

**Предмет: Извештај комисије за оцену урађене докторске дисертације
мр Милене Ђорђевић**

Одлуком Наставно-научног већа Пољопривредног факултета Универзитета у Београду бр. 290/8-6.1. Од 20.05.2015. године, именована је Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације мр Милене Ђорђевић, истраживача сарадника Института за воћарство у Чачку, под насловом: „**Цитоембриолошки аспекти оплођења сорте шљиве „Позна плава“ (*Prunus domestica L.*)**“

Комисија у саставу: др Драган Николић, редовни професор Пољопривредног факултета у Београду, др Драган Милатовић, ванредни професор Пољопривредног факултета у Београду, др Радосав Церовић, научни саветник Иновационог центра Технолошко-металуршког факултета у Београду, др Евица Мратинић, редовни професор Пољопривредног факултета у Београду и др Вера Ракоњац, редовни професор Пољопривредног факултета у Београду, прегледала је и оценила докторску дисертацију и подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

1. Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација мр Милене Ђорђевић написана је на 139 страница, у оквиру којих се налази 17 табела, 16 графикана и 18 слика (1 појединачна и 17 композитних). Испред основног текста налази се резиме са кључним речима на српском и енглеском језику, као и приказ садржаја. У докторској дисертацији је цитирано и у литератури наведено 220 референци.

Докторска дисертација садржи 9 основних поглавља, и то: Увод (стр. 1–3), Циљ истраживања (стр. 4), Преглед литературе (стр. 5–14), Радна хипотеза (стр. 15), Објекат, материјал и методе рада (стр. 16–26), Резултати истраживања (стр. 27–77), Дискусија (стр. 78–116), Закључак (стр. 117–120) и Литература (стр. 121–139). Поглавља: Објекат, материјал и методе рада, Резултати и Дискусија садрже више подпоглавља.

2. Приказ и анализа докторске дисертације

Увод. У уводу дисертације је указано на систематско место, порекло и број хромозома код европске шљиве. Кандидат наводи да је један од основних услова успешне и рентабилне производње воћака правилан избор одговарајуће главне сорте, односно комбинације сорта – подлога, као и одабир одговарајућег опрашивача. За постизање максималне реализације родног потенцијала појединих сорти наведена је неопходност познавања различитих аспеката из области биологије оплођења. Један од два битна фактора који утичу на регуларност одвијања процеса оплођења су температурни услови. Кандидат наводи да је други веома битан фактор који утиче на регуларност процеса оплођења генотип опрашивача. Изнет је значај познавања трајања виталности нормално развијеног женског гаметофита у процесима оплођења. Такође је наведена неопходност

познавања стадијума зрелости семеног заметка у време цветања, када је жиг у могућности да прими полен, јер то има значаја са аспекта самог цвета да постане плод. Уколико је у време пуног цветања семени заметак зрео, у зависности од температурних кретања након цветања, постоји већи или мањи ризик да дође до његове дегенерације у време када поленове цевчице стигну у плодник.

Циљ истраживања. Један од циљева ове дисертације био је испитивање динамике раста поленових цевчица у стубићу сорте шљиве Позна плава у три варијанте опрашивања. Испитивања квантитативних параметара раста поленових цевчица су била обављена у првих десет дана од почетка пуног цветања. У раду је такође анализиран функционални стадијум ембрионске кесице и виталност семених заметака првих десет дана од почетка пуног цветања, са циљем да се утврди стадијум њихове зрелости у време када се реално очекује да поленова цевчица стигне до њих. Евидентиране су појаве неправилности у грађи семених заметака које могу имати утицаја на слабо заметање плодова а самим тим и на ниске приносе. Током извођења огледа бележена су температурна кретања да би се утврдио њихов утицај на интеракцију између мушког гаметофита и женског спорофита. На крају кандидат наводи значај добијених резултата са једне стране у употпуњавању знања из области репродуктивне биологије шљиве, док са друге стране је у давању одговора на слабу родност ове сорте у адекватном одабиру сорте опрашивача.

Преглед литературе. У поглављу Преглед литературе приказани су доступни литературни извори домаћих и страних истраживача о биологији оплођења различитих врста воћака. У првом делу су изнети резултати аутора који су испитивали утицај различитог састава медијума: сахарозе (Церовић, 1989; Милатовић & Николић, 2007а; Asma, 2008; Alcaraz et al., 2011), полиамида (Sorkheh et al., 2011), биљних регулатора (Bolat & Pirlak, 2003), борне киселине (Bolat & Pirlak, 2003), фунгицида (Церовић et al., 1999; Zarrabi & Imani, 2011) и температуре (Loupassaki et al., 1997; Mert, 2009; Pirlak, 2002; Церовић & Ружић, 1992а; De Ceault & Polito, 2010) на клијавост полена *in vitro*. Затим су наведени резултати испитивања морфологије полена и орнаментике егзине помоћу скенирајућег електронског микроскопа који су се показали као веома корисни за таксономију блиско сродних врста (Fogle, 1977а, b; Мићић, 1988; Мићић et al., 1989; Evrenosoğlu & Misirli, 2009; Geraci et al., 2012). Посебна пажња је посвећена радовима у којима су испитивани квантитативни параметри раста поленових цевчица у стубићу већег броја представника рода *Prunus* (Herrero & Dickinson, 1981; Stösser & Anvari, 1981; Herrero & Arbeloa, 1989; Herrero, 1992; Церовић, 1994; Palanivelu & Tsukamoto, 2011; Радичевић, 2013). Кандидат наводи резултате испитивања самобесплодности различитих врста воћака добијене коришћењем две различите методе (испитивањем заметања плодова и испитивањем раста поленових цевчица у стубићу). При томе износи да је недостатак традиционалног приступа испитивања самобесплодности тај што заметање плодова у пољским условима у зависности од временских прилика може да варира по годинама. Кандидат посебан акценат ставља на примену флуоресцентно-микроскопске методе за уочавање инкомпатибилних поленових цевчица у стубићу. Анализирани су радови у којима је примењена ова метода за испитивање инкомпатибилности код различитих врста воћака: јабуке (Marcucci & Visser, 1987), вишње (Церовић, 1989; 1994), трешње (Радичевић, 2013), кајсије (Милатовић & Николић, 2007б), шљиве (Кузмановић, 2008; Николић & Милатовић, 2010; Милошевић, 2013; Ђорђевић et al., 2014). Наведени су радови у којима је испитиван утицај атрактаната од стране женског гаметофита на раст поленових цевчица у плоднику (Arbeloa & Herrero, 1987; Herrero, 2000; Higashiyama et al., 2001; Higashiyama, 2002; Herrero, 2003; Márton et al., 2005; Dresselhaus & Márton, 2009).

Поред тога кандидат је посветио пажњу радовима који се баве губитком усмереног раста поленових цевчица у плоднику (Herrero, 2000; Церовић & Ружић, 1992b; Радичевић, 2013; Ђорђевић, 2010). Са посебном пажњом кандидат је приступио обради дела литературе који се односи на стадијум зрелости семеног заметка у време пуног цветања (Sato et al., 1988; Furukawa & Bukovac, 1989; Veppu et al., 1997; Церовић & Мићић, 1999; Pimienta & Polito, 1983; Alburquerque et al., 2002; 2004). Приказани су литературни подаци који се баве утицајем температурних кретања на ток прогамне фазе оплођења. Описан је утицај различитих температура код појединих врста воћака на раст поленових цевчица у стубићу, а такође и на дужину виталности нормално развијеног женског спорофита (Церовић et al., 2000; Veppu et al., 2001; Olesen & Bindi, 2002; Rodrigo & Herrero, 2002; Kozai et al., 2004; Tubiello et al., 2007; Hedhly et al., 2005b; Hedhly et al., 2007, 2008; Hedhly, 2011; Радичевић, 2013).

Радна хипотеза. У овом поглављу кандидат истиче да се у реализацији истраживања пошло од претпоставке да ће испитивана сорта шљиве, као и коришћени опрашивачи испољити своје генотипске специфичности у погледу репродуктивних карактеристика. Даље је наведено да се међу коришћеним сортама опрашивачима очекивало постојање разлика у погледу морфометријских особина поленових зрна, као и клијавости полена *in vitro*. Део истраживања био је базиран на претпоставци да ће температурни услови имати утицаја на број иницијално и финално приметних плодова у испитиваним варијантама опрашивања, као и на виталност семених заметака. Значајан део истраживања био је заснован на претпоставци да ће цитоембриолошка испитивања плодника показати ток процеса макрогаметогенезе, односно, да ће указати на функционално стање ембрионове кесице у току првих десет дана након пуног цветања. Претпоставило се, на крају, да ће у испитиваним агроколошким условима Чачка проучавана сорта шљиве као и коришћени опрашивачи испољити своје, како позитивне, тако и негативне биолошке особине и да ће добијени резултати послужити као значајан извор информација у погледу расветљавања узрока смањене плодности ове сорте шљиве.

Објекат, материјал и методе рада. У овом поглављу кроз три подпоглавља докторант наводи локацију и карактеристике засада где је вршено истраживање, приказ коришћеног материјала, начин постављања и извођења пољских и лабораторијских огледа, као и примену статистичких метода у обради података. Испитивања су обављена у засаду шљиве на објекту Љубић, Института за воћарство у Чачку, у 2008., 2010. и 2011. години. Као материјал за испитивање коришћена је сорта шљиве Позна плава. Створена је 1980. године у Институту за воћарство у Чачку, самооплодњом сорте Чачанска најбоља. За сорту је призната 2008. године. Трогодишња истраживања на овој сорти су обухватила пољска и лабораторијска испитивања. Лабораторијска испитивања су реализована у лабораторијама Института за воћарство у Чачку и Пољопривредног факултета Универзитета у Београду. Експериментални део истраживања се односио на:

Испитивање клијавости полена *in vitro* – тестом клијавости полена на агаро-сахарозној подлози. Цветови сорти Чачанска најбоља, Presenta, Nanita и Позна плава, за ова испитивања сакупљани су у фази позног балона. У лабораторијским условима антере су стављане у папирне кутије и држане на температури од 20°C, 24–48 h, односно, до момента њиховог пуцања и ослобађања поленових зрна. Полен од сваке сорте је засејаван на хранљиву подлогу (1% агар и 12% сахароза), разливену у три петри кутије. На основу методе утврђивања клијавости полена по Galleta (1983), након периода инкубације, као клијала поленова зрна рачунала су се она која су исклијала више од свог пречника. У петри кутијама пребројавање исклијалих поленових зрна је вршено у три видна поља, а у сваком пољу је анализирано око 100 поленових зрна.

Морфометрију полена – ова испитивања обављена су у току једне године. Цветови су прикупљани у фази позног балона. Након сакупљања антера у папирне кутије, њиховог сушења и прскања, полен је до даље анализе држан у флаконима у фрижидеру. За потребе ове анализе, полен је помоћу четкице наношен на двослојну траку која је постављена на носач објекта микроскопа, а затим је урађено напаравање слојем злата дебљине 20 nm, на апарату марке BAL-TEC SCD 005 (Carovani Brothers Inc., Scotia, NY, USA). Припремљени препарати су посматрани скенирајућим електронским микроскопом (SEM) марке JEOL JSM-6390LV (Токуо, Јапан), при увећању од 2000× за цело поленово зрно и на 15000× за делове површине егзине. Код сваке сорте посматрано је и анализирано по 30 поленових зрна.

Динамику раста поленових цевчица *in vivo* – испитивања су обављена у трогодишњем периоду у варијантама слободног опрашивања, странаопрашивања и самоопрашивања. За овај део испитивања коришћен је полен сорти Чачанска најбоља, Presenta, Nanita и Позна плава. У фенофази позног балона извршена је емаскулација цветова сорте Позна плава након чега су гране са емаскулираним цветовима изоловане пергаментним кесама, ради спречавања неконтролисане полинације. Вештачко наношење полена на жиг тучка урађено је у моменту када се на жигу уочавала секреција. На те гране су поново наношене кесе које су потом уклањане након 10–15 дана. Од момента опрашивања у пет сукцесивних термина (48 h, 96 h, 144 h, 192 h и 240 h) извршено је фиксирање, око 40 цветова у свакој варијанти опрашивања. За фиксацију је коришћен ФПА фиксатив. За испитивање раста поленових цевчица у стубићу и плоднику, коришћена је флуоресцентно-микроскопска метода са анилин-плавим као флуорохромом (Preil, 1970; Kho & Vaer, 1971). У лабораторији, на предметној плочици стубић је у свом доњем делу одвајан од плодника. За посматрање раста поленових цевчица у стубићу, на предметној плочици исти је уздужно раздвајан, а онда је помоћу покровне љуспице прављен сквош препарат. Плодник је раздвајан по сутури. Семени заметак је засецањем у лонгитудинално-тангенцијом правцу да би се уочио бољи продор поленових цевчица у микропилу и нуцелус (Церовић, 1994). Утврђивање дужине поленових цевчица у стубићу рађено је на микроскопу Olympus BX61 (Токуо, Јапан), у софтверском програму AnalySIS (Soft Imaging System GmbH, Münster, Germany), где се коришћењем MIA (Multiple Image Analysis) добијала слика целог стубића. У сваком испитиваном узорку одређиван је број поленових цевчица у горњој трећини стубића, број поленових цевчица продрлих у плодник, најдужа поленова цевчица у стубићу (горња, средња или доња трећина стубића), продор поленових цевчица у плодник (локула плодника, микропила или нуцелус семеног заметка), присуство инкомпатибилних поленових цевчица у стубићу као и појава специфичног раста поленових цевчица у плоднику. За испитивање квантитативних параметара раста поленових цевчица у свакој варијанти опрашивања и за сваки термин фиксирања прегледано је по 30 узорака.

Хистолошка испитивања плодника – којима је у двогодишњем периоду (2008 и 2010. година) проучена динамика процеса мегагаметогенезе и организације ембрионске кесице. За ово испитивање коришћена је варијанта слободног опрашивања и неопрашени третман који је у овом случају представљао контролу. По 20 цветова у свакој варијанти је фиксирано у ФПА фиксативу, у дводневним интервалима, почев од момента пуног цветања закључно са десетим даном од почетка пуног цветања. Фиксирани узорци су чувани у фрижидеру на +4°C до момента њихове припреме и посматрања под микроскопом.

У анализи је коришћено ткиво плодника. Оно је исечено у облику трапеза, да би се омогућио лакши улазак ксилола, а потом и парафина у ћелије семеног заметка. Фиксирани материјал је прво дехидрисан у серији растуће концентрације алкохола,

потом је урађено просветљавање у ксилолу, а затим увођење у парафин. Узорци у парафину су држани у термостату, на константној температури од 61°C. Потом су разливани у петри кутије, где су одвајани појединачни узорци, који су сечени у облику трапеза и наносени на носаче. Непосредно пре сечења узорци су држани извесно време на леду. Пресеци узорака, дебљине 10 μm , су сечени на микротому марке Baird&Tatlock (London, England) и наносени на предметне плочице које су претходно провучене кроз кроз раствор 1% желатина и 0,1% стипсе. Након пар дана сушења у термостату на 20°C. узорци су провлачењем кроз серију опадајуће концентрације алкохола (96–50%) доведени до фазе бојења. За хистолошка испитивања узорци су бојени сафранином, кристал љубичастим и светло зеленим, по методи Gerlach (1969). На обојене пресеке лепљена је покровна љуспица помоћу канада балсама и плочице су сушене пар дана у термостату. Посматрање пресека обављено је на микроскопу марке Carl Zeiss (Jena, Germany), а фотографисање на микроскопу Olympus BX61 (Tokyo, Japan). Хистолошка испитивања су обављена на примарном и секундарном семеном заметку. Према Дућ (1984) и Furukawa & Vukovac (1989) у варијанти слободног опрашивања и у неопрашеној варијанти су регистровани следећи развојни стадијуми ембрионске кесице: двоједарни, четвороједарни и осмоједарни стадијум, при чему је осмоједарни стадијум даље рангиран као делимично организована ембрионска кесица (у случају када се у ембрионској кесици налази осам једара која су заузела свој положај, али није још дошло до вакуоларизације њихових ћелија) и потпуно организована или зрела ембрионска кесица (у којој су све ћелије нормално развијене). Као функционалне ембрионске кесице су се рачунале и оне у којима је дошло до дегенерације антипода, па су се у том случају оне налазиле у петоједарном стадијуму. Уколико је дошло до спајања поларних једара то се рачунало као четвороједарни стадијум. У свакој испитиваној варијанти и за сваки термин фиксирања анализирано је по 10 плодника (осам уздужних и два попречна пресека).

Виталност семених заметака неопрашених цветова – у трогодишњем периоду виталност семених заметака је оцењена применом флуоресцентно–микроскопске методе описане од стране Anvari & Stösser (1978a, б), где је различит интензитет флуоресценције семених заметака био индикатор губитка њихове виталности. Емаскулирани, неопрашени цветови су у дводневним интервалима, почев од момента пуног цветања па до десетог дана од пуног цветања, фиксирани у ФПА фиксатив. Сви фиксирани узорци су чувани у фрижидеру на +4°C до момента њихове даље припреме и посматрања под микроскопом. Након бојења са анилин плавим, на предметним плочицама плодници су одсецани од стубића и отварани по сутури. На основу субјективног критеријума, визуелним прегледом интензитет флуоресценције семених заметка који се јављао је подељен у пет категорија: 1 – нема флуоресценције; 2 – флуоресценција у халазном делу; 3 – флуоресценција у халазном делу која се шири ка бочној страни; 4 – флуоресценцијом је захваћен и микропиларни део; 5 – цео семени заметак флуоресцира. Мада је примарни семени заметак кључан у даљем процесу оплођења и цветања плодова, испитана је и дужина трајања виталности секундарних семених заметака, да би се установило у ком се стадијуму они налазе. Код оба семена заметка је анализирана подударност ове методе са коришћеном методом хистолошког бојења. За сваки термин фиксирања анализирано је по 30 плодника. Узорци су посматрани и анализирани под ултравиолетном светлошћу на моторизованом микроскопу, марке Olympus BX61 под плавим филтером (таласна дужина 340–380 nm).

Иницијално и финално цветање плодова – за испитивање иницијално и финално заметнутих плодова у варијанти слободног опрашивања одабране су 3–4 гране сорте шљиве Позна плава на којима је пребројан укупан број цветова (око 100 цветова по грани). У варијантама страноопрашивања и самоопрашивања од момента

опрашивања су обележене гране, са око 200–300 опрашених цветова на њима. Број иницијално приметних плодова утврђен је четири до пет недеља после опрашивања, док је бројање финално приметних плодова обављено на почетку фенофазе зрења плодова.

Температурна кретања у току трајања фенофазе пуног цветања – у све три године, праћене су дневне температуре, током трајања фенофазе пуног цветања. Израчунате су средње дневне температуре и просечна средња дневна температура фенофазе пуног цветања (од дана опрашивања, па до десетог дана од дана опрашивања).

Статистичку обраду података – добијени резултати статистички су обрађени применом Фишеровог модела анализе варијансе двофакторијалног огледа. Код испитивања морфометријских карактеристика поленових зрна примењен је једнофакторијални модел анализе варијансе. У случају појаве статистичке значајности F – показатеља у оквиру неког од основних фактора као и њихове интеракције рађено је тестирање значајности разлика појединачних средина применом LSD теста, са прагом значајности од 95%. Међусобна зависност између поједних параметара који су испитани утврђена је корелационом анализом применом Пирсоновог коефицијента прости корелације. На основу регресионе анализе преко тестирања изабран је тип функције која најбоље одговара кретању броја функционалних ембрионских кесица у зависности од дана испитивања. У анализи је коришћен нелинеарни метод квадратне регресије. Анализа података је обављена коришћењем статистичког софтверског пакета STATISTICA, Version 8 (StatSoft, Inc., Tulsa, Oklahoma, USA).

Резултати. Резултати истраживања обрађени су у оквиру шест подпоглавља.

У првом подпоглављу (*Клијавост полена in vitro*) утврђено је да су сорте Presenta, Nanita и Чачанска најбоља, током периода испитивања имале клијавост полена која је била изнад 35%, док је код сорте Позна плава утврђена најнижа вредност клијавости полена (испод 20%).

У другом подпоглављу (*Морфометрија полена*) кандидат је приказао податке испитивања морфометрије поленових зрна проучаваних сорти анализираних помоћу СЕМ-а. При томе је утврђено да су сва поленова зрна симетрична, изополарна и тризоноколпатна (са три клицине бразде или колпе). У поларном приказу облик полена испитиваних сорти је био троугласто-гуп-конвексан, док је у екваторијалном приказу елиптично-зашиљен. Кандидат наводи да је скулптура егзине, на основу анализираних орнаментике (бразда или мура) код све четири испитиване сорте стријатна. У пределу полова или око колпи гребени и бразде формирају петље или кривуље које су највише биле изражене код полена сорти Позна плава и Presenta. Изузев ширине поленовог зрна, остале испитиване морфолошке карактеристике полена су имале највеће вредности код сорте Позна плава. Код сорте Nanita су утврђене најмање вредности свих испитиваних морфолошких карактеристика поленовог зрна.

У трећем подпоглављу (*Динамика раста поленових цевчица in vivo*) представљени су резултати испитивања квантитативне ефикасности раста поленових цевчица у стубићу и плоднику, за сваку варијанту опрашивања кроз утврђивање просечног броја поленових цевчица и динамике раста поленових цевчица у одређеним регионима тучка. Утврђено је да је највећи просечан број поленових цевчица у горњој трећини стубића и у плоднику у све три године испитивања био у варијанти страноопрашивања сортом Nanita, док су се најниже вредности просечног броја поленових цевчица у анализираним регионима тучка добиле у варијанти самоопрашивања. Анализом динамике раста поленових цевчица кандидат наводи најбоље вредности у варијанти страноопрашивања док се као најслабија показала варијанта слободног опрашивања. Редослед сорти у варијанти страноопрашивања када

је у питању динамика раста поленових цевчица био је: Nanita, Presenta и Чачанска најбоља. У варијанти самоопрашивања за анализирану динамику раста поленових цевчица су се добиле незнатно слабије вредности у односу на варијанту страноопрашивања. Код варијанте слободног опрашивања само се у првој години констатовао продор поленове цевчице у нуцелус семеног заметка, док се у остале две године најдужа поленова цевчица уочавала у ткиву плодника. Кандидат наводи да није утврђена корелација између клијавости полена *in vitro* и просечног броја поленових цевчица у горњој трећини стубића. Утврђена је висока позитивна корелација између просечног броја поленових цевчица у горњој трећини стубића и броја истих продрлих у плодник. Такође, наводи се постојање јаке позитивне корелације између броја поленових цевчица продрлих у плодник и броја истих продрлих у нуцелус семеног заметка, десетог дана од почетка пуног цветања.

У подпоглављу *Заступљеност инкомпатибилних поленових цевчица у стубићу* наводи се присуство инкомпатибилних поленових цевчица у свим испитиваним варијантама опрашивања. У највећем броју случајева њихово присуство је било у горњој трећини стубића. У варијантама страноопрашивања сортама Чачанска најбоља и Nanita инкомпатибилне поленове цевчице су уочене и у другој трећини стубића. Присуство инкомпатибилних поленових цевчица код свих анализираних варијанти опрашивања било је у броју мањем од 5%, стога њихова заступљеност није имала утицаја на број оних које ће стићи до базе стубића.

У подпоглављу *Специфичан раст поленових цевчица у плоднику* наводи се да су у свим анализираним варијантама опрашивања у плоднику уочене поленове цевчице чији је раст одступао од уобичајеног. Подела специфичног раста поленових цевчица у плоднику је урађена на основу тога да ли је или није дошло до продора поленове цевчице у нуцелус семеног заметка. Поленове цевчице су имале карактеристичан специфичан раст у зависности од региона плодника у коме је примећен. Тако, у зони обтуратора поленове цевчице са специфичним растом су се мање или више гранале, док се у зони изнад микропиле и у микропили специфичан раст поленових цевчица одликовао формирањем мањег или већег клупка. Просечно за све три године највећи број инкомпатибилних поленових цевчица је утврђен у варијанти самоопрашивања (4,84%), док је најмањи број утврђен у варијантама страноопрашивања сортама Presenta и Nanita (1,10% и 1,25%). Изузев слободног опрашивања, код осталих варијанти опрашивања специфичан раст поленових цевчица, у семеним замецима где није дошло до продора поленове цевчице у нуцелус, процентуално је био заступљенији у зони обтуратора. Након продора поленове цевчице у нуцелус проценат поленових цевчица са специфичним растом је био заступљенији у зони микропиле.

У подпоглављу *Положај и морфолошки изглед примарног и секундарног семеног заметка у плоднику* најпре је представљена двогодишња анализа положаја и изгледа примарног и секундарног семеног заметка. Потом је описана структура ћелија које сачињавају интегументе, а онда су наведени типови ћелија које чине средишњи део семеног заметка – нуцелус.

У подпоглављу *Организација нормалне ембрионске кесице у примарном и секундарном семеном заметку* описан је ток процеса мегагаметогенезе и организација нормалне ембрионске кесице која се могла уочити у време пуног цветања. У ембрионској кесици су се могла разликовати јасно четири различита типа ћелија: јајна ћелија, синергиде, централна ћелија и антипode. При томе је описан распоред ћелија у ембрионској кесици. Хистолошка испитивања плодника су обављена на оба семена заметка код неопрашених цветова и цветова узетих из слободног опрашивања у двогодишњем периоду.

У подпоглављу *Функционални стадијуми ембрионове кесице примарних семених заметака* двогодишњом анализом цитолошке конфигурације ембрионове кесице, у варијанти слободног опрашивања, утврђено је да се она налази у петоједарном или четвороједарном стадијуму. Кандидат наводи да у 2008. години, осмог дана од опрашивања заступљеност ембрионових кесица са петоједарним стадијумом био је 12,50%. У 2010. години осмог дана од опрашивања, број ембрионових кесица са четвороједарним стадијумом износио је 25%.

У подпоглављу *Рани стадијум ембриогенезе* описани су уочени функционални стадијуми ембрионове кесице у којима је дошло до дегенерације једне или обе синергиде (троједарни стадијум), или је дошло до спајања поларних једара у централно (двоједарни стадијум) у варијанти слободног опрашивања. Троједарни стадијум је уочен већ четвртог дана од момента пуног цветања, и у обе године је износио 10%. Од четвртог дана од почетка пуног цветања па до осмог дана број ембрионових кесица са овим стадијумом је имао линеарни пораст (50% у првој и 37,50% у другој години). На основу функционалног стања ембрионове кесице, њеног морфолошког изгледа, шестог дана од момента пуног цветања, у 2010. години код код 10% испитаних узорака се могло говорити о раним постоплодним процесима. Кандидат наводи да се ембрионска кесица налазила у двоједарном стадијуму (дегенерисале синергиде, крупна јајна ћелија и поларна једра спојена у централно једро). Осмог и десетог дана од момента пуног цветања у обе године испитивања, број ембрионових кесица са оваквом цитолошком конфигурацијом је био приближно исти и износио је 12,50% и 10,00%. Само је у 2010. години код 10% анализираних узорака уочен рани стадијум ембриогенезе.

У подпоглављима *Појава дефектних примарних семених заметака* и *Појава дефектних секундарних семених заметака* описана је грађа дефектних примарних и секундарних семених заметака. У случају примарног семеног заметака те неправилности су се у првом реду односиле на структуру ембрионове кесице, док су се у случају секундарног односиле на дегенеративне процесе у ћелијама нуцелуса. Кандидат даље наводи да проценат дефектних примарних семених заметака растао у данима након пуног цветања. Њихова заступљеност утиче на број функционалних, што даље има директан утицај на број семених заметака које ће бити оплођени.

У подпоглављу *Виталност примарних семених заметака и функционални стадијуми ембрионове кесице* наведени су резултати коришћене две методе за испитивање дужине трајања виталности семених заметака код неопрашених цветова сорте Позна плава. Коришћеном флуоресцентом методом бојења са анилин плавим семени замечи су и десетог дана од почетка пуног цветања били 100% витални. Анализом функционалних стадијума се утврдило да ембрионове кесице у време пуног цветања се налазе у раној осмоједарној фази. У обе године испитивања утврђена је висока негативна корелација између дана након пуног цветања и испитиваних функционалних цитолошких стадијума ембрионове кесице (-0,96 и -0,93).

Подпоглавље *Неправилности у структури примарних семених заметака* описује појаву неправилности или дегенерације елемената ембрионове кесице и ћелија нуцелуса. У обе године испитивања неправилности су се, у највећем проценту као и у случају слободног опрашивања, односиле на појаву дегенерације елемената јајног апарата, почев од другог дана од почетка пуног цветања. Осмог дана од почетка пуног цветања, у обе године, уочен је максималан број семених заметака са дегенерацијом јајног апарата (88,89% у првој години и 77,78% у другој години испитивања). Већ десетог дана, у обе године, осим дегенерације јајног апарата, уочена је и почетна дегенерација ћелија нуцелуса. Утврђен је висок степен корелације између појаве

дегенерације елемената ембрионове кесице од дана испитивања, који је у првој години имао вредности од 0,71, а у другој од 0,82.

У подпоглављима *Виталност секундарних семених заметака и функционално стање ембрионове кесице и Неправилности у структури секундарних семених заметака* кандидат наводи слагање резултата испитивања виталности секундарних семених заметака добијених применом флуоресцентне методе и испитивања функционалних стадијума, у првих десет дана од почетка пуног цветања као и опис дегенеративних процеса који се дешавају у њима у данима након пуног цветања. Од четвртог дана у 2008. години и другог дана у 2010. години испитивања на основу цитолошке организације ембрионове кесице није се више могло говорити о постојању функционалних стадијума. Почев од другог дана од почетка пуног цветања, у обе године испитивања, растао је број семених заметака у којима је уочена дегенерација ћелија нуцелуса. Између дегенерације ћелија нуцелуса и дана након пуног цветања добиле су се високе вредности коефицијента корелације у рангу врло јаке повезаности. Добијени коефицијент корелације у 2008. години истраживања износио је 0,92, док је у 2010. години имао нешто ниже вредности од 0,90.

У подпоглављу *Иницијално и финално заметање плодова* се наводи да је оно у великој мери зависило од начина опрашивања. Највиши број иницијално заметнутих плодова у 2008. години испитивања добијен је у варијанти самоопрашивања, а финално заметнутих плодова у варијанти страноопрашивања сортом Чачанска најбоља. Код свих варијанти опрашивања у 2008. години испитивања број финално заметнутих плодова био је испод 10%. У 2010. и 2011. години истраживања, у варијанти страноопрашивања сортом Presenta као опрашивачем, добијен је највиши број иницијално (69,54% и 51,85%) и финално заметнутих плодова (41,45% и 30,92%). Најнижи број иницијално и финално заметнутих плодова, у обе године, добијен је у варијанти слободног опрашивања (12,28% и 5,14%; 0,79% и 2,83%).

Подпоглавље *Корелациона анализа између продора поленових цевчица у нуцелус семеног заметка, десетог дана од опрашивања, иницијалног и финалног заметања плодова* описује везу између продора поленових цевчица у нуцелус и иницијалног заметања која се кретала у рангу врло високе повезаности од 0,77, док је коефицијент детерминације износио 0,59. Веза између продора поленових цевчица у нуцелус и финалног заметања као и веза између иницијалног и финалног заметања се кретала у рангу средње повезаности (0,44 и 0,39), док је коефицијент детерминације за ове две анализирание зависности износио 0,20 и 0,18.

У подпоглављу *Температурна кретања у току трајања подфазе пуног цветања* кандидат је навео кретања температуре ваздуха првих десет дана од почетка пуног цветања у трогодишњем периоду. При томе износи да су најмање осцилације средњих дневних температура утврђене су у 2008. години и кретале су се од 10°C до 15,5°C. У 2010. години нултог и првог дана од почетка пуног цветања средње дневне температуре су износиле око 11°C. У наредних шест дана средње дневне температуре су биле између 14,45°C и 17,67°C, а после тога су биле опет око 11°C. Највеће температурне осцилације установљене су у 2011. години. После температура од 10°C и 16°C на почетку пуног цветања, наредна четири дана средње дневне температуре су имале вредности од 4,03°C до 8,2°C, да би након тога биле утврђене температуре од 11,35°C па све до 18,17°C.

Дискусија. У овом поглављу коментарисани су резултати истраживања ове докторске дисертације и упоређени са резултатима других аутора који су радили на истој или сличној проблематици. Дискусију добијених резултата, кандидат је приказао систематично, по истом редоследу којим су наведени и резултати истраживања. Кандидат је детаљно и добро дискутовао добијене резултате нагласивши да су они углавном у складу са већином доступних литературних података. У неколико наврата

кандидат је такође логично тумачио одступања добијених резултата од података у литературним изворима.

Закључак. Закључци су правилно изведени и у потпуности произилазе из добијених резултата. Спроведена испитивања су показала да сагледавање различитих цитоембриолошких аспеката оплођења сорте шљиве Позна плава има велики значај у решавању проблема заметања плодова, а самим тим и родности, које је ова сорта показала. Кандидат наводи да су резултати показали да је Позна плава самооплодна сорта, али да се далеко бољи резултати добијају у варијанти страноопрашивања. Изузетно слабо заметање плодова у варијанти слободног опрашивања показало је непостојање адекватног опрашивача у засаду са анализираним сортом. Кандидат истиче да ако се узму у обзир резултати испитивања функционалних стадијума ембрионске кесице ове сорте шљиве, као и резултати испитивања квантитативних показатеља раста поленових цевчица у тучку долази се до тога да ову сорту карактерише изузетно кратак ефективни период опрашивања. То намеће потребу правилног одабира два или три опрашивача који ће осим преклапања у времену пуног цветања са овом сортом имати и полен доброг квалитета. На крају докторант истиче да на основу добијених вредности испитиваних параметара раста поленових цевчица у тучку сорте шљиве Позна плава, сорте Nanita, Presenta и Чачанска најбоља се могу препоручити као добри опрашивачи за ову сорту шљиве, у анализираним агроеколошким условима Чачка.

Литература. У списку литературе је наведено 220 референци које су коришћене приликом писања дисертације. Избор референци је актуелан и одговара проучаваној проблематици. Референце су сложене по абecedном реду и написане правилно, у складу са прихваћеним стандардима за навођење литературе.

3. Закључак и предлог

Докторска дисертација мр Милене Ђорђевић, истраживача сарадника Института за воћарство у Чачку, под насловом: „**Цитоембриолошки аспекти оплођења сорте шљиве „Позна плава“ (*Prunus domestica* L.)**“, представља оригиналан научни рад из области Оплемењивања воћака и винове лозе. Дисертација је резултат успешно спроведеног самосталног експериментално-истраживачког научног рада кандидата, који је у сагласности са планом истраживања прихваћеним пријави дисертације. Код сорте шљиве Позна плава, у трогодишњем периоду, испитивано је више цитоембриолошких аспеката који су везани за динамику одвијања процеса оплођења, током првих десет дана од момента пуног цветања. Флуорохромним бојењем анализирана је виталност семених заметака као и квантитативни параметри раста поленових цевчица, у три варијанте опрашивања: слободно опрашивање, страноопрашивање и самоопрашивање. У варијанти страноопрашивања коришћен је полен сорти шљиве Nanita, Чачанска најбоља и Presenta. Клијавост полена коришћених опрашивача претходно је утврђена *in vitro* на агаро-сахарозној подлози, док су морфолошке особине полена анализирани помоћу скенирајућег електронског микроскопа. У испитиваним варијантама опрашивања анализирано је иницијално и финално заметање плодова. У двогодишњем периоду испитивано је функционално стање ембрионске кесице у првих десет дана од момента пуног цветања у две варијанте: слободно опрашивање и без опрашивања (контрола). У трогодишњем периоду, у пољским условима, испитиван је и утицај температуре, на интеракцију мушког гаметофита и женског спорофита.

Коришћене две методе испитивања виталности семених заметака показале су неподударње у случају примарног, док су се слагале код секундарног семеног заметка. У варијанти без опрашивања дегенеративне промене у примарном семеном заметку су

се у првом реду односиле на јајни апарат, док су у случају секундарног семеног заметка оне прво примећене у ћелијама нуцелуса. Током трогодишњег периода био је евидентан утицај температуре на ток прогамне фазе оплођења. У првој години су биле најоптималније температуре за раст поленових цевчица, у првих десет дана од почетка пуног цветања, док су у другој и трећој години утврђена већа температурна колебања, која су се директно одразила на испитиване параметре. Добијени резултати су јасно указали на неопходност правилног избора адекватног опрашивача за анализирану сорту шљиве. Поред тога што ова сорта има касно цветање, показало се да она у време пуног цветања садржи ембрионову кесицу која је у раној осмоједарној фази. На основу испитиваних репродуктивних карактеристика, анализиране сорте коришћене у варијанти страноопрашивања, се могу препоручити као добри опрашивачи за сорту шљиве Позна плава.

Научни допринос ове докторске дисертације огледа у томе што омогућава расветљавање проблема репродуктивне биологије шљиве, а са практичног становишта она даје препоруке за избор одговарајућих опрашивача при гајењу сорте Позна плава у производним засадима Србије.

Имајући у виду све изнето, Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију кандидата мр Милене Ђорђевић, под насловом: „**Цитоембриолошки аспекти оплођења сорте шљиве „Позна плава“ (*Prunus domestica* L.)**“ и предлаже Наставно-научном већу Пољопривредног факултета Универзитета у Београду да ову позитивну оцену усвоји и тиме омогући кандидату да пред истом Комисијом јавно брани докторску дисертацију.

У Београду, 29. 05. 2015.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

Др Драган Николић, редовни професор
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет

Др Драган Милатовић, ванредни професор
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет

Др Радосав Церовић, научни саветник
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки
факултет, Иновациони центар

Др Евица Мратинић, редовни професор
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет

Др Вера Ракоњац, редовни професор
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет

Прилог:

Рад кандидата мр Милене Ђорђевић објављен у часопису који је на SCI листи:

Ђорђевић М., Cerović R., Radičević S., Nikolić D. (2014): Incompatible pollen tubes in the plum style and their impact on fertilization success. *Genetika*, 46, 2: 411–418.