

Биолошки факултет
Број захтева:15/668-1
Датум:09.10.2014.

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ВЕЋУ НАУЧНИХ ОБЛАСТИ ПРИРОДНИХ НАУКА

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на реферат о урађеној докторској дисертацији

Молимо да, сходно члану 46. ст. 5. тач. 4. Статута Универзитета у Београду («Гласник Универзитета», број 131/06), дате сагласност на реферат о урађеној докторској дисертацији кандидата: **Мр Милице Д. Ћаловић, дипломираног биолога.**

КАНДИДАТ: **Мр Милица Д. Ћаловић**

пријавио је докторску дисертацију под називом:

„Генетичко оплемењивање племки мандарине (*Citrus reticulata*) коришћењем метода соматске и сексуалне хибридизације“.

Из научне области: Биолошке науке.

Универзитет је дана 03.07.2014. године, својим актом под бр. 02 Број: 61206-3055/4-14 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације кандидата која је гласила:

„Оплемењивање мандарина (*Citrus reticulata* Blanco) методама соматске и сексуалне хибридизације у циљу добијања нових безсеменних култивара“.

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације кандидата: **Мр Милице Д. Ћаловић**, образована је на X редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду-Биолошког факултета, одржаној 12.09.2014. год, одлуком Факултета под бр. 15/590-12.09.2014. год. у саставу:

Име и презиме члана Комисије	Звање	Научна област
1) Др Слађана Јевремовић	Виши научни сарадник Универзитет у Београду- Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“	Биотехничке науке, Биотехнологија
2) Др Златко Гиба	Ванредни професор, Универзитет у Београду- Биолошки факултет	Физиологија и молекуларна биологија биљака
3) Др Ангелина Суботић	Научни саветник, Универзитет у Београду- Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“	Биотехничке науке, Биотехнологија

Наставно-научно веће Биолошког факултета Универзитета у Београду прихватило је извештај Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације кандидата: Мр Милице Д. Таловић, на I редовној седници одржаној 09. октобра 2014. године.

Декан Биолошког факултета

Проф. др Јелена Кнежевић-Вукчевић

Прилог: 1. Извештај Комисије са предлогом.

2. Акт Наставно-научног већа факултета о усвајању извештаја



УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Студентски трг 16
11000 БЕОГРАД
Република СРБИЈА
Тел: +381 11 2186 635
Факс: +381 11 2638 500
Е-пошта: dekanat@bio.bg.ac.rs

15/668-09.10.2014.

На основу члана 128. Закона о високом образовању и члана 59. став 1. тачка 1. Статута Универзитета у Београду-Биолошког факултета, Наставно-научно веће Факултета, на редовној седници одржаној 09.10.2014. године, донело је

О Д Л У К У

Прихвата се Извештај Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације кандидата:

Мр Милице Д. Ћаловић, под називом:

„Опемењивање мандарина (*Citrus reticulata* Blanco) методама соматске и сексуалне хибридизације у циљу добијања нових безсеменних култивара“.

Универзитет је дана 03.07.2014. године својим актом под бр. 02 Број: 61206-3055/4-14 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације кандидата.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја:

1. Поглавље у књизи: Grosser JW, **Ћаловић М**, Louzada ES (2010) Ch. 10. Protoplast fusion technology - somatic hybridization and cybridization. Pp 175-198. IN: M.R. Davey and P. Anthony (Eds.) *Plant Cell Culture - Methods Express*. Wiley Interscience, John Wiley & Sons, Ltd **M14**

2. Ananthakrishnan G, **Ћаловић М**, Serrano P, Grosser JW (2006) Production of additional allotetraploid somatic hybrids combining mandarins with pre-selected pummelos as potential candidates to replace sour orange rootstock. In *Vitro Cell Dev. Biol. - Plant* 42:367-371. **Plant Science 103/147 (2006), IF 0.607** **M23**

2. Chen C, Grosser JW, **Ћаловић М**, Pasquali G, Gmitter Jr FG (2008) Verification of mandarin+pummelo somatic hybrids by EST-SSR marker analysis. *J. Amer. Soc. Hort. Sci* 133: 794-800. **Horticulture 9/23 (2008), IF 0.972** **M22**

3. Grosser JW, An HJ, **Ćalović M**, Lee D, Chen C, Vasconcellos M, Gmitter Jr FG (2010) Production of new allotetraploid and autotetraploid citrus breeding parents: Focus on zipperskin mandarins. Hort. Sci 45: 1160–1163. **Horticulture 12/23 (2008), IF 0.886** M22

Декан Биолошког факултета

Проф. др Јелена Кнежевић-Вукчевић

Доставити:

- Универзитету у Београду,
- докторанту,
- Стручној служби Факултета.

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На X редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 12.09.2014. године, прихваћен је извештај ментора др Слађане Јевремовић и др Златко Гиба о урађеној докторској дисертацији **Мр Милице Ђаловић**, под насловом:

“Опелемењивање мандарина (*Citrus reticulata* Blanco) методама соматске и сексуалне хибридизације у циљу добијања нових безсеменних култивара“

и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу:

1. **др Слађана Јевремовић**, виши научни сарадник, Универзитет у Београду-Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“-ментор
2. **др Златко Гиба**, ванредни професор, Универзитет у Београду-Биолошки факултет-ментор
3. **др Ангелина Суботић**, научни саветник, Универзитет у Београду, Институт за биолошка истраживања “Синиша Станковић”-члан

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

ОПШТИ ПОДАЦИ О ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Докторска дисертација **Мр Милице Ђаловић** под насловом **“Опелемењивање мандарина (*Citrus reticulata* Blanco) методама соматске и сексуалне хибридизације у циљу добијања нових безсеменних култивара”**, урађена је у оквиру пројекта технолошког развоја Министарства просвете, науке и технолошког развоја бр. ТР31019, а истраживања су обављена у Истраживачком центру за проучавање цитруса (Citrus Research and Educational Center) Универзитета на Флориди, Сједињене Америчке Државе. Дисертација је написана на 180 страна и садржи 32 табеле, 5 графикана и 23 слике (149 фотографија). На почетку дисертације су дати сажети на српском (2 стране) и енглеском језику (2 стране). Основне тематске целине ове дисертације су: **Увод** (32 стране), **Циљ рада** (1 страна), **Материјал и методе** (43 стране), **Резултати** (55 страна), **Дискусија** (34 страна), **Закључци** (2 стране), **Литература** (13 страна; 219 библиографских јединица). На крају дисертације се налази **Биографија аутора** (1 страна), **Прилог 1** Изјава о ауторству), **Прилог 2** Изјава о истоветности штампане и електронске верзије, **Прилог 3** Изјава о коришћењу (5 страна)

АНАЛИЗА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Докторска дисертација **Мр Милице Ђаловић** је оригинално истраживање које припада области биотехнологије биљака. Тема дисертације је развој и примена савремених биотехнолошких и класичних метода укрштања и опелемењивања у циљу промене нивоа пloidности и добијања нових висококвалитетних безсеменних култивара мандарина.

Поглавље **УВОД** подељено је на 8 основних потпоглавља која се тематски могу поделити

у три дела: Прва три потпоглавља се баве таксономијом, пореклом и распрстрањеношћу рода *Citrus*, као и пореклом, класификацијом и морфо-физиолошке карактеристикама мандарина. У првом потпоглављу **УВОДА** **Мр Милица Ђаловић** је дала преглед основних таксономских подела које постоје у литератури, као и порекло рода *Citrus* коме припадају мандарине (фамилија *Rutaceae*, подфамилија *Aurantioideae*). У наставку овог потпоглавља, дат је преглед литературних података о месту настанка врста рода *Citrus*. У другом потпоглављу **УВОДНОГ** дела је приказано место и значај мандарина у укупној светској производњи цитрусног воћа, где је показано да $\frac{1}{4}$ те производње отпада на мандарине. У трећем потпоглављу је дат преглед морфо-физиолошких карактеристика по којима се мандарине издвајају у посебну групу цитрусног воћа. Наведено је да и унутар саме групе мандарина постоји велика генетичка различитост између врста и култивара, као последица њиховог настанка путем класичног укрштања (сексуалне хибридизације). Аутор наводи да је користила таксономски систем по RW Hodgson (1967) где су најзначајнији култивари мандарина сврстани у четири врсте: *C. deliciosa* (медитеранска мандарина), *C. nobilis* (кинг и куненбо), *C. unshiu* (сатсума) и *C. reticulata* (тзв. обичне мандарине, клементине, тангори, тангели и сви њихови хибриди).

Други тематски део **УВОДА** се односи на културу ткива цитруса са посебним освртом на културу и фузију протопласта цитруса као главну методу за оплемењивање последњих неколико деценија. У овом делу увода аутор посебно истиче значај природне појаве која се јавља у нуцелусу овула/семена цитруса (нуцеларна полиембрионија), у литератури позната као апомиксис, која је искоришћена за добијање калусних култура са великим ембриогеним потенцијалом који ће касније бити коришћени у експериментима соматске хибридизације. Даље су приказани досадашњи резултати на развијању саме методе соматске хибридизације у чијој основи је изолација и фузија протопласта који су пореклом од ембриогеног калуса једног родитеља и мезофила листа другог родитеља. Из приказаног прегледа литературе се види да је соматска хибридизација заузела значајно место у свим светским великим програмима за оплемењивање цитрусног воћа, јер је помоћу те методе могу фузионисати протопласти пореклом из два несродна и сексуално некомпатибилна култивара и то на различитим нивоима: интерспецијском, интергенеричком и/или интерфамилијарном нивоу. У овом делу **УВОДА** **Мр Милица Ђаловић** истиче значај истраживања Проф. др. J.W. Grosser и сарадника из Лабораторије за ћелијску генетику, (*Citrus Research and Educational Center*) Универзитета на Флориди, Сједињене Америчке Државе где је и рађен експериментални део ове докторске дисертације, који се више од 30 година бави проблемом интерспецијске/интергенеричке соматске хибридизације код цитрусних воћних врста. Аутор посебно истиче велики допринос ове истраживачке групе на доношењу протокола за рутинску изолацију протопласта (дефинисање оптималних ензимских раствора и хранљивих подлога) из калусног ткива пореклом из нуцелуса као и мезофила листова.

У трећем најобимнијем тематском делу **УВОДА** **Мр Милица Ђаловић** указује на важност постојања безсемених култивара цитруса, даје преглед досадашњих резултата истраживања на примени различитих метода оплемењивања у циљу промене нивоа плоидности и добијања триплоидних безсемених култивара. На почетку овог дела аутор наводи шта је данас примарни циљ генетичког оплемењивања мандарина, али и других цитрусних воћних врста. Наиме, услед велике потражње потрошача за плодовима воћа без семена, узгајивачи све чешће у потпуности замењују у воћњацима семене култиваре са култиварима који имају плодове без семена. Због свега тога, постоји сталан притисак и потражња за новим култиварима. **Мр Милица Ђаловић** наводи да су, до сада, у процесу оплемењивања цитруса у свету паралелно се развила три главна правца истраживања којима се постиже безсеменост плодова, а то су: 1. Стварање диплоидних култивара чија

је главна карактеристика немогућност самоопрашивања; 2. Индукција мутагенезе код семених култивара и стварање безсемених мутаната; 3. Измена нивоа пloidности биљака (успостављање полиплоидности) у циљу стварања безсемених триплоидних култивара који готово увек поседују женску (♀) / мушку (♂) стерилност. У посебном делу **УВОДА**, који је подељен у пет одељака даје се на детаљан и на систематичан начин приказ развијања неколико истраживачких праваца у делу програма за оплемењивање цитруса који се бави стварањем триплоидних безсемених култивара. Основни правци су: 1. спонтана полиплоидност у коју спадају (а) појава спонтаних триплоида у $(2x \times 2x)$ сексуалном укрштању као последица стварања нередуктованих $(2n)$ гамета услед реституције нуклеуса током мејозе мегаспоре; (б) појава спонтаних тетраплоида као последица дупликације хромозома без ћелијске деобе у нуселарном ткиву; 2. примена метода за добијање хаплоида (андрогенеза и индукована гиногенеза) као и 3. соматска хибридизација праћена са интерплоидном сексуалном хибридизацијом тј. класичним укрштањем. На основу досадашњих резултата различитих истраживачких група **Мр Милица Ђаловић** констатује да су економски и временски најисплатљивије методе за добијања безсемених биљака и нових култивара мандарина (племки-калем гранчица, као и подлога које се користе за калемљење) и цитрусних воћних врста уопште, комбинација соматске хибридизације (фузија протопласта) која је праћена са сексуалном хибридизацијом (класично укрштање). Аутор у овом делу дисертације даје прегледан шематски приказ на који начин се примењују и допуњују ове две методе у циљу оплемењивања мандарина. Као крајњи резултат соматске хибридизације добијају се хетерокарони који делећи се *in vitro* формирају соматске ембрионе и даље израстају у тетраплоидне хибридне биљке. Ови соматски хибриди се користе даље као висококвалитетни родитељи у интерплоидном сексуалном укрштању (ручна полинација) са крајњим циљем добијања триплоидних безсемених хибрида.

У последњем делу **УВОДА** аутор наглашава да су као резултат досадашњих истраживања добијени безсемени култивари мандарина који су били резултат укрштања (поморанца + мандарина) а добијени соматски хибриди су формирали плодове који се тешко љуште. Аутор закључује на крају **УВОДА** да би уз добар одабир родитељских комбинација (са чистијим мандаринским пореклом) могли се добити нови тетраплоидни соматских хибрида који би потенцијално даље у интерплоидном укрштању могли дати триплоидно потомство са лако-љуштећим плодовима. Ово је и основна научна претпоставка којим **Мр Милица Ђаловић** нас уводи у предмет докторске дисертације.

У поглављу **ЦИЉ РАДА** наведен је основни циљ дисертације који се огледа у успостављању модел-система за производњу високо-квалитетних, безсемених триплоидних мандарина са већинским мандаринским пореклом. За реализацију основног циља **Мр Милица Ђаловић** поставила је неколико задатака а то су:

1. Развој и оптимизација ефикасних протокола соматске хибридизације за добијање тетраплоидних хибрида са већинским мандаринским пореклом. Добијени соматски хибриди би се даље користили као високо-квалитетни култивари и/или као родитељи у даљим укрштањима која могу да доведу до стварања нових триплоидних безсемених култивара.
2. Примена биотехнолошких метода у циљу утврђивања природе новонасталих соматских хибрида: а) утврђивање нивоа пloidности методом “flow” цитометрије и б) применом молекуларних маркера, методом EST-SSR.
3. Анализа морфолошких и комерцијалних особина одабраних хибрида добијених соматском хибридизацијом.
4. Примена класичних метода укрштања (сексуална хибридизација) одабраних

хибрида у циљу добијања нових триплоидних безсеменних хибрида мандарина.

У поглављу **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** детаљно су описани експериментални поступци коришћени током израде докторске дисертације. На почетку је приказан састав свих хранљивих подлога које су коришћене за индукцију и гајење ембриогених култура, као и за изолацију, пречишћавање и фузију протопласта. Детаљно су описане процедуре за успостављање културе протопласта из ћелијских суспензија и листова одабраних култивара мандарина као и процедуре за њихово фузионисање помоћу полиетилен гликола (ПЕГ). Описане су и процедуре за даље гајење фузионисаних протопласта и њихову регенерацију у комплетне биљке. Природа и потврда настанка соматских хибрида у популацији регенерисаних биљака је обављена утврђивањем нивоа плоидности методом “flow” цитометрије и потврду ауто- и алотетраплоидности соматских хибрида уз помоћ молекуларних EST-SSR маркера. Описане су и методе које су коришћене за анализу плодова соматских хибрида гајених у пољу за одређени број параметара који су важни за утврђивање комерцијалних квалитета добијених хибрида.

Посебан део у поглављу **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** аутор је посветио опису класичног укрштање између диплоидних и тетраплоидних култивара-хибрида методом ручне полинације. Такође је детаљно описан протокол за „embryo rescue“ - *in vitro* методу за потпуну регенерацију изданака из формираних зиготских ембриона проистеклих из диплоидног и интерплоидног укрштања. На крају овог поглавља **Мр Милица Ћаловић** је прегледно дала кратки опис свих култивара/селексија/хибрида коришћених за оплемењивање мандарина у овој докторској дисертацији.

Поглавље **РЕЗУЛТАТИ** аутор је поделио у два посебна потпоглавља: једно које се односи на резултате добијене после соматске хибридизације и друго које се односи на резултате истраживања у вези сексуалне хибридизације. У првом делу **Мр Милица Ћаловић** је приказала резултате вишегодишњих истраживања на развоју протокола за изоловање и фузију протопласта добијених из ембриогеног (нуцеларног) калуса односно ћелијских суспензија и неембриогеног извора (мезофила листова). Успостављени су ембриогени калуси/суспензије код четири култивара: два тангора-хибрида мандарине + слатке поморанџе (‘Murcott’ и ‘W.Murcott’), тангела-хибрида мандарине + грејпфрута (‘Page’) и обичне мандарине (‘Ponkan’). Утврђено је да је индукција ембриогеног калуса и соматске ембриогенезе зависила од генотипа, као и од хранљиве подлоге. Највећа индукција калуса је постигнута гајењем овула на хранљивој подлози са кинетином (5 и 10 mg/l) док је највећи број соматских ембриона добијен када су овуле гајене на подлози без регулатора растења. Изоловани протопласти из ембриогених ћелијских суспензија су фузионисани са протопластима изолованим из листова шест култивара (‘Willowleaf’, ‘Snack’, ‘Ponkan’, ‘Kinnow’, ‘Osceola’ и ‘W.Murcott’) и добијени су соматски хибриди. Коришћене су различите концентрације ПЕГ за хемијску фузију протопласта, а најбољи резултати су добијени са ПЕГ молекулске масе 8000. Извршена је анализа нивоа плоидности регенерисаних биљака и потврђено је да је добијено 65 соматских хибрида. Уз помоћ EST-SSR маркера **Мр Милица Ћаловић** је успешно доказала да су 46 соматска хибрида аутотетраплоидне биљке, 18 алотетраплоидне биљке, а за један соматски хибрид није било могуће одредити генетичко порекло. У групи аутотетраплоида, 20 биљака је имало SSR алелске профиле који су били потпуно подударни са алелским профилем (удвојеног) генома једног од родитеља (најчешће женског а једна је мушког родитеља). Остале аутотетраплоидне биљке (26) су имале удвојене геноме свог женског родитеља (‘W.Murcott’) али EST-SSR маркерима није било могуће у потпуности потврдити

идентитет генома мајке биљке. Додатним тестирањем калусних линија ‘W.Murcott’ култивара добијених из индивидуалних овула **Мр Милица Ђаловић** је показала да су неки калуси имали зиготско, а не нуцеларно порекло. Аутор је извршио и поређење SSR профила хибрида са збиром алела из оба родитеља у групи алотетраплоидних биљака. Овом анализом је добијено да профили хибрида нису идентични родитељским тј. да се алели из генома хибрида не подударају у потпуности са алелима из њиховог мушког родитеља ‘W.Murcott’. Аутор је тиме указао да и у популацији *in vitro* биљака култивара ‘W.Murcott’ које су коришћене као извор мезофилних протопласта поред нуцеларних постоје и биљке које су биле зиготског порекла (производ унакрсног, а не самоопрашивања). На овај начин је недвосмислено потврђено да добијени соматски хибриди где је као женски или мушки родитељ коришћен култивар ‘W.Murcott’ у својим геномима имају елементе непознатих родитеља.

Посебан одељак у првом потпоглављу **РЕЗУЛТАТИ** аутор је посветио морфолошкој анализи листова добијених соматских хибрида, као и анализи плодова одабраних соматских хибрида гајених у пољу за одређени број параметара који су онда поређени са стандардним вредностима за минимум зрелости и минимум квалитета за групу мандарина. Овим поређењем је аутор показао да су испитивани соматски хибриди по многим морфолошким особинама и квалитету исцеђеног сока једнаког или чак вишег квалитета од унапред утврђених стандардних вредности и тиме указао на њихову оправданост коришћења у даљем процесу оплемењивања мандарина.

Друго потпоглавље **РЕЗУЛТАТА** се односи на део истраживања на сексуалној хибридизацији кроз три различите врсте укрштања ($2x \times 2x$, $2x \times 4x$ и $4x \times 2x$) из којих је произведена велика популација (718 биљака) триплоидних ($3x$) хибрида. За потребе укрштања, аутор је током двогодишњих укрштања користио укупно 29 родитеља – 14 диплоидних ($2x$) и 15 тетраплоидних ($4x$) адултних биљака култивара/селексија/хибрида мандарина које су гајене на разним локацијама у централној Флориди. Од 15 ($4x$) соматских хибрида, њих шест су били хибриди слатке поморанце и мандарине; шест су били хибриди слатке поморанце, грејпфрута и мандарине; два су били хибриди грејпфрута и мандарине; и један је био хибрид слатке поморанце и памела. Техника „спашавања“ ембриона се показала као неопходан део протокола за добијање триплоидних хибрида јер је уз њену примену добијено значајно веће клијање зиготских ембриона изолованих из семена које је износило 66% у $2x \times 4x$ укрштањима и 92% у $2x \times 2x$ укрштањима. После утврђивања нивоа плоидности добијених сексуалних хибрида вршено је *in vitro* калемљење на клијанце подлога. Од 43 родитељске комбинације интерплоидног $2x \times 4x$ укрштања, 33 су биле успешне и добијено је 689 триплоида што је представљало 62% од укупно потпуно формираних биљака *in vitro*. Преостале биљке су биле диплоиди (35%, 394 биљке) или тетраплоиди (3%, 31 биљка). Четири реципрочна интерплоидна $4x \times 2x$ укрштања нису довела до стварања ниједног триплоида. После укрштања у само једној $2x \times 2x$ родитељској комбинацији укрштања добијено је 735 биљака од чега је 4% њих (29 биљака) били триплоиди а 96% (706 биљака) диплоиди. **Мр Милица Ђаловић** је у својој докторској дисертацији ефикасност добијања триплоидних биљака за појединачне родитељске комбинације израчунала као број триплоидних сексуалних хибрида по формираном плоду. Вредност овог параметара зависила је, пре свега од генотипова родитеља, али и срединских фактора.

У поглављу **ДИСКУСИЈА** **Мр Милица Ђаловић** је на адекватан начин, детаљно и критички, размотрила и упоредила добијене резултате са постојећим подацима из новије литературе. Аутор је прво дискутовао део истраживања који се односи на добијене

результате применом методе соматске хибридизације тј. фузије протопласта. Овом методом су створене нове ало- и аутотетраплоидне биљке из комерцијално популарних диплоидних родитеља чији су плодови изузетног квалитета, али нису безсемени. Обзиром на адитивну природу фузије протопласта и непостојање рекомбинације/сегрегације на тетраплоидном нивоу, соматском хибридизацијом се задржава изузетан квалитет родитељских плодова и само се преноси на триплоидно потомство у следећој фази унапређења мандарина – интерплоидном сексуалном укрштању ($2x \times 4x$ и $4x \times 2x$) путем контролисаног ручног опрашивања Геноми неких хибрида добијених у овој докторској дисертацији не представљају збир генома својих оригиналних мајки биљака, али они и даље имају велику вредност за сам процес оплемењивања мандарина. Њихова вредност се огледа у томе што они додатно повећавају генетску варијабилност линија које се могу користити као родитељи у интерплоидном сексуалном укрштању. Резултати добијени у овом делу дисертације указују на то да ембриогени калус поред нуцеларног може имати и зиготско порекло тако да **Мр Милица Ђаловић** истиче важну препоруку за будућа истраживања у области соматске хибридизације да се пре фузије протопласта уради тестирање линија ембриогеног калуса и *in vitro* биљака исклијалих из семена, молекуларним маркерима у циљу селекције оних који су "true to type", тј. представљају оригинални почетни култивар. У овом делу је такође продискутован значај резултата добијених у овој дисертацији на стварању нових тетраплоидних соматских хибрида са чистијим мандаринским пореклом у односу на постојање досадашњих тетраплоидних хибридних родитеља насталих фузијом протопласта мандарине и поморанце (који у сексуалном укрштању са диплоидима дају триплоидно потомство са плодовима који се тешко љуште).

Поред коришћења соматских хибрида као висококвалитетних родитеља у интерплоидном сексуалном укрштању са крајњим циљем добијања триплоидних безсеменних хибрида аутор је у првом делу **ДИСКУСИЈЕ** истакао да ови хибриди могу имати још једну практичну вредност. Наиме, тетраплоидни соматски хибриди могу да формирају плодове доброг квалитета и/или да имају друге добре карактеристике везане за отпорност на промену срединских фактора или отпорности на патогене, па самим тим могу бити произведени у нове култиваре. Управо је анализа плодова седам соматских хибрида гајених у пољу показала да су они по многим мереним параметрима једнаког или вишег квалитета од унапред утврђених стандардних вредности и самим тим су сврстани у групу култивара са потенцијалним могућностима да у будућности уђу у комерцијалну употребу. У другом делу **ДИСКУСИЈЕ** аутор је истакао значај добијених резултата интерплоидног сексуалног укрштања ($2x \times 4x$ и $4x \times 2x$) мандарина и њихових хибрида. Овим у суштини класичним начином укрштања се преноси добар квалитет плода са тетраплоидног на триплоидни ниво, а безсеменост се у триплоидном потомству појављује као нова карактеристика плодова (као последица постојања непарног броја хромозомских гарнитура тј. хромозомски небалансираних гамета). Аутор је анализирао и појаву стварања спонтаних триплоида у $2x \times 2x$ сексуалном укрштању захваљујући случајном стварању нередукованих $2n$ гамета код мајке биљке. Главни циљ ове докторске дисертације био је добијање потенцијално нове сорте мандарине са бесеменим плодом високог квалитета и касног сазревања. **Мр Милица Ђаловић** претпоставља да ће две добијене популације триплоида (718 биљака из $2x \times 4x$ и 29 биљака из $2x \times 2x$ укрштања) које су резултат ове докторске дисертације бити добар биљни материјал за одабир култивара са задовољавајућим карактеристикама које би се могле даље умножавати у комерцијалније сврхе. Резултати приказани у докторској дисертацији су поређени са резултатима на оплемењивању култивара мандарина који се спроводе у програмима других великих истраживачких центара у Шпанији и Калифорнији.

У поглављу **ЗАКЉУЧЦИ** аутор је у складу са постављеним циљевима, јасно резимирао добијене резултате рада:

1. Успешно је индукован ембриогени калус и соматски ембриони нуцеларног порекла из изолованих овула четири култивара: два тангора ('Murcott' и 'W.Murcott'), тангела ('Page') и обичне мандарине ('Ponkan').
 2. Индукција ембриогеног калуса и соматске ембриогенезе је зависила од генотипа као и од хранљиве подлоге. Највећа индукција калуса је добијена гајењем овула на хранљивој подлози са кинетином, док је највећи број соматских ембриона добијен на подлози без регулатора растења.
 3. Присуство пектолиазе у ензимској смеси за изолацију протопласта из ћелијских суспензија пореклом из ембриогеног калуса је имало негативан ефекат на изолацију протопласта.
 4. Применом методе соматске хибридизације уз помоћ хемијске фузије протопласта полиетилен гликолом (ПЕГ) успешно су добијени нови тетраплоидни хибриди култивара/селекција из групе мандарина: 'Ponkan', 'Willowleaf', 'Kinnow', 'Murcott', 'W.Murcott' и 'Snack'.
 5. ПЕГ молекулске масе 8000 је имао највећу успешност фузије протопласта пореклом из ембриогених ћелија суспензија и мезофила листова.
 6. Произведени соматски хибриди су били ауто- и/или алотетраплоиди што је потврђено "flow" цитометријом и EST-SSR молекуларном методом. На основу ове анализе утврђено је да је 28% добијених соматских хибрида било алотетраплоидно, 71% је било аутотетраплоидно а за једну биљку није било могуће утврдити нивоу плоидности.
 7. Анализа плодова зрелих соматских хибрида гајених у пољу је показала да су они по многим морфолошким особинама и квалитету сока једнаког или чак вишег квалитета од унапред утврђених стандардних вредности за минимум зрелости и квалитета за групу мандарина.
 8. Методом ручног опрашивања је извршена класична интерплоидна сексуална хибридизација код 48 родитељских комбинација - полен пореклом од два диплоидна и 14 тетраплоидних мушких родитеља је служио за опрашивање 12 диплоидних и три тетраплоидна женска родитеља.
 9. Извршена су три типа сексуалног укрштања ($2x \times 2x$; $2x \times 4x$; $4x \times 2x$), од којих су $2x \times 2x$ и $2x \times 4x$ типови укрштања били успешни док у комбинацији $4x \times 2x$ није постигнут успех. На основу 34 успешне родитељске комбинације добијено је укупно 4051 семена.
 10. Из интерплоидног сексуалног укрштања $2x \times 4x$ је произведено 689 триплоида уз коришћење 33 родитељске комбинације. Из једне родитељске комбинације $2x \times 2x$ је добијено 29 триплоидних хибрида.
 11. *In vitro* техника "спашавања" ембриона је била од пресудне важности за добијање триплоидних биљака, нарочито у случају интерплоидног $2x \times 4x$ укрштања јер овако добијена семена не могу да клијају природно уколико се посаде директно у земљу.
- У поглављу **ЛИТЕРАТУРА** приказан је списак од 219 цитираних библиографских јединица. Коришћени су релевантни литературни наводи, што указује на студиозан приступ аутора анализи резултата ове докторске дисертације.

У поглављу **БИОГРАФИЈА АУТОРА** изложена је кратка и садржајна биографија аутора докторске дисертације.

А. Биографија

Мр Милица Ђаловић је рођена 11. маја 1968. године у Београду, Србија где је завршила основну и средњу школу, а Природно-математички факултет Универзитета у Београду,

Србија, студијска група Општа Биологија, завршила је 1992. године. Магистарски рад на студијској групи Биљна физиологија одбранила је 1997. године на Биолошком факултету Универзитета у Београду. После завршеног факултета радила је као волонтер на Институту за биолошка истраживања "Синиша Станковић" Универзитета у Београду а у периоду од 1995-1998. године радила је као истраживач сарадник. Септембра 1998. године одлази у Сједињене Америчке Државе где ради у Лабораторији за ћелијску генетику (Citrus Research and Education Center, University of Florida, Institute for Food and Agricultural Sciences). Од јануара 2011. године учесник је пројекта које финансира Министарство за просвету, науку и технолошки развој Републике Србије (ТР31019). **Мр Милица Ћаловић** је до сада је била ангажована на два национална и три међународних пројеката и коаутор је једног поглавља у међународним монографијама, 11 радова међународног значаја, 3 рада националног значаја и 8 конгресних саопштења.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

1. Поглавље у књизи: Grosser JW, **Ћаловић М**, Louzada ES (2010) Ch. 10. Protoplast fusion technology - somatic hybridization and cybridization. Pp 175-198. IN: M.R. Davey and P. Anthony (Eds.) *Plant Cell Culture - Methods Express*. Wiley Interscience, John Wiley & Sons, Ltd **M14**
2. Ananthakrishnan G, **Ћаловић М**, Serrano P, Grosser JW (2006) Production of additional allotetraploid somatic hybrids combining mandarins with pre-selected pummelos as potential candidates to replace sour orange rootstock. In *Vitro Cell Dev. Biol. - Plant* 42:367-371. **Plant Science 103/147 (2006), IF 0.607** **M23**
2. Chen C, Grosser JW, **Ћаловић М**, Pasquali G, Gmitter Jr FG (2008) Verification of mandarin+pummelo somatic hybrids by EST-SSR marker analysis. *J. Amer. Soc. Hort. Sci* 133: 794-800. **Horticulture 9/23 (2008), IF 0.972** **M22**
3. Grosser JW, An HJ, **Ћаловић М**, Lee D, Chen C, Vasconcellos M, Gmitter Jr FG (2010) Production of new allotetraploid and autotetraploid citrus breeding parents: Focus on zipperskin mandarins. *Hort. Sci* 45: 1160–1163. **Horticulture 12/23 (2008), IF 0.886** **M22**

Б. Библиографија:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. Поглавље у књизи: Grosser JW, **Ћаловић М**, Louzada ES (2010) Ch. 10. Protoplast fusion technology - somatic hybridization and cybridization. Pp 175-198. IN: M.R. Davey and P. Anthony (Eds.) *Plant Cell Culture - Methods Express*. Wiley Interscience, John Wiley & Sons, Ltd. **M14**
2. Vinterhalter D, Vinterhalter B, **Ћаловић М** (1997) The relationship between sucrose and cytokinins in the regulation of growth and branching in potato cv. Desiree shoot cultures. *Acta Hort.* 462: 319-323. **M33**
3. **Ћаловић М**, Vilorio Z, Nielsen B, Gmitter Jr FG, Castle WS, Grosser JW (2000) Somatic embryogenesis from lemon styles and analysis of genetic stability in regenerated plants using RAPD and flow cytometry. *Proc. Intl. Soc. Citricult. IX Congr* 131-134. **M33**

4. Ananthakrishnan G, **Ćalović M**, Serrano P, Grosser JW (2006) Production of additional allotetraploid somatic hybrids combining mandarins with pre-selected pummelos as potential candidates to replace sour orange rootstock. *In Vitro Cell Dev. Biol. - Plant* 42:367-371. **Plant Science 103/147 (2006), IF 0.607** **M23**
 5. Grosser JW, Ananthakrishnan G, Guo WW, **Ćalović M**, CHandler JL, Gmitter Jr FG (2006) Applications of somatic hybridization and cybridization in scion and rootstock improvement with focus on citrus. *Acta Hort.* 738: 73-81. **M33**
 6. Ananthakrishnan G, Orbović V, Pasquali G, **Ćalović M**, Grosser JW (2007) Transfer of Citrus Tristeza Virus (CTV)-derived resistance candidate sequences to four grapefruit cultivars through *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. *In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant* 43: 593-601. **Plant Science 112/152 (2007), IF 0.548** **M23**
 7. Orbović V, **Ćalović M**, Vilorija Z, Nielsen B, Gmitter Jr FG, Castle WS, Grosser JW (2008) Analysis of genetic variability in various tissue culture-derived lemon plant populations using RAPD and flow cytometry. *Euphytica* 161: 329-335. **Plant Science 66/155 (2008), IF 1.403** **M22**
 8. Chen C, Grosser JW, **Ćalović M**, Pasquali G, Gmitter Jr FG (2008) Verification of mandarin+pummelo somatic hybrids by EST-SSR marker analysis. *J. Amer. Soc. Hort. Sci* 133: 794-800. **Horticulture 9/23 (2008), IF 0.972** **M22**
 9. Omar AA, **Ćalović M**, El-Shamy HA, An HJ, Grosser JW (2008) Transformation and regeneration of transgenic `W. Murcott` (Nadorcott) mandarin using a protoplast-GFP transformation system. *Hort. Sci* 43: 1155-1155. **Horticulture 11/23 (2008), IF 0.914** **M22**
 10. Grosser JW, An HJ, **Ćalović M**, Lee D, Chen C, Vasconcellos M, Gmitter Jr FG (2010) Production of new allotetraploid and autotetraploid citrus breeding parents: Focus on zipperskin mandarins. *Hort. Sci* 45: 1160-1163. **Horticulture 12/23 (2008), IF 0.886** **M22**
 11. Grosser JW, **Ćalović M**, Gmitter Jr FG (2012) *In Vitro* Breeding Facilitates Conventional Breeding for Scion and Rootstock Improvement in Citrus. Proceedings of the 7th International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding (Ed. D. Geelen), ISHS. *Acta Hort.* 961: 27-34. **M33**
- B2. Радови у часописима домаћег значаја**
1. **Ćalović M**, Vinterhalter D, Vinterhalter B (1997) Improved plant regeneration from mature embryo derived callus of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Bulletin de l'Institut et du Jardin Botaniques de l'Universite de Belgrade* 29:123-128. **M52**
 2. Miljuš-Djukić J, Vinterhalter D, Vinterhalter B, **Ćalović M**, Ninković S (1997) *In vitro* propagation and *Agrobacterium* mediated transformation of potato cv. Desiree. *Bulletin de l'Institut et du Jardin Botaniques de l'Universite de Belgrade* 29:115-121. **M52**
 3. **Ćalović M**, Vinterhalter D, Vinterhalter B, Sarić M (1998) Genetic specificity of mineral uptake of callus tissue from different wheat cultivars. *Book of proceedings of International Symposium "Breeding of small grains," Kragujevac, Yugoslavia.* 125-131 **M63**
- B3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја**
1. Ninković S, Miljuš-Djukić J, **Ćalović M**, Vinterhalter B, Milošević D, Vinterhalter D (1998) Effect of ipt gene on the growth pattern and stolon formation of potato shoot

- cultures. IX International Congress on Plant Tissue and Cell Culture, Jerusalem, Israel. **M34**
2. Viloría Z, **Ćalović M**, Nielsen B, Orbović V, Gmitter FG, Castle W, Grosser JW (2002) Detection of genetic variations in tissue culture-derived lemon plants using RAPD and flow cytometry. 10th International Association for Plant Tissue Culture and Biology Congress. Orlando, FL. **M34**
 3. Grosser JW, **Ćalović M**, Serrano P, Gmitter Jr FG, Chandler JL (2005) Recent progress using somatic hybridization and cybridization in efforts to develop high quality seedless mandarine hybrids. American Society for Horticultural Science Annual Conference, Las Vegas, NV. **M34**
 4. Grosser JW, Ananthakrishnan G, **Ćalović M** Serrano P (2005) Production of additional allotetraploid somatic hybrids combining mandarins with pre-selected pummelos as potential candidates to replace sour orange rootstock. Society for In Vitro Biology, Annual Meeting, Baltimore, MD. **M34**
 5. Orbović V, **Ćalović M**, Grosser JW (2008) The effect of media composition on the efficiency of Agrobacterium-mediated transformation on Citrus. American Society for Horticultural Science Annual Conference, Orlando, FL. **M34**
 6. Omar A, **Ćalović M**, El-Shamy H, Grosser JW (2008) Transformation and regeneration of transgenic “W. Murcott” (Nadorcott) mandarin using a protoplast-GFP transformation system. American Society for Horticultural Science Annual Conference, Orlando, FL. **M34**
 7. Grosser JW, **Ćalović M** and Gmitter Jr. FG (2012) In Vitro Breeding Facilitates Conventional Breeding for Scion and Rootstock Improvement in Citrus. 7th International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding, Ghent, Belgium. **M34**
 8. Orbović V, **Ćalović M**, Barte G, Gonzales-Blanco P, Etxeberria E, Grosser JW (2014) Production and characterization of transgenic citrus plants carrying P35 anti-apoptotic gene. American Society for Horticultural Science Annual Conference, Orlando, FL. **M34**
- B4. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја**
1. Todorović I, **Ćalović M**, Vinterhalter B, Vinterhalter D, Milinković M, Milošević D (1997) *In vitro* shoot cultures - Potato Gene Bank. 12th Congress of Yugoslav society of Plant Physiology, Kragujevac, Yugoslavia. **M64**
 2. **Ćalović M**, Vinterhalter B, Vinterhalter D (1997) Effect of genotype and carbohydrates on plant regeneration ability of callus tissue obtained from mature wheat embryos. 12th Congress of Yugoslav society of Plant Physiology, Kragujevac, Yugoslavia. **M64**
 3. Kovačević V, Vinterhalter B, Vinterhalter D, **Ćalović M** (1997) *In vitro* propagation of *Pyrethrum cinerariaefolium* Trev. 12th Congress of Yugoslav Society of Plant Physiology, Kragujevac, Yugoslavia. **M64**
- B5. Магистарски рад**
- Ćalović Milica** (1997) Specificnosti usvajanja mineralnih elemenata u kalusnom tkivu kultivara pšenice. Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu **M72**

МИШЉЕЊЕ И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

На основу увида у докторску дисертацију **Мр Милица Ћаловић** под насловом “**Опемењивање мандарина (*Citrus reticulata* Blanco) методама соматске и сексуалне хибридизације у циљу добијања нових безсеменних култивара**“, као и на основу увида у њен рад током реализације ове докторске дисертације, Комисија закључује да су задаци постављени у циљу овог истраживања успешно остварени и да постигнути резултати представљају значајан допринос физиологији и биотехнологији биљака. У докторској дисертацији обрађени су веома актуелни научни проблеми из области опемењивања мандарина. Комисија посебно жели да нагласи да је кандидат, на основу вишегодишњег искуства на опемењивању разног цитрусног воћа показао висок степен компетентности и зрелости у планирању експеримената и критичкој интерпретацији постигнутих резултата, као и извођењу основних закључака. **Мр Милица Ћаловић** је коаутор једног поглавља у међународној књизи и 3 рада из категорије M20 који су резултат њене докторске дисертације. Поред значајног доприноса фундаменталним истраживањима посебно на пољу културе и фузије протопласта и примене молекуларних маркера у потврђивању природе добијених хибрида докторска дисертација има и велики практични значај. Треба нагласити да је као резултат ове дисертације добијено 65 нових соматских хибрида, који ће поред свог комерцијалног значаја имати велики значај као тетраплоидни родитељи у будућим програмима класичног укрштања. Наравно, посебно велики практични значај резултата докторске дисертације **Мр Милице Ћаловић** је и добијање 718 нових триплоидних култивара за које се очекује да имају веома тражену особине као што су безсеменост и лако љуштење плодова.

На основу свега изложеног, задовољство нам је да предложимо Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај извештај и одобри кандидату јавну одбрану докторске дисертације под насловом “**Опемењивање мандарина (*Citrus reticulata* Blanco) методама соматске и сексуалне хибридизације у циљу добијања нових безсеменних култивара**”.

КОМИСИЈА:

др Слађана Јевремовић, виши научни сарадник,
Институт за биолошка истраживања “Синиша Станковић”, Универзитет у Београду

др Златко Гиба, ванредни професор
Биолошки факултет, Универзитет у Београду

др Ангелина Суботић, научни саветник,
Институт за биолошка истраживања “Синиша Станковић”, Универзитет у Београду

У Београду, 18.09. 2014. године.