemaju uticaja (Alburquerque et al., 2004). Tokom reproduktivnog procesa, od momenta oprašivanja do dvojnog oplodjenja mogu postojati različiti negativni uticaji, koji u krajnjoj liniji mogu dovesti do slabog zametanja plodova. Jedan od prvih jeste neusaglašenost između muškog i ženskog gametofita, tj. razvojnog stadijuma embrionove kesice u vreme kada se realno očekuje da polenova cevčica stigne do nje.

U 2008. godini visoke vrednosti inicijalnog zametanja plodova su dobijene u varijantama samooprašivanja i u obe varijante stranooprašivanja (preko 70 i 65%), dok je varijanta slobodnog oprašivanja imala vrednost ispod 40%. Međutim, iako su dobijene visoke vrednosti inicijalno zametnutih plodova broj finalno zametnutih plodova bio je ispod 10% u svim analiziranim varijantama oprašivanja. S obzirom na to da nije bilo većeg temperaturnog kolebanja u vreme punog cvetanja u toj godini, kao i da je analiza funkcionalnog stadijuma embrionove kesice pokazala da su one u vreme punog cvetanja bile zrele, mogući razlog za dobijanje ovako niskog broja finalno zametnutih plodova može biti u dejstvu endogenih i/ili egzogenih faktora koji su delovali na ženski gametofit nakon perioda punog cvetanja, a koji u ovom radu nisu praćeni.

Više vrednosti inicijalnog i finalnog zametanja plodova, izuzev kod varijante slobodnog oprašivanja, u ostalim ispitivanim varijantama oprašivanja, dobijene su u 2010. u odnosu na 2011. godinu. Jedan od mogućih razloga slabijeg zametanja plodova u 2011. godini ispitivanja su niske temperature u vreme punog cvetanja, koje su uslovile sporiji rast polenovih cevčica.

U ovom radu interval varijacije inicijalnog zametanja plodova u ispitivanim varijantama oprašivanja za period ispitivanja se kretao 23,36–60,70. Kod šest kombinacija oprašivanja sorte Čačanska najbolja u četvorogodišnjem periodu, interval inicijalnog zametanja plodova je bio daleko niži i sa manjim varijacijama od vrednosti dobijenih u ovom radu i kretao se od 3,7 do 17% (Nikolić et al., 2012). Hjetness i Nornes (2007) navode vrednosti variranja inicijalnog zametanja plodova iz 14 različitih kombinacija oprašivanja koje su približnije vrednostima u ovom radu i kretale su se 5,4–66,7%.

Najviše vrednosti finalno zametnutih plodova dobijene su u varijantama stranooprašivanja, potom u varijanti samooprašivanja, dok je najniža vrednost, čak ispod 5% u sve tri godine ispitivanja bila u varijanti slobodnog oprašivanja.

Kod šljive više vrednosti finalnog zemetanja plodova u varijanti stranooprašivanja u odnosu na slobodno oprašivanje navode Keulemans (1994) i Nikolić et al. (2012). U varijanti slobodnog oprašivanja na osnovu broja finalno zametnutih plodova izvršena je podela sorti šljive u četiri grupe: slabo zemetanje (sa manje od 10% zametnutih plodova); srednje (10,0–20%); visoko (20,1–40%) i veoma visoko (preko 40% zametnutih plodova) (Nyéki i Soltész, 1996). Autori takođe navode da za sigurne prinose je neophodno da zemetanje plodova bude preko 20%.

Nyéki i Szabó (1996), na osnovu finalnog zemetanja plodova kod 56 evropskih šljiva, u sedmogodišnjem periodu ispitivanja, su izvršili njihovu podelu na: kompletno samobesplodne (zemetanje 0%), samobesplodne (zemetanje od 0,1–1%), delimično samooplodne (1,1–10%), samooplodne (10,1–20%) i visoko samooplodne (zemetanje preko 20%). Neumüller (2011) je izvršio podelu evropskih šljiva u zavisnosti od zemetanja plodova u varijanti samooprašivanja na četiri grupe: nisko (<10%), srednje (10–20%), visoko (20,1–40%) i veoma visoko zemetanje plodova (> 40%).

Kod kajsije nije utvrđeno postojanje pozitivne korelacije između funkcionalnog stanja embrionove kesice u vreme punog cvetanja sa finalnim zemetanjem plodova, za razliku od badema, gde je visok broj funkcionalnih semenih zemetaka bio praćen visokim zemetanjem plodova (Albuquerque et al., 2002). Veći broj autora navodi da kod badema nije bilo razlike u zemetanju plodova u varijantama samooprašivanja i stranooprašivanja (Socias i Company i Felipe, 1987; Dicenta et al., 2002; Martínez-García et al., 2012).

Ortega et al. (2010) navode da ispitivanjem inicijalnog zemetanja plodova kod badema u varijantama samooprašivanja i stranooprašivanja nisu dobijene značajne razlike. Međutim, razlika je ispoljena u finalnom zemetanju, gde je dobijen visok broj finalno zametnutih plodova, dok je u varijanti samooprašivanja bio nizak broj zametnutih plodova.

Velike razlike u zemetanju plodova su utvrđene kod sorti kajsije kod kojih je u vreme punog cvetanja embrionova kesica bila nezrela (Egea i Burgos, 1998). Međutim, autori navode da između ispitivanih sorti kajsije postoje male razlike u stadijumima

razvoja embrionove kesice da bi se u tome mogao tražiti uzrok razlikama u zametanju plodova

Analiza interakcijskog efekta za inicijalno zametanje plodova je pokazala da je došlo do odstupanja od osnovnih zakonitosti u 2011. godini, gde se u varijanti samooprašivanja i stranooprašivanja sortom Presenta konstatuje veći pad u broju inicijalno zametnutih plodova. U 2011. godini u vreme punog cvetanja je uočena najveća oscilacija u temperaturnim kretanjima, što je jedan od mogućih razloga koji je imao uticaja na ove dve varijante oprašivanja.

Koeficijent korelacije je pokazao postojanje statistički značajnog uticaja broja polenovih cevčica prodrlih u nucelus, desetog dana od oprašivanja na broj inicijalno i finalno zametnutih plodova. Pri tome se on za inicijalno zametanje plodova kretao u rangu visoke pozitivne korelacije, a za finalno zametanje u rangu niske korelacije. Koeficijent determinacije za inicijalno zametanje plodova iznosio je 59%, a za finalno zametanje plodova 20%. To znači da je 59% inicijalno zametnutih plodova bilo uslovljeno prodorom polenove cevčice u nucelus desetog dana od početka punog cvetanja, dok je taj uticaj na finalno zametanje iznosio samo 20%, dok ostatak do 100, u oba slučaja, pripada uticaju raznih drugih faktora.

7.6. Temperaturna kretanja u toku trajanja podfaze punog cvetanja

Temperatura vazduha predstavlja glavni ekološki faktor koji ima direktan uticaj na proces oprašivanja i oplodjenja (Irenaeus i Mitra, 2013), a samim tim i na zametanje plodova (Vasilakakis i Porlingis, 1985). Uticaj visokih temperatura neposredno pre i u toku cvetanja ima negativan efekat na tok progamne faze kod breskve, dovodeći do slabog zametanja plodova (Nava et al., 2009).

Prosečne srednje dnevne temperature u prvih deset dana od momenta oprašivanja su bile od 10,63°C, u 2011. godini istraživanja do 14,03°C u 2010. godini. U 2008. godini prosečna srednja dnevna temperatura iznosila je 12°C. U toj godini variranje srednjih dnevnih temperatura, u prvih deset dana od oprašivanja, je bilo 10–15,5°C, s tim da je razlika u srednjoj dnevnoj temperaturi bila od 0,5°C do 2°C. Počev od šestog dana pa do desetog dana od oprašivanja srednja dnevna temperatura je bila iznad 14°C.

U 2010. godini srednje dnevne temperature u ispitivanom periodu su varirale od 9,5°C do 17,7°C, a razlike u srednjim dnevnim temperaturama su bile od 0,5°C do 5,4°C. Najveća srednja dnevna temperatura bila je već drugog dana (17,7°C) i do sedmog dana od oprašivanja vrednosti srednjih dnevnih temperatura bile su preko 16°C.

U 2011. godini zabeležena je najveća oscilacija u temperaturnim kretanjima, gde je amplituda srednjih dnevnih temperatura bila 4,0–18,7°C, dok je razlika u srednjim dnevnim temperaturama bila od 0,3°C do čak 12,7°C. Najveća razlika u dnevnim temperaturama utvrđena je između nultog i prvog dana od oprašivanja. Do četvrtog dana temperature su bile ispod 9°C, da bi potom bile preko 11°C.

Temperaturna kretanja su imala jasan uticaj na ispitivane kvantitativne parametre rasta polenovih cevčica. Druga (2010.) godina ispitivanja može da se uzme kao primer uticaja nešto viših temperatura na brži rast polenovih cevčica, gde se već osmog dana od oprašivanja, izuzev u varijanti slobodnog oprašivanja, uočava prodor polenovih cevčica u nucelus semenog zametka. Slaba dinamika rasta u varijanti slobodnog oprašivanja se može objasniti u slaboj kvantitativnoj zastupljenosti polenovih cevčica u stubiću, što su pokazali i dobijeni rezultati.

U 2008. godini ispitivanja su bili optimalni temperaturni uslovi za rast polenovih cevčica, što je pokazao skoro sinronizovan rast polenovih cevčica u svim varijantama ispitivanja. U 2011. godini uticaj niskih temperatura na dinamiku rasta polenovih cevčica, izuzev kod varijante slobodnog oprašivanja, nije toliko došao do izražaja, jer je dinamika bila skoro ujednačena sa onom u 2008. godini ispitivanja. To bi se moglo objasniti adaptivnošću korišćena dva genotipa iz našeg podneblja, dok su druga dva genotipa (Hanita i Presenta), koji vode poreklo iz hladnijih klimata, ovim pokazali njihovu prilagođenost niskim temperaturama. To je u saglasnosti sa navodima Hedhly (2005b) da interakcija polen–temperatura može da reflektuje poreklo polena, kao i njegovu adaptaciju na preovlađujuće ekološke uslove. Nizak stepen prodora polenovih cevčica u nucelus semenog zametka desetog dana od oprašivanja u 2011. godini pre bi se mogao objasniti velikim temperaturnim oscilacijama od šestog dana, gde je razlika u srednjim dnevnim temperaturama bila i do 8°C.

Kod različitih vrsta voćaka optimalna temperatura za klijavost polena na žigu i rast polenovih cevčica u plodniku se razlikuje u zavisnosti da li su ranocvetne ili kasnocvetne sorte (Irenaeus i Mitra, 2013). Isti autori navode, da se kod sorte badema

koja je ranocvetna, najveća klijavost polena dobija na nižim temperatura. Visoke temperature sa jedne strane uslovljavaju brži rast polenovih cevčica, dok sa druge strane imaju uticaja na ženski sporofit dovodeći ne samo do bržeg sazrevanja već i do bržeg propadanja papila žiga (Hedhly et al., 2003). Žig prvo gubi sposobnost da omogući klijavost polena, a potom i sposobnost za adheziju polenovih zrna (Hedhly et al., 2005b; Vuletin Selak et al., 2014)

U radovima većeg broja autora analiziran je uticaj temperature na različite strukture ili procese tokom trajanja progamne faze oplodjenja i to na: receptivnost žiga (Burgos et al., 1991; Egea et al., 1991; Hedhly et al., 2003), klijavost polena na žigu i rast polenovih cevčica u stubiću i plodniku (Hedhly et al., 2003, 2005a, 2008); trajanje vitalnosti semenih zametaka (Postweiler et al., 1985; Vasilakakis i Porlingis, 1985; Stösser i Anvari, 1990; Cerović i Ružić, 1992a; Cerović et al, 2000).

Irenaeus (2012) navodi da varijacije u rastu polenovih cevčica na različitim temperaturama zavise od vrste voćaka, s tim da je kod svih uočeno smanjenje u njihovom rastu, ukoliko temperatura pređe odgovarajući optimum. Vreme koje je potrebno polenovim cevčicama da stignu do baze stubića opada sa povećanjem dnevnih i noćnih temperatura (Yoder et al., 2009). Kod trešnje visoke temperature dovode do povećanja broja polenovih cevčica u stubiću, ali i do smanjenja broja onih koje će stići do baze stubića (Hedhly et al., 2009). Uticaj temperature na značajno brži rast polenovih cevčica kod breskve uočljiv je samo u prva dva dana nakon oprašivanja (Hedhly et al., 2005b).

Kod ispitivanih sorti višnje optimalna temperatura za rast polenovih cevčica u tučku je 15–20°C, a najniža temperatura na kojoj polenove cevčice stižu do semenih zametaka je 5–10°C (Cerović i Ružić, 1992a). Na temperaturama od 15°C polenovim cevčicama, kod nekih sorti šljive, potrebno je 5 dana da stignu do semenih zametaka (Jones et al., 1971). Stösser i Anvari, (1990) navode da je kod šljive, na temperaturi od 20°C polenovim cevčicama potrebno 3–4 dana da stignu do baze stubića i prodru u plodnik, dok je na temperaturama od 5°C rast skoro stopiran. Visoke temperature, nasuprot što uslovljavaju brži rast polenovih cevčica, dovode do skraćivanja efektivnog polinacionog perioda, skraćivanjem kako receptivnosti žiga, tako i vitalnosti semenih zametaka.

Sa druge strane, niske temperature dovode do usporenog rasta polenovih cevčica u stubiću kod šljive (Jeffries et al., 1982), trešnje (Guerrero-Prieto et al., 1985) i jabuke (Williams et al., 1970). Niske temperature, osim što imaju uticaja na muški gametofit dovode do produžavanja EPP, produžavanjem vitalnosti semenih zametaka (Vasilakakis i Porlingis, 1985). Međutim, ekstremno niske temperature mogu da dovedu do smanjenja EPP ukoliko vitalnost semenih zametaka nije dovoljno duga za vreme koje je polenovim cevčicama potrebno da stignu do njih (Lombard et al., 1972).

Zavisnost vitalnosti semenih zametaka kod višnje od dana nakon punog cvetanja i temperature najbolje je opisana statistički regresionom linijom tipa parabole (Cerović, 1994). Kod sorte višnje Čačanski rubin ispitivanja trajanja vitalnosti semenih zametaka na četiri konstantne temperature, u prvih deset dana od početka punog cvetanja, su pokazala jasnu temperaturnu zavisnost (Cerović i Ružić, 1992a). Isti autori navode da konstantni laboratorijski uslovi nisu kompatibilni sa uslovima koji vladaju u polju, pa stoga dobijeni rezultati mogu poslužiti kao predviđanje EPP u poljskim uslovima, u slučaju da neke od ispitivanih temperatura budu zastupljene tokom cvetanja. Ispitivanja vitalnosti semenih zametaka kod višnje su pokazala linearan trend zavisnosti od visokih temperatura, tj. njihovu bržu degeneraciju na višim temperaturama. Slični rezultati su dobijeni i kod trešnje, gde je gubitak vitalnosti u zavisnosti od sorte, na 5°C bio nakon 5 dana, dok je na temperaturi od 20°C za 1–2 dana (Postweiler et al., 1985).

Vitalnost semenih zametaka analizirana u prvih deset dana od početka cvetanja na konstantnim temperaturama od 5°C, 10°C i 15°C kod tri sorte šljive (Čačanska rana, Čačanska najbolja i Čačanska lepotica) se kretala 80–100%, dok su veće oscilacije utvrđene kod sorti Wangenheims Frühzwetsche i Požegača, ali nikad ispod 50% (Cerović et al., 2000). Isti autori navode da na konstantnoj temperaturi od 20°C dolazi do drastičnog pada vitalnosti semenih zametaka, koja je najuočljivija kod sorte Čačanska rana, gde je desetog dana samo 10% semenih zametaka bilo vitalno. Nasuprot njima, kod dve sorte šljive Zimmers i Lützelsachseh, semeni zameci gube vitalnost na temperaturi od 20°C već nakon 3 do 4 dana (Stösser i Anvari, 1990).

Kod dve ispitivane sorte trešnje (Vignola i Sunburst) povećanje srednjih dnevnih temperatura od 1,4°C do 3°C dovodi do drastičnog smanjenja finalno zametnutih plodova (Hedhly et al., 2007). Pozitivna korelacija je utvrđena između finalnog

zametanja plodova kod dve sorte kajsije i srednjih dnevnih temperatura u prvih 21. dan nakon punog cvetanja (McLaren et al., 1996).

8. ZAKLJUČAK

Na osnovu trogodišnjih rezultata citoembrioloških ispitivanja procesa oplodjenja sorte šljive Pozna plava, mogu se izvesti sledeći zaključci:

- ▶ Bolju klijavost polena, koja je prosečno za sve tri godine bila preko 40%, su imale sorte Hanita, Presenta i Čačanska najbolja u odnosu na sortu Pozna plava, čija je klijavost polena tokom trogodišnjeg perioda bila ispod 20%. Pojava interakcijskih efekata sorta \times godina ukazala je na postojanje sortne specifičnosti koja se ispoljila kroz karakteristike polena korišćenih genotipova, a došla je do izražaja u interakciji sa spoljašnjim faktorima koji su imali uticaja u početnim fazama reproduktivnog procesa.
- ▶ U analizi morfoloških karakteristika polena korišćenih sorti najmanje razlike su dobijene kod širine polenovog zrna, dok su se svi ostali ispitivani parametri značajno razlikovali. Najveće razlike su uočene između sorte Pozna plava i ostalih analiziranih sorti u ogledu. Svaka sorta je pokazala sortnu specifičnost koja kao konzervativna karakteristika, može biti iskorišćena zajedno sa drugim morfološkim karakteristikama u njenom opisu i karakterizaciji.
- ▶ Analizom kvantitativnih parametara rasta polenovih cevčica u stubiću sorte šljive Pozna plava, u slučaju prosečnog broja polenovih cevčica u gornjoj trećini stubića i plodniku kao i njihove dinamike rasta, najveće vrednosti su dobijene u varijanti stranooprašivanja. Redosled oprašivača sa kojima su dobijene najbolje vrednosti za oba kvantitativna parametra je: Hanita, Presenta i Čačanska najbolja. U varijanti samooprašivanja dobijen je znatno manji prosečan broj polenovih cevčica u ispitivanim regionima tučka, dok je dinamika rasta bila približna onoj konstatovanoj kod varijante stranooprašivanja. Varijanta slobodnog oprašivanja se karakterisala najmanjim vrednostima kvantitativne zastupljenosti polenovih cevčica u analiziranim regionima tučka.

- ▶ Nije utvrđena korelacija između klijavosti polena *in vitro* i prosečnog broja polenovih cevčica u stubiću. Jaka pozitivna korelacija je utvrđena između prosečnog broja polenovih cevčica u gornjoj trećini stubića i broja isti prodrlih u plodnik kao i između broja u plodniku i broja prodrlih u nucelus, desetog dana od oprašivanja.
- ▶ Prisustvo inkompatibilnih polenovih cevčica kod svih analiziranih varijanti oprašivanja bilo je u broju manjem od 5%, tako da njihova zastupljenost nije imala uticaja na broj onih koje će stići do baze stubića.
- ▶ U svim varijantama oprašivanja uočen je specifičan rast polenovih cevčica pre i nakon prodora polenove cevčice u nucelus semenog zametka, koji je imao vrednosti 0,87–3,39%. Najmanji stepen specifičnog rasta uočen je u varijanti oprašivanja sortom Hanita, dok su najviše vrednosti utvrđene sa sortom Presenta.
- ▶ Plodnik šljive u sebi sadrži dva semena zametka: primaran i sekundaran, koji su se u vreme punog cvetanja, jasno morfološki razlikovali.
- ▶ Analiza funkcionalnog stadijuma embrionove kesice u vreme punog cvetanja u varijanti slobodnog oprašivanja, pokazala je da se one nalaze u ranoj osmojedarnoj fazi zrele embrionove kesice (još nije došlo do vakuolarizacije njihovih ćelija).
- ▶ Analiza funkcionalnih stadijuma u kontrolnoj ili neoprašenoj varijanti, pokazala je da se i tu u vreme punog cvetanja embrionova kesica u najvećem broju slučajeva nalazi u ranoj osmojedarnoj fazi formiranja zrele embrionove kesice, koju vrlo brzo zamenjuje petojedarni stadijum. O postojanju funkcionalnih stadijuma u ovoj varijanti može se govoriti do osmog dana od momenta punog cvetanja.
- ▶ Na osnovu ispitane dužine trajanja funkcionalnih stadijuma, i na osnovu utvrđenog vremena potrebnog polenovim cevčicama da stignu do nucelusa, za ovu sortu šljive se može reći da ima veoma kratak EPP period, od svega jedan do maksimalno dva dana.
- ▶ Visoka negativna korelacija je utvrđena između trajanja funkcionalnih stadijuma embrionove kesice i dana nakon punog cvetanja.

- ▶ Pojava poremećaja u građi embrionove kesice u primarnom semenom zametku u varijanti slobodnog oprašivanja u najvećem delu se odnosila na određene anomalije u strukturi embrionove kesice. Anomalije su se najčešće odnosile na: pomerenu srpastu zonu citoplazme jajne ćelije, veći broj jedara u embrionovoj kesici koja su bila nepravilno raspoređena i nepotpunu konfiguraciju, gde je najčešće nedostajao neki od elemenata jajnog aparata.
- ▶ Degenerativne promene koje su utvrđene u embrionovim kesicama primarnih semenih zametaka u prvom redu su se odnosile na elemente jajnog aparata, i tu je dobijena visoka pozitivna korelacija zavisnosti ovog poremećaja od dana nakon punog cvetanja.
- ▶ Analiza sekundarnog semenog zametka u varijanti slobodnog oprašivanja i u neoprašenoj varijanti u vreme punog cvetanja pokazala je postojanje u visokom broju funkcionalnih stadijuma, da bi se odmah nakon toga uočila degeneracija ćelija nucelusa, koja je pokazala pozitivnu korelaciju sa danima nakon punog cvetanja.
- ▶ Dobijeni rezultati ispitivanja vitalnosti semenih zametaka korišćenjem fluorohromnog bojenja nisu bili u saglasnostima sa rezultatima citoembrioloških ispitivanja funkcionalnog stadijuma kod primarnog, dok je podudaranje rezultata postojalo u slučaju sekundarnog semenog zametka.
- ▶ Rezultati ispitivanja inicijalnog i finalnog zametanja plodova imali su najviše vrednosti u varijanti stranooprašivanja, dok se nešto lošija pokazala varijanta samooprašivanja. Najslabije vrednosti u godinama ispitivanja dobijene su u varijanti slobodnog oprašivanja. Redosled sorti sa kojima su dobijene najbolje vrednosti neznatno je drugačiji u odnosu na njihov redosled kod analizirane dinamike rasta polenovih cevčica: Presenta, Hanita i Čačanska najbolja.
- ▶ Visoka pozitivna korelacija je utvrđena između broja tučkova sa prodorom polenove cevčice u nucelus semenog zametka, desetog dana od oprašivanja, i inicijalnog zametanja plodova. Kod finalnog zametanja plodova utvrđena je slaba pozitivna korelacija, kako sa prodorom polenovih cevčica u nucelus, tako i sa inicijalnim zametanjem plodova.

► U sve tri godine ispitivanja, kod korišćenih oprašivača u ogledu, je bio evidentan uticaj temperaturnih kretanja, praćenih u prvih deset dana od momenta punog cvetanja, na tok programne faze. Optimalne temperature i njihove najmanje oscilacije, u toku prvih deset dana od početka punog cvetanja, su bile u prvoj godini, što je rezultiralo sličnom dinamikom rasta polenovih cevčica u ispitivanim varijantama oprašivanja. U drugoj i trećoj godini ispitivanja u vreme punog cvetanja su bile više temperature i njihove veće oscilacije, stoga su korišćeni genotipovi kao oprašivači u ogledu na osnovu ispitivane dinamike rasta polenovih cevčica jasno ukazali na svoju adaptaciju ili poreklo.

Sagledavanje različitih citoembrioloških aspekata oplodjenja sorte šljive Pozna plava u ovom radu ima veliki značaj u rešavanju problema zametanja plodova, a samim tim i rodnosti, koje je ova sorta pokazala.

Rezultati su pokazali da je Pozna plava samooplodna sorta, ali da se daleko bolji rezultati dobijaju u varijanti stranooprašivanja. Izuzetno slabo zametanje plodova u varijanti slobodnog oprašivanja pokazalo je nepostojanje adekvatnog oprašivača u zasadu sa analiziranom sortom.

Ako se uzmu u obzir rezultati ispitivanja funkcionalnih stadijuma embrionove kesice ove sorte šljive, kao i rezultati ispitivanja kvantitativnih pokazatelja rasta polenovih cevčica u tučku dolazi se do toga da ovu sortu kakakteriše izuzetno kratak efektivni period oprašivanja. To nameće potrebu pravilanog odabira dva ili tri oprašivača koji će osim preklapanja u vremenu punog cvetanja sa ovom sortom imati i polen dobrog kvaliteta.

Na osnovu dobijenih vrednosti ispitivanih parametara rasta polenovih cevčica u tučku sorte šljive Pozna plava, sorte Hanita, Presenta i Čačanska najbolja se mogu preporučiti kao dobri oprašivači za ovu sortu šljive, u analiziranim agroekološkim uslovima Čačka.

9. LITERATURA

- Acar I., Kakani V.G. (2010): The effects of temperature on *in vitro* pollen germination and pollen tube growth of Pistacia spp. *Scientia Horticulturae*, 125: 569–572.
- Albuquerque N., Burgos L., Egea J. (2000): Consequences to fertilization of the developmental stage of apricot ovules at anthesis. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 75, 6: 662–666.
- Albuquerque N., Burgos L., Egea J. (2002): Variability in the developmental stage of apricot ovules at anthesis and its relationship with fruit set. *Annals of Applied Biology*, 141: 147–152.
- Albuquerque N., Burgos L., Sedgley M., Egea J. (2004): Contributing to the knowledge of the fertilisation process in four apricot cultivars. *Scientia Horticulturae*, 102: 387–396.
- Albuquerque N., Egea J., Burgos L., Martínez-Romero D., Valero D., Serrano M. (2006): The influence of polyamines on apricot ovary development and fruit set. *Annals of Applied Biology*, 149: 27–33.
- Alcaraz M.L., Montserrat M., Hormaza J.I. (2011): *In vitro* pollen germination in avocado (*Persea americana* Mill.): Optimization of the method and effect of temperature. *Scientia Horticulturae*, 130: 152–156.
- Alonso J.M., Socias i Company R. (2005): Differential pollen tube growth in inbred self-compatible almond genotypes. *Euphytica*, 144: 207–213.
- Anjum P., Shaukat A. (2008): Maintenance of pollen germination capacity of *Malus pumila* L., (*Rosaceae*). *Pakistan Journal of Botany*, 40, 3: 963–966.
- Anvari S.F., Stösser R. (1978a): Eine neue fluoreszenzmikroskopische methode zur beurteilung der befruchtungsfähigkeit der samenanlagen bei *Prunus*. *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung*, 81: 333–336.
- Anvari S.F., Stösser R. (1978b): Fluoreszenzmikroskopische untersuchungen des pollenschlauchwachstums und des zustands der samenanlagen bei sauerkirschen. *Mitteilungen Klosterneuburg*, 28: 23–30.

- Arazani K., Nejatian M.A., Karimzadeh G. (2005): Apricot (*Prunus armeniaca*) pollen morphological characterization through SEM, using the multivariate analysis. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 33: 381–388.
- Arbeloa A., Herrero M. (1987): The significance of the obturator in the control of pollen tube entry into the ovary in peach (*Prunus persica*). *Annals of Botany*, 60: 681–685.
- Arbeloa A., Herrero M. (1991): Development of the ovular structures in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch.]. *New Phytologist*, 118: 527–533.
- Asma B.M. (2008): Determination of pollen viability, germination ratios and morphology of eight apricot genotypes. *African Journal of Biotechnology*, 7: 4269–4273.
- Atkinson A.H., Heath R.L., Simpson R.J., Clarke A.E., Anderson M.A. (1993): Proteinase inhibitors in *Nicotiana glauca* stigmas are derived from a precursor protein which is processed into five homologous inhibitors. *Plant Cell*, 5: 203–213.
- Beppu K., Kataoka I. (2011): Studies on pistil doubling and fruit set of sweet cherry in warm climate. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 80, 1: 1–13.
- Beppu K., Okamoto S., Sugiyama A., Kataoka I. (1997): Effects of temperature on flower development and fruit set of “Satohnishiki” sweet cherry. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 65: 702–712.
- Beppu K., Suehara T., Kataoka I. (2001): Embryo sac development and fruit set of ‘Satohnishiki’ sweet cherry as affected by temperature, GA₃ and paclobutrazol. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 70, 2: 157–162.
- Berger F. (2008): Double-fertilization, from myths to reality. *Sexual Plant Reproduction*, 21: 3–5.
- Bolat I., Pirlak L., (2003): Effects of three plant growth regulators and boric acid on pollen germination and tube growth in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Bangladesh Journal of Botany*, 32: 53–56.
- Botu M., Şarpe C., Cosmulescu S. (2002): The genetic control of pollen fertility, pollenizing and fruit set for the *Prunus domestica* L. plum cultivars. *Acta Horticulturae*, 577: 139–145.

- Burd M. (1994): Bateman's principle and plant reproduction: the role of pollen limitation in fruit and seed set. *The Botanical Review*, 60: 83–139.
- Burgos L., Egea J., Dicenta F. (1991): Effective pollination period in apricot (*Prunus persica* L.) cultivars. *Annals of Applied Biology*, 119: 533–539.
- Burgos L., Berenguer T., Egea J. (1993): Self- and cross-compatibility among apricot cultivars. *HortScience*, 28, 2: 148-150.
- Cerović R. (1989): Mikrosporogeneza i plodnost višnje Šumadinke i Čačanskog rubina (*Prunus cerasus* L.). Magistarski rad, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd.
- Cerović R. (1991a): Cytogenetic properties of sour cherry in relation to pollen. *Genetika*, 23, 3: 247–258.
- Cerović R. (1991b): Usporedna primena parafinske i fluorescentno mikroskopske metode u ispitivanju vitalnosti semenih zametaka. *Jugoslovensko voćarstvo*, 25: 9–17.
- Cerović R. (1992): Pollen tube growth in sour cherry pistils in relation to fruit set. *Advances in Horticultural Science*, 6: 107-111.
- Cerović R. (1994): Histocitološki aspekti dinamike oplodnje kod višnje (*Prunus cerasus* L.). Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, Beograd.
- Cerović R., Ružić Đ. (1992a): Pollen tube growth in sour cherry (*Prunus cerasus* L.) at different temperatures. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 67, 3: 333-340.
- Cerović R., Ružić Đ. (1992b): Senescence of ovules at different temperatures and their effect on the behaviour of pollen tubes in sour cherry. *Scientia Horticulturae*, 51: 321–327.
- Cerović R., Mičić N. (1996): Oprašivanje i oplodnja jabučastih i koštičavih voćaka. *Jugoslovensko voćarstvo*, 30, 113–114: 73–98.
- Cerovic R., Micic N. (1999): Functionality of embryo sacs as related to their viability and fertilization success in sour cherry. *Scientia Horticulturae*, 79: 227–235.
- Cerović R., Milenković S., Nikolić M. (1999): Uticaj fungicida na klijanje polena višnje *in vitro*. *Jugoslovensko voćarstvo* 33: 157–163.
- Cerovic R., Ruzic D., Micic N. (2000): Viability of plum ovules at different temperatures. *Annals of Applied Biology*, 137: 53–59.

- Chagas E.A., Pio R., Chagas P.C., Pasqual M., Bettiol-Neto J.E. (2010): Medium composition and environmental conditions for the germination of pollen grains of pear rootstocks. *Ciência Rural*, 40: 231–236.
- Cheung A.Y. (1995): Pollen-pistil interaction in compatible pollination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92: 3077–3080.
- Cheung A.Y., Wu H.M. (2008): Structural and signaling networks for the polar cell growth machinery in pollen tubes. *Annual Review of Plant Biology*, 59: 547–572.
- Cousin M., Maataoui M.E. (1998): Female reproductive organs in self-compatible almond (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb) Lauranne and fertilization patterns. *Scientia Horticulturae*, 72: 287–297.
- Crawford B.C.W., Yanofsky M.F. (2008): The formation and function of the female reproductive tract in flowering plants. *Current Biology*, 18: R972–R978.
- Ćalić D., Devrnja N., Kostić M., Kostić I. (2013): Pollen morphology, viability, and germination of *Prunus domestica* cv. Požegača. *Scientia Horticulturae*, 155: 188–122.
- Dafni A., Firmage D. (2000): Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications. *Plant Systematics and Evolution*, 222: 113–132.
- De Ceault M.T., Polito V.S. (2010): High temperatures during bloom can inhibit pollen germination and tube growth, and adversely affect fruit set in the *Prunus domestica* cultivars ‘Improved French’ and ‘Muir Beauty’. *Acta Horticulturae*, 874: 163–168.
- Dicenta F., Ortega E., Canovas J.A., Egea J. (2002): Self-pollination vs. cross-pollination in almond: pollen tube growth, fruit set and fruit characteristics. *Plant Breeding*, 121: 163–167.
- Distefano G., Gentile A., Herrero M. (2010): Pollen–pistil interactions and early fruiting in parthenocarpic citrus. *Annals of Botany*, 108: 499–509.
- Dresselhaus T., Márton M.L. (2009): Micropylar pollen tube guidance and burst: adapted from defense mechanisms? *Current Opinion in Plant Biology*, 12: 773–780.
- Dumas C., Gaude T. (2006): Fertilization in plants: is calcium a key player? *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 17: 244–253.

- Dyś B. (1984): Development of embryo sacs and ovules at some stages of florescence. *Genetica Polonica*, 25, 2: 171–180.
- Dorđević M., Cerović R., Nikolić D., Radičević S. (2010): Unusual behaviour of growing pollen tubes in the ovary of plum culture (*Prunus domestica* L.). *Archives of Biological Sciences*, 62, 1: 137–142.
- Dorđević M., Radičević S., Cerović R., Milošević N., Mitrović M. (2012): Initial and final fruit set in plum cultivar ‘Pozna plava’ as affected by different types of pollination. *Acta Horticulturae*, 968: 121–124.
- Dorđević M., Cerović R., Radičević S., Nikolić D. (2014): Incompatible pollen tubes in the plum style and their impact on fertilization success. *Genetika*, 46, 2: 411–418.
- Eaton G.W. (1959): A study of the megagametophyte in *Prunus avium* and its relation to fruit setting. *Canadian Journal of Plant Science*, 39: 466–476.
- Edlund A.F., Swanson R., Preuss D. (2004): Pollen and stigma structure and function: the role of diversity in pollination. *The Plant Cell*, 16: S84–S97.
- Egea J., Burgos L. (1994): Year-to-year variation in the developmental stage of the embryo sac at anthesis in flowers of apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 69, 2: 315–318.
- Egea J., Burgos L. (1998): Fructification problems in continental apricot cultivars growing under Mediterranean climate. Ovule development at anthesis in two climatic areas. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 73: 107–110.
- Egea J., Burgos L. (2000): Ovule differences between single-kernelled and double-kernelled fruits in almond (*Prunus dulcis*). *Annals of Applied Biology*, 136: 291–295.
- Egea J., Burgos L., Garcia J.E., Egea L. (1991): Stigma receptivity and style performance in several apricot cultivars. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 66: 19–25.
- Erdtman G. (1952): Pollen morphology and plant taxonomy. Angiosperms. Almqvist and Wiksell, Stockholm.
- Evrenosoğlu Y., Misirli A. (2009): Investigations on the pollen morphology of some fruit species. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 33: 181–190.

- Fischer, A. (1953): The desing of experiments (sixth edition). Olyver and Boyd, London.
- Fogle H.W. (1977a): Identification of tree fruit species by pollen ultrastructure. Journal of the American Society for Horticultural Science, 102: 548–551.
- Fogle H.W. (1977b): Identification of clones within four tree fruit species by pollen exine patterns. Journal of the American Society for Horticultural Science, 102: 552–560.
- Frankling-Tong, N., Franklin, C. (2003): Gametophytic self-incompatibility inhibits pollen tube growth using different mechanisms. Trends in Plant Science, 12: 598–605.
- Fu Y., Wu G., Yang Z. (2001): Rop GTPase-dependent dynamics of tip-localized F-actin control tip growth in pollen tubes. Journal of Cell Biology, 152: 1019–1032.
- Furukawa Y., Bukovac M.J. (1989): Embryo sac development in sour cherry during the pollination period as related to fruit set. HortScience, 24: 1005–1008.
- Galleta G.J. (1983): Pollen and seed management. Moore, J.N., Janick, J. (Eds.), Methods in fruit breeding", Purdue University Press, West Lafayette, Indiana, pp. 23-47.
- Gane A.M., Clarke A.E., Bacic A. (1995): Localisation and expression of arabinogalactan-proteins in the ovaries of *Nicotiana glauca* Link and Otto. Sexual Plant Reproduction, 8: 278–282.
- Geraci A., Vincenza Polizzano V., Pasquale Marino P., Rosario Schicchi R. (2012): Investigation on the pollen morphology of traditional cultivars of *Prunus* species in Sicily. Acta Societatis Botanicorum Poloniae, 81, 3: 175–184.
- Gerlach D. (1969): A rapid safranin-crystal violet-light green staining sequence for paraffin sections of plant materials. Stain Technology, 44: 210–211.
- Gilani S.A., Qureshi R.A., Khan A.M., Potter D. (2010): Morphological characterization of the pollens of the selected species of genus *Prunus* Linn. from Northern Pakistan. African Journal of Biotechnology, 9: 2872–2879.
- Glišić I., Cerović R., Milošević N., Đorđević M., Radičević S. (2012): Initial and final fruit set in some plum (*Prunus domestica* L.) hybrids under different pollination types. Genetika, 44, 3: 583–593.

- Godini A. (1981): Observing pollen tube growth into selfed and crossed styles of two self-compatible almond cultivars by means of fluorescence. *Riv. Ortofl. Ital.*, 2: 135–142.
- Graaf B.H.J. de, Derksen J.W.M., Mariani C. (2001): Pollen and pistil in the progamic phase. *Sexual Plant Reproduction*, 14: 41–55.
- Guerra M.A., Wunsch A., López-Corrales M., Rodrigo J. (2010): Flower emasculation as the cause for lack of fruit set in japanese plum crosses. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 135, 6: 556–562.
- Guerrero-Prieto V. M., Vasilakakis M. D., Lombard P. B. (1985): Factors controlling fruit set of ‘Napoleon’ sweet cherry in Western Oregon. *HortScience*, 20, 5: 913–914.
- Halász J., Hegedus, A., Herman R., Stefanovits-Banyai E., Pedryc A. (2005): New self-incompatibility alleles in apricot (*Prunus armeniaca* L.) revealed by stylar ribonuclease assay and S-PCR analysis. *Euphytica*, 145: 57–66.
- Halász J., Pedryc A., Ercisli S., Yilmaz K.U., Hegedus A. (2010): S-genotyping supports the genetic relationships between Turkish and Hungarian apricot germplasm. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 135, 5: 410–417.
- Hall A.E. (1992): Breeding for heat tolerance. *Plant Breeding Reviews*, 10: 129–168.
- Hartmann W., Neümuller M. (2009): Plum breeding. In: Jain, S.M., Priyadarshan P.M. (Eds.). *Breeding plantation tree crops: Temperate species*. Springer Science, Stuttgart, Germany, pp. 161–231.
- Hauck N.R., Yamane H., Tao R., Iezzoni A.F. (2006): Accumulation of nonfunctional S-haplotypes results in the breakdown of gametophytic self-incompatibility in tetraploid *Prunus*. *Genetics*, 172: 1191–1198.
- Hebda R.J., Chinnappa C.C. (1994): Studies on pollen morphology of *Rosaceae*. *Acta Botanica Gallica*, 141, 2: 183–193.
- Hebda R.J., Chinnappa C.C., Smith B.M. (1991): Pollen morphology of the *Rosaceae* of western Canada. IV. *Luetkea*, *Oemleria*, *Physocarpus*, *Prunus*. *Canadian Journal of Botany*, 69, 12: 2583–2596.
- Hedhly A. (2011): Sensitivity of flowering plant gametophytes to temperature fluctuations. *Environmental and Experimental Botany*, 74: 9–16.

- Hedhly A., Hormaza J.I., Herrero M (2003): The effect of temperature on stigmatic receptivity in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Plant, Cell and Environment*, 26: 1673–1680.
- Hedhly A., Hormaza J.I., Herrero M. (2005a): Influence of genotype-temperature interaction on pollen performance. *Journal of Evolutionary Biology*, 18: 1494–1502.
- Hedhly A., Hormaza J.I., Herrero M. (2005b): The effect of temperature on pollen germination, pollen tube growth and stigmatic reseptivity in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. *Plant Biology*, 7: 476–483.
- Hedhly A., Hormaza J.I., Herrero M. (2007): Warm temperatures at bloom reduce fruit set in sweet cherry. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 81: 158–164.
- Hedhly A., Hormaza J.I., Herrero M. (2008): Global warming and sexual plant reproduction. *Trends in Plant Science*, 14, 1: 30–36.
- Hedhly A., Hormaza J.I., Herrero M. (2009): Flower emasculation accelerates ovule degeneration and reduces fruit set in sweet cherry. *Scientia Horticulturae*, 119: 455–457.
- Hegedüs, A., Halász, J. (2007). Recent findings of tree fruit self-incompatibility studies. *International Journal of Horticultural Science*, 13: 7–15.
- Hepler P.K., Vidali L., Cheung A.Y. (2001): Polarized cell growth in higher plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 17: 159–187.
- Herrero M. (1992): From pollination to fertilization in fruit trees. *Plant Growth Regulation*, 11: 27–32.
- Herrero M. (2000): Changes in the ovary related to pollen tube guidance. *Annals of Botany*, 85: 79–85.
- Herrero M. (2003): Male and female synchrony and the regulation of mating in flowering plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society B.*, 358, 1434: 1019–1024.
- Herrero M., Dickinson H.G. (1979): Pollen-pistil incompatibility in *Petunia hybrida*: changes in the pistil following compatible and incompatible intraspecific crosses. *Journal of Cell Science*, 36: 1–18.

- Herrero M., Dickinson H.G. (1981): Pollen tube development in *Petunia hybrida* following compatible and incompatible intraspecific matings. *Journal of Cell Science*, 47: 365–383.
- Herrero M., Arbeloa A. (1989): Influence of the pistil on pollen tube kinetics in peach (*Prunus persica*). *American Journal of Botany*, 76: 1441–1447.
- Higashiyama T. (2002): The synergid cell: attractor and acceptor of the pollen tube for double fertilization. *Journal of Plant Research*, 115: 149–160.
- Higashiyama T., Hamamura Y. (2008): Gametophytic pollen tube guidance. *Sexual Plant Reproduction*, 21: 17–26.
- Higashiyama T., Yabe S., Sasaki N., Nishimura Y., Miyagishima S., Kuroiwa H., Kuroiwa T. (2001): Pollen tube attraction by the synergid cell. *Science*, 293: 1480–1483.
- Higashiyama T., Kuroiwa H., Kuroiwa T. (2003): Pollen-tube guidance: Beacons from the female gametophyte. *Current Opinion in Plant Biology*, 6: 36–41.
- Higashiyama T., Inatsugi R., Sakamoto S., Sasaki N., Mori T., Kuroiwa H., Nakada T., Nozak H., Kuroiwa T., Nakano A. (2006): Species preferentiality of the pollen tube attractant derived from the synergid cell of *Torenia fournieri*. *Plant Physiology*, 142:481–491.
- Hjeltnes S.H., Nornes L. (2007): Pollination and pollen germination of some new plum cultivars. *Acta Horticulturae*, 734: 317–319.
- Holdaway-Clarke T.L., Hepler P.K. (2003): Control of pollen tube growth: role of ion gradients and fluxes. *New Phytologist*, 159: 539–563.
- Hormaza J.I., Herrero M. (1994): Gametophytic competition and selection. In: Williams E.G., Clarke A.E., Knox R.B. (Eds.), *Genetic control of self-incompatibility and reproductive development in flowering plants*. Kluwer, Germany, pp. 372–400.
- Hormaza J.I., Herrero M. (1996): Dynamics of pollen tube growth under different competition regimes. *Sexual Plant Reproduction*, 9: 153–160.
- Hormaza J.I., Herrero M. (1999): Pollen performance as affected by the pistilar genotype in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Protoplasma*, 208: 129–135.
- Huang B.Q., Russell S.D. (1992): Female germ unit: organization, isolation and function. *International Review of Cytology*, 140: 233–292.

- Igic B., Kohn J.R. (2001): Evolutionary relationships among self-incompatibility RNases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98: 13167–13171.
- Irenaeus T.K.S. (2012): Studies on flowering, fruit set and fruit retention in litchi. PhD Thesis. Bidhan Chandra Krishi Viswavidyalaya, WB, India.
- Irenaeus T.K.S., Mitra S.K. (2013): Understanding the pollen and ovule characters and fruit set of fruit crops in relation to temperature and genotype – a review. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 87: 157–167.
- Iwanami Y., Sasakuma T., Yamada Y. (1988): Pollen: Illustrations and scanning electronmicrographs. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Jeffries C.F., Brain P., Stott K.G., Belcher A.R. (1982): Experimental system and a mathematical model for studying temperature effects on pollen-tube growth and fertilization in plum. *Plant Cell and Environment*, 5: 231–236.
- Jia H.J., He F.J., Cai-Zhen Xiong C.Z., Fu-Rong Zhu F.R., Okamoto G. (2008): Influences of cross pollination on pollen tube growth and fruit set in Zuili plums (*Prunus salicina*). *Journal of Integrative Plant Biology*, 50, 2: 203–209.
- Jia H.J., Yang X., He F.J., Bin L. (2013): Anatomical studies of ovule development in the post-bloom pistils of the ‘Zuili’ plum (*Prunus salicina* Lindl.). *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine and Biotechnology)*, 14, 9: 800–806.
- Jones V., Stott, K.G., Williams, R.R. (1971): Pollination in plums. Rep. Long Ashton Res. Stn. for 1970, University of Bristol, pp. 24.
- Keulemans J. (1984): The effect of temperature on pollen tube growth and fruit set on plum trees. *Acta Horticulturae*, 149: 95–101.
- Keulemans J. (1994): Pollination and fruit set in self-incompatible plum cultivars. *Acta Horticulturae*, 359: 260–268.
- Kho Y.O., Baer J. (1971): Fluorescence microscopy in botanical research. *Zeiss Information*, 76: 54–57.
- Kim S., Mollet J.C., Dong J., Zhang K., Park S.Y., Lord E.M. (2003): Chemocyanin, a small basic protein from the lily stigma, induces pollen tube chemotropism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100: 16125–16130.

- Kitashiba H., Zhang S.L., Wu J., Shirasawa K., Nishio T. (2007): *S* genotyping and *S* screening utilizing *SFB* gene polymorphism in Japanese plum and sweet cherry by dot-blot analysis. *Molecular Breeding*, 21: 339–349.
- Korkmaz Y., Gülcan R., Misirli A., Askin M.A. (2001): Ovule and embryo-sac development in almond. In: AkB.E. (ed.). XI GREMPA Seminar on Pistachios and Almonds. Zaragoza: CIHEAM: 323–327.
- Koskela E., Kemp H., van Dieren M.C.A. (2010): Flowering and pollination studies with European plum (*Prunus domestica* L.) cultivars. *Acta Horticulturae*, 874: 193–201.
- Kota D.I., Lācis G. (2013): Evaluation of self-incompatibility locus diversity of domestic plum (*Prunus domestica* L.) using DNA-based *S*-genotyping. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B*, 67, 2: 109–115.
- Kozai N., Beppu K., Mochioka R., Boonprakob U., Subhadrabandhu S., Kataoka I. (2004): Adverse effects of high temperature on the development of reproductive organs in ‘Hakuho’ peach trees. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 79: 533–537.
- Krichevsky A., Kozlovsky S.V., Tian G.W., Chen M.H., Zaltsman A., Citovsky V. (2007): How pollen tubes grow. *Developmental Biology*, 303: 405–420.
- Kuzmanović M. (2008): *Biologija oplodjenja sorte šljive Čačanska lepotica (Prunus domestica L.)*. Magistarski rad, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd.
- Larson B.M.H., Barrett S.C.H. (2000): A comparative analysis of pollen limitation in flowering plants. *Biological Journal of the Linnean Society*, 69: 503–520.
- Lersten N.R. (2004): *Flowering plant embryology with emphasis on economic species*. Blackwell, State Avenue, Ames, Iowa, USA.
- Lillecrapp A.M., Wallwork M.A., Sedgley M. (1999): Female and male sterility cause low fruit set in a clone of the ‘Trevatt’ variety of apricot (*Prunus armeniaca*). *Scientia Horticulturae*, 82, 3–4: 255–263.
- Lombard P.B., Williams R.R., Stott K.G., Jeffries C.J. (1972): Temperature effects on pollen tube growth in styles of ‘Williams’ pear with a note on pollination deficiencies of ‘Comice’ pear. *Compte rendue du symposium ‘Culture du Poirier’*, pp. 265–279.

- López M., Alonso J.M., Martínez-Gómez P., Socias i Company R., Gradziel T.M., Batlle I. (2001): Biological and molecular assessment of self-incompatibility in almond. *Nucis – Newsletter*, 10: 8–11.
- Loupassaki M., Vasilakakis M., Androulakis I. (1997): Effect of preincubation humidity and temperature treatment on the *in vitro* germination of avocado pollen grains. *Euphytica*, 94: 247–251.
- Marcucci M.C., Visser T. (1987): Pollen tube growth in apple and pear styles in relation to self-incompatibility, incongruity and pollen load. *Advances in Horticultural Science*, 1: 90–94.
- Martinez-Garcia P.J., Dicenta F., Ortega E. (2012): Anomalous embryo sac development and fruit abortion caused by inbreeding depression in almond (*Prunus dulcis*). *Scientia Horticulturae*, 133: 23–30.
- Márton M.L., Cordts S., Broadhvest J., Dresselhaus T. (2005): Micropylar pollen tube guidance by egg apparatus 1 of maize. *Science*, 307: 573–576.
- Mazzeo A., Palasciano M., Gallotta A., Camposeo S., Pacifico A., Ferrara G. (2014): Amount and quality of pollen grains in four olive (*Olea europaea* L.) cultivars as affected by ‘on’ and ‘off’ years. *Scientia Horticulturae*, 170: 89–93.
- McClure B.A., Franklin-Tong V. (2006): Gametophytic self-incompatibility: understanding the cellular mechanisms involved in “self” pollen tube inhibition. *Planta*, 224: 233–245.
- McLaren G.F., Frase.A., Grant J.E. (1996): Some factors influencing fruit set in ‘Sundrop’ apricot. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 24: 55–63.
- Mert C. (2009): Temperature responses of pollen germination in walnut (*Juglans regia* L.). *Journal of Environmental Sciences*, 3, 8: 37–43.
- Mićić N. (1988): Morfologija polena šljive. *Jugoslovensko voćarstvo*, 22, 84–85: 173–181.
- Mićić N., Đurić G. (1998): Atrofija semenih zametaka kod morfološki atipičnih cvetova šljive. *Jugoslovensko voćarstvo*, 31, 121–122: 37–44.
- Mićić N., Kurtović M., Đurić G., Čmelik Z. (1988): Oblik i trajanje klijavosti polena šljive Požegače i Stenleja pri različitim uslovima čuvanja. *Radovi Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Sarajevu*, 40: 147–155.

- Mićić N., Čmelik Z., Đurić G., Jarebica Dž. (1989): Ornamentika egzine polena autohtonih šljiva Bosne. Radovi Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Sarajevu, 41: 59–69.
- Milatović D., Nikolić D. (2005): Proučavanje samooplodnosti sorti kajsije metodom fluorescentne mikroskopije. Voćarstvo, 39, 150: 171–178.
- Milatović D., Nikolić D. (2007a): Klijavost polena sorti kajsije (*Prunus armeniaca* L.). Savremena poljoprivreda, 56, 6: 108–114.
- Milatović D., Nikolić D. (2007b): Analysis of self-(in)compatibility in apricot cultivars using fluorescence microscopy. Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 82, 2: 170–174.
- Milatović D., Nikolić D., Rakonjac V., Fotirić-Akšić M. (2010): Cross-(in)compatibility in apricot (*Prunus armeniaca* L.). Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 85, 5: 394–398.
- Milošević N.T. (2013): Stepen oplodjenja i biološke osobine novih sorti šljive (*Prunus domestica* L.). Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd.
- Morenol M.Y., Miller-Azarenko A.M., Potts W. (1992): Genotype, temperature and fall-applied ethephon affect plum flower bud development and ovule longevity. Journal of the American Society for Horticultural Science, 117, 1: 14–21.
- Nasrallah J.B., Nishio T., Nasrallah M.E. (1991): The self incompatibility genes of *Brassica*: expression and use in genetic ablation of floral tissues. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 42: 393–422.
- Nava G.A., Dalmago G.A., Bergamaschi H., Paniz R., Santos R.P., Gilmar G.A.B. (2009): Effect of high temperatures in the pre-blooming and blooming periods on ovule formation, pollen grains and yield of ‘Granada’ peach. Scientia Horticulturae, 122: 37–44.
- Neumüller M. (2011): Fundamental and applied aspects of plum (*Prunus domestica* L.) breeding. In: Flachowsky H., Hanke V.M. (Eds.). Methods in temperate fruit breeding. Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology, Global Science Books, 5, 1: pp. 139–154.
- Nikolić D., Milatović D. (2010): Examining self-compatibility in plum (*Prunus domestica* L.) by fluorescence microscopy. Genetika, 42, 2: 387–396.

- Nikolić D., Rakonjac V., Fotirić-Akšić M. (2012): The effect of pollenizer on the fruit set of plum cultivar Čačanska Najbolja. *Journal of Agricultural Sciences*, 57, 1: 9–18.
- Nyéki J., Soltész M. (1996): Floral biology of temperate zone fruit trees and small fruits. Akadémia Kiadó, Budapest, Hungary.
- Nyéki J., Szabó Z. (1996): Fruit set of plum cultivars under Hungarian ecological conditions. *Acta Horticulturae*, 423: 185–191.
- O'Brien S.P. (1994): Pistil structure and pollen tube pathways in *Leptospermum myrsinoides* and *L. continentale* (Myrtaceae). *Annals of Botany*, 73: 225–230.
- Ogašanović D. (1985): Iznalaženje najpogodnijih oprašivača za nove sorte šljiva. *Jugoslovensko voćarstvo*, 71-72: 109–122.
- Okie W.R., Weinberger J.H. (1996): Plums. In: Janick J, Moore J.N. (Eds): *Fruit Breeding*, vol. 1: Tree and tropical fruits. Wiley, New York, pp. 559–607.
- Okie W.R., Hancock J.F. (2008): Plums. In: Hancock J.F. (ed.). *Temperate fruit crop breeding germplasm to genomics*. Springer, East Lansing, MI, pp. 337–358.
- Olesen J.E., Bindi M. (2002): Consequences of climate change for European agricultural productivity, land use and policy. *European Journal of Agronomy*, 16: 239–262.
- Ortega E., Martínez-García P.J., Dicenta F., Egea J. (2010): Disruption of endosperm development: an inbreeding effect in almond (*Prunus dulcis*). *Sexual Plant Reproduction*, 23: 135–140.
- Palanivelu R., Tsukamoto T. (2011): Pathfinding in angiosperm reproduction: pollen tube guidance by pistils ensures successful double fertilization. *WIREs Developmental Biology*, 1: 96–113.
- Palanivelu R., Brass L., Edlund A.F., Preuss D. (2003): Pollen tube growth and guidance is regulated by *POP2*, an *Arabidopsis* gene that controls GABA levels. *Cell*, 114: 47–59.
- Pimienta E., Polito V.S. (1983): Ovule abortion in 'Nonpareil' almond (*Prunus dulcis* [Mill.] D.A. Webb). *American Journal of Botany*, 69: 913–920.
- Pirlak L. (2002): The effect of temperature on pollen germination and pollen tube growth of apricot and sweet cherry. *Gartenbauwissenschaft*, 67: 61–64.

- Postweiler K., Stösser R., Anvari S.F. (1985): The effect of different temperatures on the viability of ovules in cherries. *Scientia Horticulturae*, 25: 235–239.
- Preil W. (1970): Observing the growth of pollen tubes in pistil and ovarian tissue by means of fluorescence microscopy. *Zeiss Information*, 75: 24–25.
- Pressman E., Peet M.M., Pharr M.D. (2002): The effect of heat-stress on tomato pollen characteristics is associated with changes in carbohydrate concentration in the developing anthers. *Annals of Botany*, 90: 631–636.
- Punwani J.A., Drews G.N. (2008): Development and function of the synergid cell. *Sexual Plant Reproduction*, 21: 7–15.
- Qin Y., Yang Z. (2011): Rapid tip growth: Insights from pollen tubes. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 22: 816–824.
- Radičević S. (2013): Biologija oplodjenja i pomološke osobine novointrodotovanih sorti trešnje (*Prunus avium* L.). Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd.
- Reiser L., Fischer R. (1993): The ovule and the embryo sac. *The Plant Cell*, 5: 1291–1301.
- Robertson L. (2008): What is pollen? The National Pollen and Aerobiology Research Unit, University of Worcester, <http://pollenuk.worc.ac.uk/aero/pm/WIP.htm>.
- Rodrigo J., Herrero M. (1998). Influence of intraovular reserves on ovule fate in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Sexual Plant Reproduction*, 11: 86–93.
- Rodrigo J., Herrero M. (2002): Effects of pre-blossom temperatures on flower developmental fruit set in apricot. *Scientia Horticulturae*, 92: 125–135.
- Rodrigo J., Hormaza J.I., Herrero M. (2000): Ovary starch reserves and flower development in apricot (*Prunus armeniaca*). *Physiologia Plantarum*, 108: 35–41.
- Rodriguez-Riano T., Dafni A. (2000): A new procedure to assess pollen viability. *Sexual Plant Reproduction*, 12: 241–244.
- Rowley J.R., Skvarla J.J., Wallis B. (2000): Microsporogenesis in *Pinus sylvestris* L. VIII. Tapetal and late pollen grain development. *Plant Systematics and Evolution*, 225: 201–224.
- Ruiz D., Egea J. (2007): Ovule development at anthesis in apricot (*Prunus armeniaca*) varieties in a Mediterranean climate. *Annals of Applied Biology*, 151: 43–51.

- Ruiz D., Egea J. (2008): Analysis of the variability and correlations of floral biology factors affecting fruit set in apricot in a Mediterranean climate. *Scientia Horticulturae*, 115: 154–163.
- Ruiz D., Campoy J.A., Egea J. (2010): Ovule development at anthesis in Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) cultivars. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 8, 1: 151–158.
- Russell S.D. (1993): The egg cell: development and role in fertilization and early embryogenesis. *Plant Cell*, 5: 1349–1359.
- Russell S.D. (1996): Attraction and transport of male gametes for fertilization. *Sexual Plant Reproduction*, 9: 337–342.
- Sakata T., Oshino T., Miura S., Tomabechil M., Tsunaga Y., Higashitani N., Miyazawa Y., Takahashi H., Watanabe M., Higashitani A. (2010): Auxins reverse plant male sterility caused by high temperatures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107: 8569–8574.
- Salesses G., Bonnet A. (1994): Cytological studies of tetra-, hepta-, and octoploid interspecific hybrids between *P. cerasifera*, *P. spinosa* and *P. domestica*. *Acta Horticulturae*, 359: 26–32.
- Sanchez A.M., Bosch M., Bots M., Nieuwland J., Feron R., Mariani C. (2004): Pistil factors controlling pollination. *Plant Cell*, 16: 98–106.
- Sanzol J., Herrero M. (2001): The “effective pollination period” in fruit trees. *Scientia Horticulturae*, 90: 1–17.
- Sato M., Kanbe K., Nakagawa S., Yuda E., Fukunaga S. (1988): Studies on development of the embryo sac and its abnormality in the triploid apple cultivar ‘Mutsu’. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 57: 366–372.
- Sharafi Y. (2011): *In vitro* pollen germination in stone fruit tree of *Rosaceae* family. *African Journal of Agricultural Research*, 6, 28: 6021–6026.
- Socias i Company R., Felipe A.J. (1987): Pollen tube growth and fruit set in a self-compatible almond selection. *HortScience*, 22: 113–116.
- Socias i Company R., Alonso J.M. (2004): Cross-incompatibility of ‘Ferragnès’ and ‘Ferralise’ and pollination efficiency for self-compatibility transmission in almond. *Euphytica*, 135: 333–338.

- Sorkheh K., Shiran B., Rouhi V., Khodambashi M., Wolukau J.N., Ercisli S. (2011): Response of *in vitro* pollen germination and pollen tube growth of almond (*Prunus dulcis* Mill.) to temperature, polyamines and polyamine synthesis inhibitor. *Biochemical Systematics and Ecology*, 39: 749–757.
- Stajić N., Dabić G., Mičić N. (1989): Prilog poznavanju klijavosti polena šljive. *Poljoprivredni preglad* 1: 59–64.
- Stanley R.G., Linskens H.F. (1974): *Pollen: biology, biochemistry, management*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Stösser R., Anvari S.F. (1981): Pollen tubes growth in the pericarp tissue of cherries. *Gartenbauwissenschaft*, 46: 154–158.
- Stösser R., Anvari S.F. (1982): On the senescence of ovules in cherries. *Scientia Horticulturae*, 16: 29–38.
- Stösser R., Anvari S.F. (1990): On the longevity of ovules in relation to fruit set in stone fruit. *Erwerbsobstbau*, 32: 134–137.
- Stösser R., Hartman W., Anvari S.F. (1996): General aspects of pollination and fertilization of pome and stone fruits. *Acta Horticulturae*, 423: 15–22.
- Stott K.G., Jefferies C.J., Jago C. (1973): Pollination and fruit-set in plum. *Rep. Long Ashton Res. Stn. for 1972, University of Bristol*, 23–26.
- Surányi D. (2006): Comparative study of different fertile groups in plums. *International Journal of Horticultural Science* 12, 3: 71–76.
- Swanson R., Edlund A.F., Preuss D. (2004): Species specificity in pollen-pistil interactions. *Annual Review of Genetics*, 38: 793–818.
- Tao R., Iezzony A. (2010): The S-RNase-based gametophytic self-incompatibility system in *Prunus* exhibits distinct genetic and molecular features. *Scientia Horticulturae*, 124, 4: 423–433.
- Thomson M.M., Liu L.J. (1973): Temperature, fruit set and embryo sac development in 'Italian' prune. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 98: 193–197.
- Thomson J.D., Rigney L.P., Karoly K.M., Thomson B.A. (1994): Pollen viability, vigor, and competitive ability in *Erythronium grandiflorum* (*Liliaceae*). *American Journal of Botany*, 81: 1257–1266.

- Tomer E., Gottreich M. (1976): Defective ovules in avocado cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 101, 5: 620–623.
- Tubiello F.N., Soussana J.F., Howden S.M. (2007): Crop and pasture response to climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104: 19686–19690.
- Ünal M., Vardar F., Ayturk Ö. (2013): Callose in plant sexual reproduction (Chapter 14). In: *Current progress in biological research*, Dr. Marina Silva-Opps (Eds.), InTech,
- Vasilakakis M.D., Porlingis I.C. (1985): Effect of temperature on pollen germination, pollen tube growth, effective pollination period and fruit set on pear. *HortScience*, 10: 733–735.
- Vuletin Selak G., Cuevas J., Goreta Ban S., Pinillos V., Dumicic G., Perica S. (2014): The effect of temperature on the duration of the effective pollination period in ‘Oblica’ olive (*Olea europaea*) cultivar. *Annals of Applied Biology*, 164, 1: 85–94.
- Wertheim S.J. (1996): Methods for cross pollination and flowering assessment and their interpretation. *Acta Horticulturae*, 423: 237–241.
- Weterings K., Russell S.D. (2004): Experimental analysis of the fertilization process. *Plant Cell*, 16: S107–S118.
- Wilcock C., Neiland R. (2002): Pollination failure in plants: why it happens and when it matters. *Trends in Plant Science* 7, 6: 270–277.
- Williams R.R. (1970): Factors affecting pollination in fruit trees. In: Luckwill L.C., Cutting C.V. (Eds.) *Physiology of tree crops*, Academic Press, London, New York, pp. 193–207.
- Yang W.A., Shi D.Q., Chen Y.H. (2010): Female gametophyte development in flowering plants. *Annual Review of Plant Biology*, 61: 89–108.
- Yoder K., Yuan R.C., Combs L., Byers R., McFerson J., Schmidt T. (2009): Effects of temperature and the combination of liquid lime sulfur and fish oil on pollen germination, pollen tube growth, and fruit set in apples. *HortScience*, 44: 1277–1283.

- Zarrabi A., Imani A. (2011): Effects of fungicides on *in vitro* pollen germination, tube growth and morphology of almond (*Prunus dulcis*). African Journal of Agricultural Research, 6: 5645–5649.
- Zinkl G.M., Zwiebel B.I., Grier D.G, Preuss D. (1999): Pollen-stigma adhesion in *Arabidopsis*: a species-specific interaction mediated by lipophilic molecules in the pollen exine. Development, 126: 5431–5440.
- Zonia L., Munnik T. (2004): Osmotically induced cell swelling versus cell shrinking elicits specific changes in phospholipid signals in tobacco pollen tubes. Plant Physiology, 134: 813–823.

BIOGRAFSKI PODACI

Milena Đorđević je rođena 24. januara 1976. godine u Čačku. Osnovnu i srednju školu završila je u Čačku. Prirodno-matematički fakultet u Kragujevcu upisala je školske 1994/95., a diplomirala 2001. godine. Poslediplomske studije na Poljoprivrednom fakultetu u Zemunu, smer Genetika i oplemenjivanje voćaka i vinove loze, upisala je školske 2003/04., gde je do juna 2007. godine položila sve ispite predviđene planom i programom, sa prosečnom ocenom 9,34. Magistarsku tezu pod naslovom „Biologija oplođenja sorte šljive Čačanska lepotica (*Prunus domestica* L.)” odbranila je 4. jula 2008. godine na Poljoprivrednom fakultetu u Beogradu. U zvanje istraživač-saradnik izabrana je 29. januara 2009. godine, a zbog dva porodiljska odsustva istraživačko zvanje je produženo do 29. januara 2014. godine.

Zaposlena je u Institutu za voćarstvo od 5. novembra 2004. godine, prvo u Odeljenju za fiziologiju voćaka, a od 2008. godine u Odeljenju za pomologiju i oplemenjivanje voćaka, na istraživanjima iz oblasti reproduktivne biologije voćaka.

Doktorsku disertaciju pod naslovom „Citoembriološki aspekti oplođenja sorte šljive „Pozna plava“ (*Prunus domestica* L.)” prijavila je 8. septembra 2014. godine na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu, pod rukovodstvom prof. dr Dragana Nikolića.

Tokom svog istraživačkog rada učestvovala je u realizaciji više projekata iz oblasti tehnološkog razvoja. Trenutno radi na realizaciji zadatka projekta TR-31064: „Stvaranje i očuvanje genetičkog potencijala kontinentalnih vrsta voćaka”, finansiranog sredstvima Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Autor je i koautor većeg broja radova publikovanih u međunarodnim i domaćim časopisima. Svoje rezultate je prezentovala na većem broju naučnih skupova u zemlji i inostranstvu.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписана: Милена Ђорђевић

број уписа: 1348

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Цитоембриолошки аспекти оплођења сорте шљиве „Позна плава“ (*Prunus domestica* L.)”

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

У Београду, 05. 06. 2015.

Потпис докторанда

Milena Djordjevic

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Милена Ђорђевић

Број уписа: 1348

Студијски програм: -

Наслов рада: „Цитоембриолошки аспекти оплођења сорте шљиве „Позна плава“
(*Prunus domestica* L.)”

Ментор: др Драган Николић, редовни професор, Пољопривредни факултет
Универзитета у Београду

Потписана: Милена Ђорђевић

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, 05. 06. 2015.

Milena Djordjevic

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом: „Цитоембриолошки аспекти оплођења сорте шљиве „Позна плава“ (*Prunus domestica* L.)“, која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду, 05. 06. 2015.

Потпис докторанда

Silvana Dorstevic