

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ШУМАРСКИ ФАКУЛТЕТ
Број:03-1125/5
Датум:27.05.2016.

На основу члана 130. Статута Шумарског факултета а у вези члана 30. и члана 21. Правилника о докторским студијама, Декан Шумарског факултета доноси следећу

О Д Л У К У

Израђена докторска дисертација **мр Драгане Скочајић** под насловом:

„РАНО УТВРЂИВАЊЕ КОМПАТИБИЛНОСТИ SATO-ZAKURA ТРЕШАЊА И ДОМАЋИХ
ПОДЛОГА СПАЈАЊЕМ КАЛУСА У УСЛОВИМА IN VITRO”

са Извештајем Комисије ставља се на увид јавности у Библиотеци и интернет страници
Факултета са роком од **30 дана**.

Одлуку доставити: Библиотеци Факултета, истаћи на огласну таблу и сајт факултета,
писарници, Служби за наставу и студентска питања.

ДЕКАН
Проф.др РАТКО РИСТИЋ

ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ИЗРАЂЕНЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ

1. Орган који је именовано (изабрао) комисију и датум:

Наставно-научно веће Шумарског факултета Универзитета у Београду,
Одлука број 01-2/50 од 30.03.2016. године.

2. Састав комисије са назнаком имена и презимена сваког члана, звања, назива уже научне области за коју је изабран у звање, датум избора у звање и назив факултета, установе у којој је члан комисије запослен:

1. **Др Михаило Грбић**, редовни професор Универзитета у Београду – Шумарски факултет, уже научна област: Пејзажна архитектура и хортикултура, датум избора: 29.04.2004. године Универзитет у Београду – Шумарски факултет
2. **Др Матилда Ђукић**, редовни професор Универзитета у Београду – Шумарски факултет, уже научна област: Пејзажна архитектура и хортикултура, датум избора: 28.12.2005. године Универзитет у Београду – Шумарски факултет
3. **Др Ђурђина Ружић**, научни саветник Института за воћарство Чачак, уже научна област: Биотехничке науке – пољопривреда – воћарство, виноградарство и хортикултура, датум избора: 19.03.2008. године Институт за воћарство у Чачку
4. **Др Милица Фотирић Акшић**, ванредни професор Универзитета у Београду – Пољопривредни факултет, уже научна област: Оплемењивање воћака и винове лозе, датум избора: 20.11.2015. Универзитет у Београду – Пољопривредни факултет
5. **Др Драгана Ранчић**, доцент, Универзитета у Београду – Пољопривредни факултет, уже научна област: Пољопривредна ботаника, датум избора: 06.06.2012. Универзитет у Београду Пољопривредни факултет.

II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ

1. Име, име једног родитеља, презиме:

Драгана Момчило Скочајић

2. Датум и место рођења, општина, држава:

24.01.1971. године, Београд, Србија

3. Датум одбране, место и назив магистарске тезе/мастер рада:

14.11.2005. године, Београд, "Утврђивање степена дормантности и оптималних предсетвених третмана семена врста рода *Sorbus*".

1. Научна област из које је стечено академско звање магистра наука/мастера: Пејзажна архитектура и хортикултура

III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

„РАНО УТВРЂИВАЊЕ КОМПАТИБИЛНОСТИ SATO-ZAKURA ТРЕШАЊА И ДОМАЋИХ ПОДЛОГА СПАЈАЊЕМ КАЛУСА У УСЛОВИМА IN VITRO”

IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Докторска дисертација мр Драгане Скочајић садржи укупно 260 страна, од којих је 236 стране текст, 10 страна прилога и 14 страна на којима се налазе биографија и библиографија кандидата, као и изјаве о ауторству, истоветности штампане и електронске верзије докторског рада и изјава о коришћењу.

Докторска дисертација садржи На почетку докторске дисертације, налазе се кључне документационе информације и резиме, на српском и енглеском језику, са кључним речима, као и пописи скраћеница.

Текст дисертације је подељен у 8 поглавља, која су структурирана у посебне логички повезане целине:

1. УВОД

1.1. Опште и таксономске карактеристике рода *Prunus* L.

1.1.1. Подрод *Cerasus* Pers.

1.1.1.1. *Prunus avium* L.

1.1.1.2. *Prunus* 'Colt' (*P. avium* x *P. pseudocerasus*)

1.1.1.3. *Prunus mahaleb* L.

1.1.1.4. *Prunus serotina* Ehrh.

1.1.2. Опште карактеристике и систематика групе Јапанских цветајућих трешања

1.1.2.1. *Prunus serrulata* Lindl.

1.1.2.2. *Prunus serrulata* 'Amanogawa'

1.1.2.3. *Prunus serrulata* 'Kanzan'

1.1.2.4. *Prunus serrulata* 'Kiku-shidare-zakura'

1.2. Начини размножавања јапанских таксона трешње

1.3. Калемљење и формирање споја

1.3.1. Инкомпатибилност калемљења, класификација и узроци настанка

1.3.1.1. Ћелијски механизми који доводе до појаве инкомпатибилности

1.3.1.2. Биохемијске основе настанка инкомпатибилности

1.4. Култура калусних ткива

1.4.1. Калус формиран утицајем хормона из медијума

1.4.2. Калус индукован озледама

1.5. Досадашња истраживања на пољу инкомпатибилности врста рода *Prunus* и коришћење *in vitro* техника у овој области истраживања

2. ЦИЉ И ОСНОВНЕ ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ РАДА

3.1. Припремање узорака за површинку стерилизацију

3.2. Индукција калуса из меристема бочних пупољака

3.3. Индукција калуса из вегетативних делова матичних биљака

3.4. Утврђивање јачине споја калуса подлоге и племке

3.4.1. Припрема узорака за утврђивање јачине споја визуелном оценом

3.4.2. Припрема спојева калуса подлоге и племке за цитолошку анализу

3.4.2.1. Припрема трајних препарата

3.4.2.2. Припрема привремених препарата

3.4.3. Припрема узорака за хемијску анализу полифенола и укупне антиоксидативне активности

3.4.3.1. Одређивање укупних полифенолних једињења

3.4.3.2. Одређивање антиоксидативне активности

3.4.3.3. Одређивање састава фенолних једињења УНПЛС течном хроматографијом – масеном спектрометријом (LC/MS)

4. РЕЗУЛТАТИ РАДА

4.1. Успостављање стерилне културе на прелиминарним узорцима

4.2. Резултати индукције калуса из меристема бочних пупољака и вегетативних делова летораста

4.2.1. Индукција калуса таксона *Prunus serrulata*

4.2.2. Индукција калуса врста подлога

4.2.3. Анализа пораста масе и степен потамњивања индукованог калуса из меристема пупољака

4.2.4. Индукција калуса из вегетативних делова са адултних матичних

биљака

4.2.5. Анализа пораста масе калуса из супкултуре индукованог калуса

4.2.5.1. Динамика раста калуса после супкултуре

4.2.5.2. Анализа релативног раста калуса (РРК) у супкултури

4.3. Резултати анализе јачине споја калуса племке и подлоге

4.3.1. Успешност спајања *Prunus serrulata* 'Amanogawa' са различитим врстама подлоге

4.3.2. Успешност спајања *Prunus serrulata* 'Kanzan' са различитим врстама подлоге

4.3.3. Успешност спајања *Prunus serrulata* 'Kiku-shidare-zakura' са различитим врстама подлоге

4.3.4. Успешност спајања *Prunus serrulata* као посредника са *Prunus avium*, *Prunus* 'Colt' и *Prunus serotina*

4.4. Анализа садржаја укупних фенола (ТПС) и укупне антиоксидативне активности (RSA)

4.4.1. Анализа садржаја појединачних полифенола у спојевима различитих комбинација калуса

4.4.1.1. Анализа главних компонената хетеропластичних спојева

4.4.1.2. Анализа главних компонената хомеопластичних спојева

5. ДИСКУСИЈА

6. ЗАКЉУЧЦИ

7. ЛИТЕРАТУРА

8. ПРИЛОЗИ

На крају су дате биографија и библиографија аутора, као и: Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације и Изјава о коришћењу. Дисертација је написана ћирилицом, у складу са Упутством за обликовање докторске дисертације Универзитета у Београду.

V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ:

У поглављу **1. УВОД** (1–53 стр.) кандидаткиња наводи да је компатибилност код калемљеља значајан проблем у биљној производњи уопште, а да је истовремено много више проучаван у утилитарној хортикултури за економски значајне врсте (пре свега у воћарству). Полазећи од ове чињенице, а с обзиром на неистраженост овог проблема у орнаменталној хортикултури, образлаже због чега је изабрана ова тема истраживања и зашто украсни таксони подрода *Cerasus*, посебне групе, која је на прелазу између утилитарне и

орнаменталне хортикултуре. Даље описује карактеристике које ове врсте чине украсним: разноликост цветова, различитост периода цветања и дужине трајања цвета, специфичност хабитуса и/или боју листова и коре стабла.

Говорећи о предмету истраживања, наводи да је то анализа спојева калусног ткива између култивара јапанских трешања *Prunus serrulata* 'Amanogawa', 'Kanzan' и 'Kiku-shidare-zakura' са калусом обичне трешње (*Prunus avium* L.), као најчешће подлоге код нас, али и са калусом *Prunus* 'Colt', *Prunus mahaleb* L. и *Prunus serrulata*. Поред тога, са калусом добијеним из ткива јапанске трешње (*Prunus serrulata*) извршено је испитивање могућности коришћења ове врсте као посредника у калемљењу између наших подлога и јапанских култивара. Као негативна контрола компатибилности подлоге и племке, спајани су калуси јапанских култивара са калусом касне сремзе (*Prunus serotina* Ehrh.) и калусом патуљастог клона крушке (*Pyrus communis* 'Pyrodwarf').

У посебним потпоглављима описује опште и таксономске карактеристике рода *Prunus* L. као и опште карактеристике и систематику групе јапанских цветајућих трешања. У уводу даље износи општа научна и практична сазнања о калемљењу и формирању споја, са посебним освртом на инкомпатибилност калемљења, класификације и узроке настанка на нивоу ћелијских механизма и биохемијске основе.

После краће осврта на културу биљних ткива уопште, знатно већи део посвећује специфичним техникама *in vitro* – култури калусних ткива и проучавању инкомпатибилности. Поглавље завршава прегледом досадашњих истраживања на пољу инкомпатибилности врста рода *Prunus* и коришћење *in vitro* техника у овој области истраживања. Истраживања у *in vitro* условима за утилитарне таксоне рода *Prunus* континуирано се изводе од почетака развоја ове технике размножавања: Quoirin & Le Poivre (1977); Cossio et al., (1981); Ranjit et al., (1988); Dradi et al. (1996); Pruski et al. (2005), и настављају се до данас: (Hossini et al., 2010; Mahdavian et al., 2011; Druart, 2013). Код нас, истраживања започињу Vinterhalter et al. (1982), Nešković (1985), Cerović & Ružić (1987), Ružić (1997, 1982, 2000, 2001), Ružić & Cerović (1991, 2001), Miletić et al. (2008), Vujović et al. (2009), Ružić et al. (2010), Dorić et al. (2014).

Што се тиче украсних представника овог рода, истраживања су мањег обима вероватно због мање економске добити: Pruski et al. (2000, 2005); Hokanson & Pooler (2000); Cheong & Kim (2000); Kalinina & Brown (2007); Katano & Irie (1991); Akita et al. (2006); Kim et al. (1993); Koh et al. (1997); Cheong (2000); Cheong & Kim (2000, 2001); Duta et al. (2009). Увидом у литературу установљено је да нема радова наших аутора који су се бавили методама микропропагације украсних таксона цветајућих трешања.

Коришћење *in vitro* техника показало се значајним у истраживањима феномена компатибилности калемљења и обезбеђивању добре корелације између *in vivo* и *in vitro* добијених резултата. Досадашња истраживања која се баве проблематиком компатибилности калемљења односе се већином на воћне саднице из родова *Prunus*, *Pyrus*, *Malus* и *Vitis*: (Moore, 1982; Moore et al., 1986; Heuser, 1987; Treutter & Feucht, 1988; Moore, 1991; Soumelidou et al., 1994; Moreno

et al., 1994; Errea et al., 1994, 1994a; Ermel et al., 1997; Pina, 2005; Errea, 2005; Usenik et al., 2006; Pina 2006; Pina et al., 2009; Zarrouk et al., 2010).

Посебну пажњу кандидаткиња посвећује досадашњим истраживањима гајења сраслих калусних ткива подлоге и племке *in vitro* и евидентирања чврстине споја, присуства липида и фенолних компоненти као индикатора инкомпатибилности наводећи радове Errea et al., 1992, 2000; Musacchi et al., 2000; Errea & Pina, 2001; Todić et al., 2005; Nito et al., 2005; Mng'omba, 2007; Feeney et al., 2007; Pina, 2008.

У другом поглављу **ЦИЉ И ОСНОВНЕ ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА** (54–55 стр.) кандидаткиња концизно и јасно истиче значај и циљ рада да се у лабораторијским условима, употребом калусне културе утврди брз и оптималан протокол за рано утврђивање компатибилности украсних култивара цветајућих трешања и домаћих подлога трешања чиме би се избегло коришћење спојева који могу изазвати тренутну или одложену инкомпатибилност испољену непосредно након калемљења, или тек по пласирању садница.

Крајњи циљ рада је могућност примене метода за добијање прелиминарних резултата компатибилности односно инкомпатибилности код различитих родова украсног дрвећа, која би се испитивала на захтев произвођача, чиме би се повећао успех калемљења и омогућила производња квалитетног садног материјала.

Имајући у виду предмет и циљ истраживања дефинисане су следеће полазне хипотезе:

- Различите хранљиве подлоге и комбинације фитохормона у њима утицаће на степен индукције, масу индукованог калуса, потамњивање и брзину индукције код истраживаних таксона.
- Почетни експланте (пупољци, дршке листа, делови ламине) даће различиту продукцију и квалитет калуса па ће се истраживања усмерити на избор најподеснијих за добијање брзог протокола индукције калуса за успостављање технике фузије.
- Коришћењем технике спајања калуса подлоге и племке *in vitro*, могуће је у лабораториским условима пратити промене и евентуалне абнормалности у развоју спојених ткива.
- Анализом и упоређивањем јачине споја калуса подлоге и племке и праћењем развоја калуса на споју, успоставиће се погодан метод за рано утврђивање компатибилности.
- Хистохемијским студијама споја калуса и анализом липида и фенола потврдиће се оптимална комбинација подлога домаћих трешања и племки из групе *Sato-zakura*.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ РАДА (56–73 стр.) је део у коме се наводе основне карактеристике материјала и степен зрелости коришћеног ткива (физиолошка старост) као и провенијенција полазног материјала. Материјал за индукцију калуса односно почетни експлант били су: 1. петелјка листа, 2. основа листа са делом петелјке, 3. делови лисне плоче 0,5 x 0,5 cm са централним нервом, 4. део летораста младог изданка (дужине око 0,5 cm) са пупољком као и 5. дормантни пупољци.

У другом знатно обимнијем делу описане су све методе примењене у дисертацији почев од припреме узорака за површинку стерилизацију до припреме узорака за хемијску анализу и одређивање укупних полифенолних једињења, антиоксидативне активности и састава фенолних једињења UHPLC течном хроматографијом – масеном спектрометријом (LC/MS).

Кандидаткиња детаљно описује различите протоколе за припрему материјала прилагођавајући средства за стерилизацију физиолошком стању и експонираности експланта. Даље, износи детаље везане за препарирање ткива посебно за пупољке, а посебно за вегетативне делове пролећних, неодрвењених летораста и даје саставе коришћених медијума (MS (Murashige & Skoog, 1962), WPM (Woody Plant Medium; Lloyd & Mc-Cown, 1980) и SH (Schenk & Hildebrandt, 1972) уз додатак 30 g/L сахарозе, 6,5 g/L агара, 100 mg/L иноситола за MS и WP медијум и 200 mg/L иноситола за SH) и концентрације и садржаје хормона: ауксина (2,4-D, NAA и IBA) и цитокинина (BAP). За различите ауксине, односно њихове концентрације, које су варирале од 0,5 до 2 mg/L, било је пет варијанти у сва три медијума, а означавани су бројевима од 1–5. Концентрација BAP била је стална (0,5 mg/L).

За анализу успешности индукције калуса оцењивани су проценат експланата на којима је индукован калус, дан почетка индукције калуса и степен покривености експланта калусом који су мерени 30. и 35. дана од постављања експланата на индукциони медијум.

За анализу успешности индукције калуса оцењивани су проценат експланата на којима је индукован калус, дан почетка индукције калуса и степен покривености експланта калусом који су мерени 30. и 35. дана од постављања експланата на индукциони медијум. Формирани калус је одвајан и постављан на нову хранљиву подлогу при чему је утврђен најпогоднији медијум за даљи развој за сваку врсту и култивар. Субкултура калуса је вршена на сваких 20 до 30 дана. Сви *in vitro* експерименти изведени су у Лабораторији за културу ткива, Катедре за пејзажну хортикултуру, Шумарског факултета.

У потпоглављу “Утврђивање јачине споја калуса подлоге и племке“ даје се опис припрема узорака за утврђивање јачине споја визуелном оценом, припрема за цитолошку анализу прављењем сталних или привремених препарата и припрема узорака за хемијску анализу полифенола и укупне антиоксидативне активности. Фиксирање калуса вршено је FAA фиксативом (Formalin–Acetic acid–Alcohol). У овом фиксативу материјал је стајао 24 часа а затим је испиран у 70 % алкохолу до поступка прављења парафинских препарата. Поступак припремања парафинских блокова састојао се у дехидратацији и просветљавању узорака пре

инфилтрације парафином. Сечење калуца вршено је клизећим микротомом на пресеке дебљине 10 μm . Исечени пресеци су четкицом пребацивани у водено купатило Leica HI 1210 у коме је температура воде била за неколико степени нижа од тачке топљења парафина, а затим су пребацивани на предметна стакла. Износе се детаљи о примењеним реагенсима и њиховим концентрацијама да би се испољило диференцијално бојење и дијагностиковало присуство пектина, фенола и липида. Бојењу препарата у центру за бојење Leica ST 4040 претходио је процес депарафинирања и рехидратације. Процес припреме и прављење препарата за хистолошку анализу рађен је у хистолошкој лабораторији Пољопривредног Факултета у Београду, на Катерди за Агроботанику.

Следе описи припремања узорака за хемијску анализу полифенола и укупне антиоксидативне активности. За одређивање садржаја укупних полифенола у припремљеним узорцима коришћена је спектрофотометриска метода по Folin-Ciocalteu. Метода је заснована на оксидацији полифенолних једињења помоћу реагенса, раствора Folin-Ciocalteu, који садржи смешу фосфомолибденске и фосфоволфрамове киселине. Антиоксидативна активност узорака је анализирана помоћу DPPH теста.

Хроматографско раздвајање фенолних једињења вршено је системом за течну хроматографију високих перформанси (UHPLC). Од реагенса и стандарда коришћени су ацетонитрил и сирћетна киселина (MS чистоће) и метанол (HPLC чистоће) који су набављени од фирме Merck (Darmstadt, Немачка). За припрему стандардних раствора и узорака коришћена је ултра-чиста вода добијена кроз систем за пречишћавање воде (ThermoFisher TKA MicroPure, 0.055 $\mu\text{S/cm}$). Шприц филтери за додатно пречишћавање узорака (13 mm, мембрана од PTFE, 0,45 μm) набављени су од фирме Supelco (Belefont, Пенсилванија, Сједињене Америчке Државе) а стандарди полифенола од фирме Fluka AG (Bühler, Швајцарска). Комплетна обрада и припрема узорака рађена је у лабораторијама Катедре за аналитичку хемију Београдског Универзитета.

На крају поглавља кандидаткиња износи примењене програме за статистичке анализа података. Коришћен је статистички софтвер Statgraphics Plus Centaurion XVI. Примењена је анализа варијансе ANOVA за $p < 0.05$; за проверу хомогености група анализа вишеструких опсега кроз тест најмање значајне разлике (LSD тест) и Kruskal-Wallis-ов тест. Од непараметријских тестова за два узорка коришћен је Mann-Whitney U-тест. Пре статистичке анализе података који су изражени у процентима примењена је arcsin трансформација добијених података. За утврђивање корелације између две варијабле коришћен је Pearsonov коефицијент корелације. Визуелизација односа садржаја појединачних полифенола у хомео и хетеропластичним спојевима калуса урађена је помоћу анализе главних компонената (Principal Component Analysis – PCA).

У поглављу **4. РЕЗУЛТАТИ РАДА** (74–165 стр.) логичним редоследом, прегледно и систематично, кроз текст, табеле и графиконе, износе се резултати истраживања, уз низ фотографија.

Прво потпоглавље приказује резултате успостављања стерилне културе

на прелиминарним узорцима. Резултати за припрему пупољака таксона *Prunus avium* и *Prunus 'Colt'* и успостављање стерилних култура, фаворизовали су коришћење пупољака узетих са грана аклиматизованих у лабораторијским условима у трајању од 10 до 15 дана, у односу на пупољке са отвореног поља.

Добијени резултати за адултна и јувенилна стабала клонова *Prunus serrulata 'Amanogawa'* *'Kanzan'* и *'Kiku-shidare-zakura'*, првенствено указују на постојање јасних статистичких разлика у проценту пропадања узорака постављаних на исти хранљиви медијум и узиманих у истом временском периоду (период мировања вегетације – јануар, фебруар) на којима је примењена иста метода стерилизације биљног ткива. Калус добијен са јувенилних матичних стабала, повећава масу знатно брже и у условима коморе за раст (мрак, температура 23 ± 2 °C) у периоду од око 20 дана добија се маса фибрилног белог калуса код ког је субкултуру било могуће радити у просеку после 4 недеље.

Следи потпоглавље са резултатима индукције калуса из меристема бочних пупољака и вегетативних делова летораста у коме кандидаткиња наводи да три култивара јапанске трешње показују различите реакције на комбинације хормона у хранљивим подлогама. Према анализи резултата најпогодније подлоге за култивар *'Amanogawa'* су подлоге код којих је NAA главни извор ауксина у подлози (MS4, MS2, WP2 и SH2). Индукција калуса из пупољака култивара *'Kanzan'* је најинтензивнија и успоставља се у проценту од 79,12 % до 100 % на пет комбинација хормона на подлогама SH и MS. Култивар *'Kiku-shidare-zakura'* показује одређене разлике у реакцијама пупољака издвојених на различитим подлогама у односу на претходна два. Осим код подлоге SH, ауксин NAA који је код два претходна култивара имао значајан утицај на индуковање калуса, код *'Kiku-shidare-zakura'* је дао значајно слабије резултате. Око 40 % на медијуму MS2 и MS4 и око 6 % на WP подлози (на MS подлози код друга два култивара NAA изазива индукцију на око 80 % пупољака).

Индукција калуса код врста коришћених као подлоге за калемљење добијени су следећи резултати. За обичну трешњу и клон *'Colt'* индукција калуса на изабраним медијумима и одговарајућим односом хормона је веома успешна док за магриву проценат успешности опада уз појаву и потпуно неодговарајућих хранљивих подлога. Анализа варијансе и вишеструких опсега не показује статистичку значајност у разликама анализираних вредности што значи да све комбинације регулатора растења на три изабране подлоге дају задовољавајуће резултате. Код преостале две врсте *Prunus serrulata* и *Prunus serotina* индукција калуса показала је, такође, различит успех у зависности од медијума. Код јапанске трешње индукције је било на свим медијумима осим на SH4. Касна сремза, као и обична трешња показала је да јој одговара већи број различитих медијума за успешну индукцију калуса. Ово је једна од врста којој уједно одговара и 2,4-D ауксин додат у сва три основна медијума. Хранљиве подлоге на којима долази до индукције калуса у највећем проценту су MS2, MS4 и SH2 подлоге, што издваја ауксин NAA погоднијим за индукцију од 2,4-D и ИВА. Уједно, како се и коефицијент варијације за податке код MS2 креће око 30% (граница хомогености скупа) ова подлога би се могла сматрати најпогоднијом за индукцију калуса из пупољака за већи број испитиваних култивара и племки.

Поред процента индукције калуса из пупољака, добијени су и резултати средњег времена дана када је забележен почетак индукције калуса на пупољцима. Посматрано за целокупан оглед, први дан када је дошло до појаве калуса у основи пупољка забележен је код *Prunus* 'Colt' - 5. дан од постављања експланата на медијум. Битно је указати да је код свих таксона осим код пупољака врсте *Prunus mahaleb* индукција калуса започињала веома рано – до 8 дана. Поред тога, код врста *Prunus avium*, *Prunus serotina*, *Prunus serrulata* и култивара 'Kanzan' и 'Kiku-shidare-zakura' сви пупољци су индуковали калус до 16. дана и распоред средњих вредности према анализи указује да не постоје значајне разлике између њих. Исти параметар – средње време индукције калуса – посматран кроз хранљиве подлоге детаљније разврстава оне подлоге на којима није дошло до индукције, без обзира на врсту или култивар. Примећује се да и хранљиве подлоге које су се у укупном односу показале као веома повољне за индукцију калуса, за одређене култиваре и врсте нису дале позитиван резултат у данима почетка индукције калуса. По брзини индуковања калуса код испитиваних врста, најбоље су се показале подлоге MS4 и MS2 код којих и максимални број дана када је забележена индукција не прелази 14.

Као додатни параметри за издвајање најповољније подлоге за раст калуса анализирани су пораст масе и степен потамњивања, пошто промена боје индукованог калуса може указати на акумулацију фенола у ћелијама и старење калуса. Ако се на исти начин како су анализирани проценти индукције калуса за све подлоге и племке на свим хранљивим медијумима, упореде вредности за масу индукованог калуса, резултати указују на статистички значајно смањење дисперзије мерених вредности и могућност анализе варијансе помоћу LSD теста на нивоу значајности од 0,05.

Хранљива подлога која се уз добијене средње вредности масе калуса издвојила као најпогоднија је MS4 подлога. По статистичкој значајности издвојила се као значајно најповољнија у односу на 11 преосталих хранљивих медијума, а у односу на три: SH2, SH5 и MS2 не бележи значајну разлику на статистичком нивоу. Три од четири поменуте хранљиве подлоге (MS4, MS2, SH2) садрже NAA као главни извор ауксина који се показао да је од регулатора растења најпогоднији за већину изабраних врста. Подлогу SH5 (са 2 mg/L 2,4-D и 0,5 mg/L IBA) могуће је користити ограничено само за поједине врсте или култиваре. Анализом свих добијених резултата, за даља истраживања припремане су подлоге MS2, MS4 и SH2 и на њима су, зависно од комбинације врсте подлоге и племке, вршена спајања калуса у условима *in vitro*.

Резултати испитивања могућности успешног индуковања калуса коришћењем делова летораста матичних биљака које расту на отвореном пољу (из, *in vivo*, нестерилних услова) указали су да је за култиваре и врсте: *P. serrulata* 'Amanogawa', *Prunus serrulata* 'Kanzan', *Prunus serrulata* 'Kiku-shidare-zakura', *Prunus avium* и *Prunus* 'Colt' могуће користити адултно ткиво вегетативних делова пролећних, неодревљених летораста као извор експланата за културу. Код *Prunus serrulata* 'Amanogawa' сва четири типа експланта су на подлогама MS у врло високом проценту индуковале калус (од 83,3 % до 100 %). Статистички значајна разлика у избору експланта појављује се на подлози MS2 за основу

листа. Хранљиве подлоге на којима је забележена индукција на свим типовима експланата *Prunus serrulata* 'Kanzan' у највећем проценту су SH1 и SH5 (100 % индукованог калуса) што указује да је ауксин 2,4-D у концентracији 2 mg/L са или без 0,5 mg/L ИВА и 0,5 mg/L ВАР одговарајући однос фитохормона за пролиферацију калуса. Оба типа експланта који су садржали део лисне ламине дали су висок проценат индукције и висок степен покривености калусом за скоро све подлоге. За *Prunus serrulata* 'Kiku-shidare-zakura' добијени су најслабији резултати индукције калуса са вегетативних делова летораста. Само на три подлоге и два типа експланата, на дршци листа и делу избојка, индукција се креће око 70 %. Свих шест изабраних хранљивих подлога показале су се одговарајућим за индукцију калуса из вегетативних делова летораста обичне трешње. Средња вредност индукције код свих подлога и типова експланата прелази 75 % и статистички значајна разлика се јавља само на MS4 медијуму за избојак. За разлику од обичне трешње, калус култивара 'Colt' се није индуковао интензивно на свим изабраним подлогама. Добра реакција (индукција преко 70 %) показала се само на медијумима MS2, делимично успешна – само одређени тип експланта – на SH2 и WP2, а присуство ауксина 2,4-D у подлогама није имао јачи ефекат на индукцију од 40 %.

У делу поглавља у коме се анализира маса калуса из субкултуре индукованог калуса описују се резултати динамике раста и релативног раста калуса у субкултури и констатује се да најинтензивније расте у првих 20 дана калус *Prunus serotina*, чија се маса повећа за око 6 пута. Насупрот овоме забележен је спори раст калуса магриве: маса се за месец дана повећала у односу на почетну за само 1,4 пута, уз интензивно потамњивање. Обрачунавањем релативног раста калуса издвојене су најпогодније хранљиве подлоге, а за највећи број врста и култивара то је MS подлога у две комбинације односа регулатора растења: MS2 (2 mg/L NAA и 0,5 mg/L ВАР) и MS4 (2 mg/L NAA, 0,5 mg/L ИВА и 0,5 mg/L ВАР). Како је циљ био да се добије одређена количина зрнастог, фибрилног калуса са којим би се поставила негативна контрола компатибилности (инкомпатибилан спој крушке и трешње), изнети су детаљи индукције калуса из почетних сток биљчица клона крушке *Pyrus communis* 'Pyrodwarf' и резултати добијени у субкултурама индукованог калуса на медијумима MS2, MS4, WP1, WP4, SH1 и SH4. Индукција калуса која је извођена на медијумима MS2, MS4 и SH2, била је успешна: на делу стабљике, на дршци и на ламини листа.

У наставку кандидаткиња је приказала резултате јачине споја калуса племке и подлоге за сваки култивар јапанске трешње посебно, кроз окуларну и анатомску анализу споја. Поред анализе спојева извршена је и анализа промене боје самих калуса и појава линије на споју два калуса.

Код споја *Prunus serrulata* 'Amanogawa' са седам различитих подлога јавиле су се статистички значајне разлике у оцени параметара. Код свих спојева евидентна је разлика у јачини везе калуса у анализираном временском периоду од 14 дана. У односу на контролни компатибилан хомеопластични спој (*Prunus serrulata* 'Amanogawa' /*Prunus serrulata* 'Amanogawa') средња вредност за јачину споја *Prunus* 'Colt' / *Prunus serrulata* 'Amanogawa' не показује значајну разлику, као ни проценат успешних спојева *Prunus serrulata* / *Prunus serrulata* 'Amanogawa'.

Промене које су се јавиле до 21. дана појачале су спој ових комбинација у проценту успешних спојева те се ове комбинације могу сматрати најчвршћим. Период од 21 дан се показао повољан и за број спојева и степен јачине везаности код споја култивара 'Amanogawa' и домаће трешње. На неким од комбинација до промене боје калуса након спајања, долазило је постепено са појачањем интензитета обојења у периоду од 10. до 21. дана. Комбинација *Prunus avium* / *Prunus serrulata* 'Amanogawa' није показивала промене боја на самој линији споја, али су се промене дешавале на калусу култивара 'Amanogawa' благим тамњењем. Без обзира на промену боје, спојеви су остајали чврсти.

Анализом анатомских пресека сваке од наведених комбинација бојењем пектинских материја, фенола и масти наглашене су разлике и сличности које су се јавиле на ћелијском нивоу паренхима калуса различитих таксона. Пектински полисахариди се на споју калуса *Prunus avium/Prunus serrulata* 'Amanogawa' појављују локализовано у зидовима ћелија калуса оба таксона као и у екстрацелуларном простору, местимично на читавој површини пресека. Место на којем се запажају фенолна једињења унутар ћелија је калусно ткиво формирано на периферији. У оваквим случајевима јасно уочљива акумулирана фенолна једињења се код ове комбинације калуса јављају само на калусу подлоге. Препарати анализирани на флуоресцентном микроскопу не дају јака осветљења фенолних једињења што указује да ни на једном од препарата нема нагомилавања фенолних једињења унутар ћелија калуса. На анализираним спојевима нису локализоване ни масти које акумулирањем у ћелијама калусних спојева могу указати на инкомпатибилан спој. Спојеви магриве и култивара 'Amanogawa' према резултатима анатомских анализа показују најприближније резултате резултатима са негативном контролом (*Pyrus communis* 'Pyrodwarf'/*Prunus serrulata* 'Amanogawa'). У начину распореда пектинских полисахарида није уочена већа разлика у односу на претходно описане спојеве. Фенолна једињења се према резултатима бојења у великој мери нагомилавају у ћелијама подлоге. Њихова аутофлуоресценција је дала утисак јаче осветљености наспрам тамног видног поља. Осветљена површина код ћелија подлоге јасно је формирана у структури ћелијског зида док је код ћелија племке она уочљива и у ћелијама. Локализација масти бојењем судан црном бојом је интензивнија на периферним деловима обода групације ћелија и само је у мањем обиму унутар ћелијског зида. На деловима пресека масти су слободно раширене у интерцелуларном простору. Резултати добијени спајањем калуса култивара 'Amanogawa' са калусом врсте *Prunus serotina* (једна од две изабране врсте за негативну контролу споја) нису у потпуности дали очекивани одговор инкомпатибилног споја. На пресецима припреманим и бојеним за анализу пектина код друге негативне контроле - спој са клоном крушке, у ћелијама подлоге *Pyrus communis* 'Pyrodwarf' пектини су присутнији у већој количини у ћелијским зидовима и покривају неправилне површине између тесно збијених ћелија, док су у ћелијском соку, присутни у мањој мери. Фенолна једињења појављују се на пресеку споја у зонама које указују на нагомилавање у деловима који је у додиру са калусом друге врсте. Насупрот јасно издвојених делова који су бојењем указали на појаву фенолних једињења у ћелијама, флуоресценција ових једињења није довољно јаког интензитета и они се код већине спојева јасно уочавају у ћелијском зиду али не

довољно јасно у унутрашњости ћелија. Судан црна боја на пресецима је јасно локализована једињења масти што у оквиру споја калуса две врсте може указати на инкомпатибилност.

Добијени резултати успешност спајања *Prunus serrulata* 'Kanzan' са различитим врстама подлога 14 и 21 дан од постављања комбинација спојева, у односу на контролни, хомеопластични, показују да је остварен јак спој калуса, односно, висок степен компатибилности култивара 'Kanzan' са обичном и јапанском трешњом. Високи проценти срастања који се сигнификантно не разликују од горњих, добијени су и са подлогом *Prunus serotina* али само 14 дана, да би 21 проценат опао. Супротно, нешто спорије срастање било је код *Prunus* 'Colt' које се 21. дана не разликује значајно од најуспешнијих спојева. Срастање осталих комбинација у оба термина било је сигнификантно ниже, а са калусом *Pyrus communis* 'Pyrodwarf' срастања уопште није било. Промена боје калуса посматрана 21. дана најмање је уочљива на спојевима са обичном и јапанском трешњом, али и са касном сремзом код које је и срастање било само делимично. Очекивана инкомпатибилност код споја са патуљастим клоном крушке такође упућује да боја калуса не условљава јачину споја. Калуси обе врсте нису показали најмањи степен потамњивања, али спој није успостављен ни у једном делу контакта.

У локализацији пектина у ћелијским зидовима, бојени препарати указују да се на местима спајања калуса у комбинацији *Prunus avium/Prunus serrulata* 'Kanzan') пектински полисахариди јасно уочавају код оба таксона. Аутофлуоресценција фенолних једињења на препаратима није интензивна и ни на једном од препарата није забележено нагомилавање фенолних једињења унутар ћелија калуса, а бојењем препарата судан црним нису у ћелијама калусног споја, идентификоване масти. Анализе на ћелијском нивоу спојева *Prunus* 'Colt'/*Prunus serrulata* 'Kanzan' указују на манифестације инкомпатибилности, иако многа места споја показују добро остварен контакт. Појава нагомилавања фенола у ћелијама периферног појаса се јавља на ободном калусу, али и на појасу споја. Аутофлуоресценцијом на криотомским пресецима присуство фенола локализовано је уз ћелијске зидове. Масти у ћелијама подлоге или племке нису уочене у ћелијама које су у околини споја.

Спојеви магриве и култивара 'Kanzan' према резултатима анатомских анализа показују да је степен обраоњења калуса магриве утицао на успостављање мањег броја спојева са задовољавајућом јачином везе. Анализом присуства пектинских полисахарида у ћелијама обе врсте, показано је да се они у довољној мери задржавају и у ћелијским зидовима и у интерцелуларном простору. Код споја *Prunus mahaleb/Prunus serrulata* 'Kanzan' површине покривене пектиским садржајем су јасно уочљиве више у ћелијама подлоге него племке. Нагомилавање веће количине фенолних једињења није забележено ни методом бојења толуидин плавом ни флуоресценцијом, без обзира што се потамњивање калуса интензивирало временом. Бојењем судан црном установљена су спорадична места где има накупљања масти.

Спој *Prunus serrulata/Prunus serrulata* 'Kanzan' на анатомским пресецима указује да су калуси у овој комбинацији компатибилни. Сродност калуса врсте и

њеног култивара условила је да се феноли не сакупљају ни на периферним странама калуса који је експониран (на пресецима бојеним толуидин плавом, уједначена боја задебљалих зидова указује само на присуство пектина). Ни флуоресценција не указује на присуство фенола осим у ћелијским зидовима. Бојења масти су дала негативан одговор на овом споју што потврђује компатибилност подлоге и племке.

Калус култивара 'Kanzan' са калусом врсте *Prunus serotina* (једном од две изабране врсте за негативну контролу) формира спојеве у малим површинама, али су видни и детаљи на којима није успостављена добра веза између ткива. Пектински полисахариди локализовани су у ћелијским зидовима, у ћелијама и у међућелијском простору, присуство фенолних једињења у већем обиму није забележено као одговор два ткива на спој, а локализација масти дала је сличан одговор као и бојење фенола.

Код споја са клоном крушке на пресецима, за анализу пектина ни у једном делу међућелијског простора између ткива два калуса нису уочене формације пектинских полисахарида. Процес бојења фенола резултирао је издвајањем јасно обојених зона на површинама између споја две врсте калуса, а флуоресценција указује на њихову присутност у паренхимским ћелијама обе врсте. Потврде инкомпатибилности споја две врсте калуса има и у појави масти које су детектоване коришћењем судан црне боје.

Успешност спајања *Prunus serrulata* 'Kiku-shidare-zakura' са различитим врстама подлога оцењивана процентом успешних спојева и јачином споја 14. и 21. дана указује на најбоље срастање са калусом *Prunus* 'Colt' где не постоји значајна разлика у поређењу са комбинацијом калуса *Prunus serrulata* 'Kiku-shidare-zakura'/'*Prunus serrulata* 'Kiku-shidare-zakura'. Овој групи се придружује и комбинација са јапанском трешњом 21. дана. Код спојева са магривом, вредности оцењиваних параметара дали су најслабије резултате, који се статистички одвајају као бољи од негативне контроле (споја са крушком) али и као лошији од свих осталих. Према прегледу анатомских пресека калуса обичне трешње и култивара 'Kiku-shidare-zakura' бојених рутенијум ред бојом за локализацију пектина, и анцијан плавом са сафранином уочава се да су они присутни у ћелији, зиду и интрацелулару. У односу на спојеве култивара 'Amanogawa' и 'Kanzan' са трешњом скупљање фенола у ћелијама споја је интензивније. Поред приказаних манифестација на споју калуса ова два таксона, неки спојеви других комбинација су се формирали и без присуства фенола у ћелијама. Аутофлуоресценцијом која је јачег интензитета, осветљене су површине уз ћелијски зид. Ни на једном пресеку није примећена јача рефлексивност светлости у линији споја калуса и места нагомилавања. Ни анализама препарата бојених суданском црном за издвајање масти нису добијени позитивни резултати.

Комбинацијом *Prunus serrulata* 'Kiku-shidare-zakura' са култиваром 'Colt' добијени су слични резултати као код споја са обичном трешњом. Резултати свих врста диференцијалних бојења указују да се ова комбинација може сврстати у високом степену као компатибилна за култивар 'Kiku-shidare-zakura'.

Висок степен подударности калуса и њихових спојева показују и пресеци

прављени за комбинацију *Prunus serrulata/ Prunus serrulata* 'Kiku-shidare-zakura'), што је био и очекиван резултат.

На споју са подлогом *Prunus serotina* добијени су интересантни резултати у анатомским бојењима. Без обзира на чињеницу да је спој коришћен као негативна контрола, у бојењу пактинских полисахарида, ниједан други спој ни у једној другој комбинацији било које подлоге и племке није имао тако обимну количину ексудованих пектина. Феноли и масти нису забележени у већој мери, а аутофлуоресценција фенола приметна је само уз хелијске зидове што говори у прилог потенцијалној компатибилности ова два таксона. Друга негативна контрола са *Pyrus communis* 'Pyrodwarf' показује сличне манифестације какве су забележене и код два претходна култивара.

Према резултатима добијеним после *in vitro* спајања калуса *Prunus serrulata* као посредника, са калусом подлоге обичне трешње, култивара 'Colt' и касне сремзе, компатибилан спој калуса је остварен са калусима трешања и делимично са касном сремзом. Драстични степен потамњивања калуса и формирање јасно видљиве линије између спојева није забележено ни у једној комбинацији у периоду од 21 дана. На хистолошким пресецима спојева и диференцијалним бојењима нису запажене специфичности које се нису јавиле у досадашњим анализама спојева.

Анализа садржаја укупних фенола и антиоксидативне активности је још један сегмент истраживања којим је требало да се докаже прелиминарна успешност или неуспешност спојева при калемљењу потпуно независно од претходних метода. Како повећање садржаја фенола у ткивима упућује на одговор биљке на стрес, анализом промене садржаја укупних фенола у хетеропластичним спојевима издвојене су комбинације код којих је уочено повећање, смањење или стање без промене у односу на контролне хомеопластичне спојеве.

Из екстракта добијеног из хомеопластичних и хетеропластичних спојева калуса анализирана је антиоксидативна активност и тестирана способност уклањања DPPH радикала. Разлике које су се издвојиле као статистички значајне у смеру повећања антиоксидативности у односу на оба контролна споја су забележене на комбинацијама *Prunus avium* са *Prunus serrulata*, *Prunus serrulata* 'Kanzan' и *Prunus serrulata* 'Kiku-shidare-zakura', свим комбинацијама са *P. mahaleb* и *P. serotina* као и комбинацијама клонова *Prunus serrulata* 'Amanogawa' и 'Kanzan' са калусом крушке. Спојеви код којих није дошло ни до значајног смањења ни повећања антиоксидативне активности су спојеви *Prunus avium*/'Kanzan', три култивара јапанске трешње са *Prunus serrulata*/'Kanzan', као и *Prunus serrulata/ P. serotina*, док је код осталих разлика забележена у односу на један од хомеопластичних спојева који су чинили контролу за дати спој. То су све комбинације на *P. 'Colt'*, *P. mahaleb/Prunus serrulata* и 'Kiku-shidare-zakura' са крушком. Највишу антиоксидативну активност показали су екстракти спојева са магривом, а најмању са *P. serrulata*. Антиоксидативна активност је опадала по следећем редоследу спојева са: *P. mahaleb* > *P. 'Colt'* > *Pyrus 'Pyrodwarf'* > *P. serotina* > *P. avium* > *P. serrulata*.

У циљу утврђивања односа између садржаја укупних фенола и антиоксидативне способности екстракта спојева, спроведена је корелациона анализа ових параметара. Анализа скупних резултата показује да садржај укупних фенола корелира са резултатима DPPH у средње јаким позитивним корелацијама ($R = 0,742$), док је корелација међу спојевима одређених подлога са култиварима 'Amanogawa', 'Kanzan' и 'Kiku-shidare-zakura' различитог степена. Висок степен позитивне корелације остварен је између садржаја укупних фенола и редукционе способности спојева поменутих култивара са 'Colt' ($R = 0,961$), са јапанском трешњом ($R = 0,914$) и *P. avium* ($R = 0,817$). Средње јаке корелације са негативним предзнаком остварене су на спојевима са магривом ($R = -0,697$). Код анализе корелационог односа ова два параметра са сремзом и клоном крушке, ниво значајности који прелази вредност $p > 0,05$ указује на непостојање статистички значајног односа повезаности између вредности ова два параметра ($p = 0,09$ и $p = 0,706$).

За свих 9 култивара и врста, поред вредности које су приказане (које су мерене 21. дана), одређен је садржај укупних фенола на екстрактима калуса хомеоспојева и после 45. дана, чиме је утврђен степен пораста количине фенола зависно од времена.

Приказ резултата анализе садржаја појединачних полифенола у спојевима различитих комбинација калуса кандидаткиња је приказала у посебном делу. У екстрактима калуса хомео и хетеропластичних спојева добијених помоћу киселог ацетона идентификовано је и квантификовано 21 фенолно једињење. Детектовани су представници пет класа фенолних једињења: три класе флавоноида (флавоноли, флаволи и флаванони), један дихидрохалкон и шест фенолних киселина (све из групе хидроксициметних киселина).

Следи анализа главних компонената (PCA) у циљу одређивања односа између 33 узорка хомео и хетеропластичних калусних спојева, са циљем одвајања најпогоднијих спојева за испитана три култивара 'Amanogawa', 'Kanzan' 'Kiku-shidare-zakura'. У циљу издвајања потенцијално добрих спојева култивара јапанских трешања у коришћених подлога за калемљење, урађен је дендрограм кластер анализе, на основу садржаја појединачних полифенолних једињења код свих анализираних спојева. Преко анализе главних компонената и кластер анализе дошло се до варијанти спојева које су одговарајуће за сваки од испитиваних култивара. За *Prunus serrulata* 'Amanogawa' спојеви који су се показали као бољи су спојеви са *Prunus* 'Colt', *Prunus serrulata* и *Prunus serotina*. За уобичајено коришћену подлогу – обичну трешњу, резултати указују да није одговарајућа подлога. Оно што се из резултата показало као могуће решење је коришћење јапанске трешње као посредника у калемљењу између обичне трешње и овог култивара. За култивар 'Kanzan', обична трешња је одговарајућа подлога. Следе спојеви са јапанском трешњом и касном сремзом. Добијени резултати у анализи главних компонената спој са култиваром *Prunus* 'Colt' одвајају као неодговарајући, а таксон као подлогу коју не треба користити. Неодговарајућа је

и веза и са потенцијалним посредником – јапанском трешњом. *Prunus serrulata* 'Kiku-shidare-zakura' најбољу везу остварује са јапанском трешњом и обичном трешњом и као и код претходног култивара, делом са касном сремзом. За све култиваре, према анализама, спојеви са магривом се нису показали као потенцијално добри.

У поглављу **5. ДИСКУСИЈА** (166-202 стр.) кандидат мр Драгана Скочајић резултате обављених истраживања логички доводи у везу са, до сада публикованим, резултатима сличних истраживања и тиме потврђује или оповргава досадашње резултате истраживања сличних по примењеној методологији и/или по предмету истраживања.

У поглављу **6. ЗАКЉУЧЦИ** (203-209 стр.) систематизовано, кроз тезе, износе се закључци до којих се дошло на основу спроведених истраживања. Комисија констатује да су закључци, прецизно формулисани, прегледно презентовани, и да су утемељени на резултатима до којих је кандидаткиња дошла самостално, па представљају оригиналан допринос науци и струци.

Поглавље **7. ЛИТЕРАТУРА** (210-236 стр.) садржи актуелне и релевантне референце, усмерене на проблематику дисертације. Кандидаткиња наводи 280 референци, које је користила приликом писања докторске дисертације. Коришћена литература је правилно одабрана како за теоријске основе докторске дисертације, тако и за поређење са резултатима истраживања. Преглед литературе указује да кандидат поседује шире познавање области и проблематике истраживања.

У поглављу **8. ПРИЛОЗИ** (237-246 стр.), дате су прикази и слике, структурирани у складу са материјом изложеном у претходним поглављима.

Комисија констатује да садржај наведених поглавља има логичан след, који чини једну целину, која је писана јасним језиком и терминологијом струке.

VI ЗАКЉУЧЦИ ОДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

Лабораторијским истраживањима компатибилности калусних ткива украсних цветајућих трешања *Sato-zakura* групе и наших домаћих подлога техником фузије калуса у *in vitro* условима, дошло се до резултата који омогућују формулацију закључака о (1) индукцији калусних култура и њиховом успешном одржавању; (2) компатибилности/инкопатибилности између култивара јапанских цветајућих трешања из групе *Sato-zakura* и наших домаћих подлога на основу хистохемијских анализа и визуелном оценом и (3) практичној примени методе као прелиминарне у утврђивању потенцијалне подударности ткива две компоненте калемљења.

У првом делу, везаног за индукцију калусних култура и њихово успешно одржавање могу се изнети следећи закључци:

- Матична стабла таксона са којих се узимају експланте за индукцију калуса за утврђивање компатибилности, треба да буду приближно исте

физиолошке старости (најбоље је да су у јувенилној доби - до 6 година старости или да је извршена рејувенилизација ткива, која се остварује резивањем и калемљењем). Овај захтев не представља ограничење јер и компоненте калемљења у моменту спајања по правилу нису старије, па донети закључци могу да се примене и за спајања у расаднику.

- Одрвењени летораста са којих се узимају пупољци за културу, треба да су у периоду дубоког мировања када се урањају основом у воду у заштићеном делу лабораторије са просечном температуром око 18 °С. Током наредног периода (између 10 и 15 дана) када дође до размицања спољних љуспи пупољака, одсецају се сегменти летораста са једним бочним пупољком и уводе у процедуру стерилизације.

- За успостављање стерилне *in vitro* културе калуса, из меристемима бочних пупољака са успехом је примењен третман површинске стерилизације испирањем пупољка у проточној води 1,5 до 2 часа, 70 % етанолу у трајању од 1' 20'' и 10 % (v/v) раствору NaOCl у трајању од 12 минута.

- Вегетативни делови летораста, сакупљени са матичњака 4 недеље по цветању су се показали одговарајућим извором експланата за убрзану индукцију калуса у *in vitro* условима када су стерилисани нижом концентрацијом реагенса: 2 % (v/v) NaClO (0,4 % w/v NaClO) али дужом, двочасовном стерилизацијом.

- За сваки генотип показало се да је неопходно присуство хормона, али и однос ауксина и цитокинина у подлози. За већину генотипова, одговарајући однос ауксин:citoкинин је био 4:1. Од три коришћена ауксина (NAA, 2,4-D и ИВА) најпогоднији за индукцију и раст калуса у субкултури је NAA у концентрацији 2 mg/L. За неке генотипове могуће је користити 2,4-D у истој концентрацији као замену (*P. avium*, 'Colt', *P. serotina* и 'Kanzan'), док се у поменутих концентрацијама и као једини извор ауксина, ИВА показао неодговарајућим за индукцију калуса код истраживаних таксона. ИВА је дао добар одговор као додатна количина ауксина од 0,5 mg/L уз NAA. Одговарајућа концентрација цитокинина (BAP) је била 0,5 mg/L за све варијанте ауксина.

- За највећи број таксона, од три коришћене хранљиве подлоге (MS, SH и WP), најпогоднија у процесу индукције калуса се показала MS хранљива подлога са 30 g L⁻¹ сахарозе, 6,5 g L⁻¹ агара, 100 mg/L иносола, рН вредности од 5,7 – 5,8. За обичну трешњу и култиваре 'Kanzan' и 'Colt' у процесу индукције калуса из пупољака или вегетативних делова летораста, одговарајућом се може сматрати и SH подлога, а за *Prunus mahaleb* WP медијум се издвојио као најпогоднија за процес индукције и раста калуса.

- Од већег броја медијума и њихових формулација најпогоднијим за субкултуру су се показали MS2 (NAA 2 mg/L, BAP 0,5 mg/L) и MS4 (NAA 2 mg/L, ИВА 0,5 mg/L и BAP 0,5 mg/L) за највећи број таксона: *P. avium*, *Prunus* 'Colt', *P. serrulata* и *P. serrulata* 'Kanzan'; само на MS2 – *P. serotina* и *P. serrulata* 'Amanogawa' и на MS4 – *P. mahaleb* и *P. serrulata* 'Kiku-shidare-zakura'.

- Време између две субкултуре зависло је од брзине старења клауса и

евентуалне промене боје (потамњивања). У најкраћем временском периоду (20 дана) вршена је субкултура калуса *P. serotina* и *Prunus* 'Colt', на 20 до 30 дана премештана је калусна култура *P. serrulata* 'Kiku-shidare-zakura', *P. avium* и *P. mahaleb*, док се за *P. serrulata*, *P. serrulata* 'Kanzan' и *P. serrulata* 'Amanogawa' субкултура могла да обаља у интервалима од два месеца радити и након 2 месеца без видних промена боје и структуре калуса.

- Услови мрака, температура од 23 ± 2 °C и избор одговарајућег хранљивог медијума за већи број таксона могу се сматрати одговарајућим за културу калуса, што је потврђено коефицијентом пораста масе калуса у субкултури, као и дугим одржавањем калуса у култури (неких таксона и дуже од 2 године).

- Калус магриве карактерише јако потамњивање, од момента индуковања калуса из експланта и без значајније промене у интензитету боје и после субкултуре. Калус култивара 'Kiku-shidare-zakura' временом поприма црвену боју која се интензивира у периоду до 20. дана, али и слаби по премештању на свежу хранљиву подлогу што се није показало правилом и за калус магриве.

- Од свих таксона, калус магриве (*P. mahaleb*) на изабраним медијумима није дао очекиван и задовољавајући одговор, ни кроз калогенезу ни кроз раст калуса по индукцији.

Применом методе фузије калуса у *in vitro* условима, визуелном оценом и хистохемијским анализама спојева калуса два таксона, добијени резултати су указали на постојање компатибилности између култивара јапанских цветајућих трешања из групе *Sato-zakura* и наших домаћих подлога, као и назнаке да одређене подлоге не треба користити приликом калемљења ове групе украсних дрвенастих врста:

- Метод визуелне оцене јачине споја калуса две компоненте калемљења (кроз проценат успешно спојених делова калуса и степена јачине самог споја) може се сматрати применљивом методом за овај вид анализе подударности две различите компоненте калемљења, не само код испитиваних таксона него и шире. Добијањем довољне количине калуса након индукције, метода спајања калуса за визуелну оцену споја је знатно једноставнија за извођење од методе формирања споја за анатомску анализу.

- Спојеви калусних делова који су визуелном анализом сврстани у јаке (*P. serrulata/P. serrulata* 'Amanogawa', *P. serrulata/P. serrulata* 'Kanzan', *P. serrulata/P. serrulata* 'Kiku-shidare-zakura', *P. avium/P. serrulata* 'Kanzan') добили су потврду компатибилности и у хистохемијским анализама.

- Насупрот томе, спојеви код којих хистохемијским анализама није поуздано утврђена инкомпатибилност (спојеви сва три култивара јапанских украсних трешања са култиваром *Pyrus communis* 'Pyrodwarf'), су у овој анализи показали видне знаке неподударности – лаким одвајањем ткива калуса и после 20 дана од спајања.

- За врсте спојева које су у визуелним оценама указали на компатибилност, али су било кроз анатомске или хемијске анализе доведени у сумњу (спојеви култивара јапанских трешања са подлогом *Prunus* 'Colt') предлаже се успостављање пољских огледа путем којих би се потврдили или одбацили резултати добијени техником спајања калуса *in vitro*.
- После коришћења различитих метода анатомских анализа пресека калусних спојева може се донети закључак да је за потврду неких резултата добијених применом ове методе, неопходна и препоручљива додатна хемијска и визуелна анализа.
- Прецизнији пресци, самим тим и одговори, су добијени на сталним него на привременим препаратима. Мада једноставност извођења технике припреме калуса и прављење препарата фаворизују криомикротомску методу добијања привремених препарата, немогућност добијања танких пресека и успешно избегавање растурања калуса током фиксирања ледом, нису у потпуности превазиђени у овом раду.
- Анатомске анализе су, међутим, указале на значајне манифестације на ткиву спојева калуса, као што је разливање веће количине пектинских полисахарида код потенцијално компатибилних спојева, на супрот мањој локализацији ових једињења код инкомпатибилних, а бојење ретунијум црвеном бојом се показало врло ефикасним у локализацији пектина у паренхимским ћелијама калуса.
- Бојењем толуидин и алцијан плавом и сафранином доста прецизно су локализовани феноли, као и сенесценција ткива, што може да укаже на ране знаке неподударности калуса две врсте. Поменуте појаве јасно су забележене код спојева култивара *P. serrulata* са магривом и патуљастом крушком ('Pyrodwarf') и местимично на са култиваром 'Colt'; обичном трешњом (*P. avium/P. serrulata* 'Amanogawa' и *P. avium/P. serrulata* 'Kiku-shidare-zakura') и са сремзом.
- Хемијским анализама спојева, употребљена је слика о односу испитиваних подударних и неподударних таксона. Потврђена је компатибилност из претходне две анализе као и постојање одређеног броја неподударних спојева.
- Детекција неких полифенола (р - кумаринске киселине, кемферола, кверцетина, ферулинске киселине, нарингенина и баикалеина) који су у литератури означени као показатељи инкомпатибилности калемљења, потврдила је на још један, посредан начин потенцијални инкомпатибилан спој.
- Код магриве је и кроз хемијске анализе укупних и појединачних полифенола потврђено њихово нагомилавање што је јасно манифестовано потамњивањем ткива.
- На спојевима са обичном трешњом, (која се наводи као најподеснија подлога за калемљење јапанских украсних трешања), хемијске анализе потврдиле су постојање одређених сметњи у споју ове врсте са култиварима 'Amanogawa' и 'Kiku-shidare-zakura'. Односно, према добијеним резултатима у овом раду може се донети закључак да ова подлога није најбољи

избор за ове култиваре. Према свим анализама боља подлога је свакако *P. serrulata*, а треба пробати и комбинације ‘Amanogawa’/‘Colt’ и ‘Kiku-shidare-zakura’/‘Colt’.

На крају, кандидаткиња доноси генерални закључак да се примењена метода фузије калуса у *in vitro* условима може сматрати ефикасним начином добијања релативно брзог и ефективног одговора о потенцијалној подударности ткива две компоненте калемљења и да је метода применљива и за друге таксоне. Применом ове технике могли би се, макар у одређеном обиму, избећи скупи, пољски огледи у којима се одговор о подударности калемљења може чекати дужи низ година или насумични избор подлога у пракси који може да доведе до губитака у комерцијалној производњи.

У будућим истраживањима која би обухватила проблематику компатибилности поменутих таксона, добијени резултати у овом раду потврдили би се или оповргли. Три добијена резултата би требало проверити кроз пољске огледе коришћењем култивара ‘Colt’ као подлоге код калемљења *P. serrulata* ‘Amanogawa’ (као замене за обичну трешњу). Потврдити потенцијалну компатибилност јапанских украсних трешања и сремзе. Користити основни таксон *Prunus serrulata* као посредник између наших подлога и јапанских украсних трешања, како би се превазишла неподударност између подлоге и племке (конкретно код споја *P. avium*/*P. serrulata* ‘Kiku-shidare-zakura’), што је јефтинија алтернатива набавци семена и производњи генеративних подлога *Prunus serrulata* и спречавање евентуалне фенотипске неуједначености калемљених култивара због хетерозиготности подлога.

Закључци и резултати истраживања су прецизно формулисани и прегледно презентовани. Они су утемељени на резултатима до којих је кандидаткиња дошла самостално током спроведених истраживања, па су утолико оригинални и доприносе науци и струци.

VII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА

Резултати, до којих је кандидаткиња дошла у току својих истраживања, презентовани су на 91 страни куцаног текста, логичним редоследом, прегледно и систематично. За објашњење, тумачење и анализу резултата кандидатиња је користила табеле, графиконе, карте и фотографије, на основу којих су дати закључци који представљају оригинални научни допринос овог рада.

Кроз 27 табела и 38 графикана приказана је статистичка анализа добијених резултата индукције калуса у условима *in vitro* као и резултати хемијских анализа укупних и појединачних полифенолних једињења. Великим бројем фотографија – 79, документоване су комплетне анатомске анализе свих примењених хистолошких анализа спојева калуса (44) и резултати визуелне оцене јачине споја калуса подлоге и племке (19) као и остали детаљи везани за експерименте (16).

Начин приказивања добијених резултата се може окарактеристи као савремен, прегледан и илустративан а резултати правилно протумачени и адекватно упоређени са резултатима досадашњих истраживања других аутора у поглављу 5. ДИСКУСИЈА на 36 страна.

VIII КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

На основу напред изнетог, Комисија констатује да су истраживања методски и обимом у потпуности обављена у складу са пријављеном темом, за коју је Веће Научних области Биотехничких наука, Универзитета у Београду дало сагласност (Одлука број 02 бр. 61206-2638/2-15, од 17.06.2015. године). Недостаци докторске дисертације, који су могли утицати на резултате истраживања, нису уочени.

Дисертација садржи све битне елементе: насловну страну на српском и енглеском језику, информације о ментору и члановима комисије, изјаву захвалности, резиме на српском и енглеском језику, садржај, попис скраћеница, попис карти, слика, шема, табела и графикона, садржај, текст рада по поглављима, литературу, биографију и библиографију аутора, изјаву о ауторству, изјаву о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада и изјаву о коришћењу.

На основу детаљне анализе свих поглавља израђене докторске дисертације кандидаткиње мр Драгане Скочајић, Комисија закључује да докторска дисертација представља оригиналан и самосталан научно-истраживачки рад и да резултати, поред научне вредности, имају и практичну применљивост.

Истраживања спроведена у оквиру ове докторске дисертације представљају значајан допринос унапређењу производње украсних култивара јапанске трешње кроз примену утврђивања прелиминарне компатибилности са изабраним подлогама. Она се, међутим, не ограничавају само на ову групу, јер се примењена методологија може широко применити за све украсне таксоне (и не само украсне) који се размножавају хетеровегетативно. Спроведена истраживања потврђују да се фузијом калуса подлоге и племке у *in vitro* условима испољавају манифестације међусобног срастања или одбацивања, а тиме и применљивости појединих подлога у пракси. Кандидаткиња примењује више независних метода одређивања компатибилности, па поред визуелне оцене чврстине споја, утврђује квалитет срастања прављењем хистолошких препарата уз диференцијално бојење и детерминацију супстанци чија појава се сматра знацима одбацивања ткива. Присуство или одсуство истих тих супстанци и њихову квантификацију потврђује хемијским анализама.

Дефинисана тема, постављени циљеви, одабрана методологија и добијени резултати, уз јасне препоруке за даљи рад, представљају пионирски подухват у ширењу примене културе ткива не само као методе размножавања већ и као поузданог начина за рано утврђивање компатибилности компоненти калемљења, у ово случају *Sato-zakura* трешања и домаћих подлога спајањем калуса у

условима *in vitro*.

Имајући у виду да се, као услов за одбрану докторске дисертације, поставља објављен један рад у часопису међународног значаја, Комисија констатује да је кандидаткиња овај услов испунила. Кандидаткиња је коаутор пет радова у часописима међународног значаја, категорије M21 и M23.

M21

Đunisijević Bojović, D., Đukić, M., Maksimović, V., **Skočajić, D.**, Suručić, Lj. (2012): The effects of iron deficiency on lead accumulation in *Ailanthus altissima* (Mill.) Swing Le seedlings. *Journal of Environmental Quality*.41:1517-1524.

M23

Djukic, M., Djunisijevic Bojovic, D., Grbic M., **Skocajic, D.**, Obratov-Petkovic, D., Bjedov I. (2013): Effect of Cd and Pb on *Ailanthus altissima* and *Acer negundo* seed germination and early seedling growth. *Fresenius Environmental Bulletin* in Vol. 22; No. 2: 524-530. IDS Number: 182DK ISSN: 1018-4619

Obratov-Petković, D., Bjedov, I., Jurišić, B., Đukić, M., Đunisijević-Bojović, D., **Skočajić D.**, Grbić M. (2013): Influence of some environmental factors on the distribution of invasive species *Aster lanceolatus* Willd. in various Serbian habitats. *Fresenius Environmental Bulletin* in Vol. 22; No. 6: 1677-1688 IDS Number: 171BW ISSN: 1018-4619 M23: 3

Djukić, M., Djunisijević-Bojović, D., Pavlović, P., Mitrović, M., Grbić, M., **Skočajić, D.**, Lukić S. (2014): Influence of Fe Nutrition on Photosynthesis in Pb Treated *Ailanthus altissima* (Mill.) Swing Le Seedlings, *Pol. J. Environ. Stud.* Vol. 23, No. 5 (2014), 1565-1571

Marija Nešić, Dragica Obratov-Petković, **Dragana Skočajić**, Ivana Bjedov, Matilda Đukić, Danijela Đunisijević-Bojović (2016): Allelopathic potential of the invasive species *Aster lanceolatus* Willd. *Periodicum Biologorum* VOL. 118, No 1, 1-7, DOI: 10.18054/pb.2016.118.1.2816.

IX ПРЕДЛОГ

На основу начињеног извештаја и изнете оцене докторске дисертације, Комисија сматра да је докторска дисертација магистра Драгане Скочајић, методски успешно обрађена и да третира актуелну материју на нивоу неопходном за карактер рада.

Полазећи од свих наведених чињеница, Комисија предлаже Наставно-научном већу Универзитета у Београду – Шумарског факултета да докторску дисертацију кандидаткиње мр Драгане Скочајић, под насловом „*Рано утерђивање компатибилности Sato-zakura трешања и домаћих подлога*“

спајањем калуса у условима in vitro ” прихвати за јавну одбрану, ради стицања научног степена доктора биотехничких наука.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

др Михаило Грбић, редовни професор
Универзитета у Београду - Шумарског факултета

др Матилда Ђукић, редовни професор
Универзитета у Београду - Шумарског факултета

др Ђурђина Ружић, научни саветник,
Институт за воћарство у Чачку

др Милица Фотирић Акшић, ванредни професор
Универзитета у Београду - Пољопривредног факултета

др Драгана Ранчић, доцент
Универзитета у Београду - Пољопривредног факултета

НАПОМЕНА: Члан комисије који не жели да потпише извештај јер се не слаже са мишљењем већине чланова комисије, дужан је да унесе у извештај бразложење односно разлоге бог којих не жели да потпише извештај.