

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ ПОЉОПРИВРЕДНОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

Предмет: Извештај Комисије о оцени урађене докторске дисертације дипл. инж. Слађане Јанковић

Одлуком Наставно-научног већа Пољопривредног факултета Универзитета у Београду бр. 33/8-5.7. од 27.04.2016. године, именована је Комисија за оцену и одбрану урађене докторске дисертације дипл. инж. Слађане Јанковић под насловом: „**Морфогенеза и анатомско физиолошке карактеристике репродуктивних органа ораха (*Juglans regia L.*)**“.

Комисија у саставу: др Драган Милатовић, ванредни професор Пољопривредног факултета у Београду, др Драган Николић, редовни професор Пољопривредног факултета у Београду, др Никола Мићић, редовни професор Пољопривредног факултета у Бањалуци, др Милован Величковић, редовни професор Пољопривредног факултета у Београду и др Милица Фотирић Акшић, ванредни професор Пољопривредног факултета у Београду прегледала је и оценила докторску дисертацију и подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

1. Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација дипл. инж. Слађане Јанковић написана је на 230 страница формата А4, у оквиру којих се налазе 23 табеле, 30 графикана и 26 слика. 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 313 референци.

Дисертација се састоји из следећих поглавља: 1. Увод (стр. 1-4), 2. Циљ истраживања (стр. 5), 3. Преглед литературе (стр. 6-31), 4. Радна хипотеза (стр. 32), 5. Објекат, материјал и методе рада (стр. 33-44), 6. Агроеколошки услови (стр. 45-47), 7. Резултати истраживања (стр. 48-137), 8. Дискусија (стр. 138-200), 9. Закључак (стр. 201-208) и 10. Литература (стр. 209-233).

2. Приказ и анализа докторске дисертације

У **У в о д у** дисертације су наведени систематско место ораха, његов привредни значај, као и производња у свету и Србији. Приказан је хемијски састав језгре ораха и њена хранљива, дијетопрофилактичка и дијетотерапеутска вредност. Истакнути су и проблеми који се срећу у производњи, као што су екстензивна технологија гајења и застарео сортимент. Такође су наведени најзначајнији циљеви у оплемењивању ораха, то јест у стварању нових сорти.

Докторанд истиче значај истраживања из области репродуктивне биологије ораха. Као моноеична врста, код које су мушки и женски репродуктивни органи раздвојени у различитим цветовима на истом стаблу, орах се одликује сложеним полним процесом по чему се разликује од већине осталих врста воћака. Опрашивање се

врши ветром. Орах је аутофертилна врста, али се код већине генотипова период праћења полена не поклапа у потпуности са периодом рецептивности женских цветова, тако да је у комерцијалним засадима ораха поред главних сорти неопходно гајити и сорте опрашиваче. При избору сорти опрашивача потребно је познавање времена цветања мушких и женских цветова, као и функционалне способности полена.

У поглављу **Циљ истраживања** кандидат истиче да биологија репродуктивних органа ораха није довољно изучавана, тако да многа питања у вези сексуалне репродукције ове врсте још увек нису разјашњена. Детаљно упознавање процеса формирања мушких и женских репродуктивних органа ораха и њихових анатомских и физиолошких особина кроз призму генотипских специфичности има за циљ да употпуни знања из области репродуктивне биологије, да послужи као основа за примену нових метода и техника у оплемењивачком раду и да буде путоказ у избору адекватних сорти опрашивача у савременом плантажном гајењу ораха.

Поглавље **Преглед литературе** подељено је на четири подпоглавља.

У првом подпоглављу докторанд износи досадашња сазнања домаћих и страних истраживача која се односе на морфолошке карактеристике родних граница ораха (**Булатовић**, 1985; **Мићић** и сар., 1987; **Apostolova**, 2008). Анализирани су радови који се односе на типове гранања и рађања ораха (**Germain**, 1990, 1992; **Solar** и **Štampar**, 2003; **Kelc** et al., 2010; **Dzhuvinov** и **Gandev**, 2014), као и на број и распоред мешовитих пупољака и реса на границима (**Polito**, 1998; **Germain**, 1990; **Mert**, 2010)

У другом подпоглављу је дата анализа радова који се односе на морфолошке карактеристике женских репродуктивних органа ораха. Анализирани су радови који се односе на грађу мешовитих пупољака (**Мићић** и сар., 1987; **Sabatier** и **Barthélémy**, 2001), грађу женских цветова (**Germain et al.**, 1975; **Polito**, 1998; **Spichiger et al.**, 2004; **Janković**, 2002), морфометрију женских цветова и семених заметака (**Hickey** и **King**, 1981; **Pollegioni et al.**, 2013), морфогенезу женских цветова (**Polito** и **Li**, 1985; **Цуркан** и **Пынтя**, 1987; **Јанковић** и сар., 2007; **Gao et al.**, 2012), макроспорогенезу и макрогаметогенезу (**Литвак** и **Пынтя**, 1987; **Sartorius** и **Stösser**, 1997; **Janković**, 2002).

У трећем подпоглављу је дат преглед радова који се односе на морфолошке карактеристике мушких репродуктивних органа ораха. Анализирани су радови који се односе на грађу реса (**Germain et al.**, 1975; **Мићић** и сар., 1987; **Molina et al.**, 1996), грађу мушких цветова (**Polito**, 1998; **Krueger**, 2000), морфометрију реса и антера (**Hickey** и **King**, 1981; **Molina et al.**, 1996; **Mert**, 2010), морфогенезу реса и мушких цветова (**Цуркан** и **Пынтя**, 1987; **Luza** и **Polito**, 1988; **Барна** и **Мацюк**, 2011), формирање микрогаметофита (**Luza** и **Polito**, 1988; **Radicati di Brozolo et al.**, 1990), грађу и морфометрију поленових зрна (**Evrenosoğlu** и **Misirli**, 2009; **Mert**, 2010).

Четврто подпоглавље обухвата преглед радова о клијавости полена ораха. Наведени су радови који се односе на утицај различитих састојака хранљиве подлоге, као што су: агар, сахароза, борна киселина и калцијум хлорид (**Luza** и **Polito**, 1985; **Parihar** и **Vajpai**, 1992; **Wu et al.**, 2008). Анализирани су и радови у којима се испитује утицај температуре на клијавост полена (**Luza et al.**, 1987; **Wu et al.**, 2008; **Mert**, 2009). Такође су наведени и радови који се односе на утицај времена и начина чувања на клијавост полена (**Griggs et al.**, 1971; **Церовић** и сар., 1992; **Polito**, 1998).

У поглављу **Радна хипотеза** докторанд истиче да се обични орах услед дуготрајне еволуције у различитим еколошким условима, одликује високим степеном генетичке разноликости. Због тога су реална очекивања да у слободној популацији ораха, као и у оквиру издвојених сорти и селекција, потоје генотипови са дивергентним карактеристикама мушких и женских репродуктивних органа.

У реализацији ових истраживања пошло се од претпоставке да ће праћење процеса морфогенезе мушких и женских репродуктивних органа ораха омогућити

прецизно дефинисање развојних фаза и динамике овог процеса, као и да између одговарајућих фаза постоји физиолошка и фенолошка повезаност. При испитивању морфолошких и физиолошких особина репродуктивних органа и процеса њиховог формирања, испољиће се разлике које су последица генотипских специфичности. На основу резултата испитивања биће могуће дефинисати односе и законитости које превазилазе ниво појединачног случаја, односно генотипа и важе као модел за читаву врсту *Juglans regia* L.

Као резултат ових истраживања добиће се одговори на различита актуелна питања, међу којима су: 1) оптимизација састава хранљиве подлоге за испитивање клијавости полена ораха; 2) дефинисање могућности и услова за очување функционалне способности полена применљивих у широкој пракси; 3) процена поузданости метода за испитивање функционалне способности полена; 4) процена производне вредности испитиваних сорти у одређеним еколошким условима; 5) утврђивање степена корелације између видљивих манифестација карактеристичних фаза и микрофаза развика репродуктивних органа са процесима микро и макроспорогенезе, као и микро и макрогаметогенезе, у циљу израде практичног и лако применљивог модела за праћење суптилних процеса унутар полена и семеног заметка.

У поглављу **Објект, материјал и методе рада** наведени су локација и карактеристике засада у коме је вршено истраживање, приказ коришћеног материјала, начин постављања и извођења пољских и лабораторијских огледа, као и примена статистичких метода у обради података.

Испитивања су обављена у засаду ораха који се налази у селу Лазац, између Краљева и Чачка, на обронцима планине Јелице на надморској висини од 460 m. Засад је подигнут 1992. године, са размаком садње 10 × 10 m.

Као материјал за истраживања послужило је шест генотипова ораха: пет сорти (Шампион, Шејново, Гајзенхајмски 139, Гајзенхајмски 251 и Елит) и један спонтани сејанац, који је у огледима вођен под ознаком М1. Свака од сорти је била заступљена са по пет стабала, док је генотип М1 представљао јединствени примерак.

Истраживања су обављена током три године (2010–2012) и била су конципирана кроз следеће целине: морфолошке карактеристике једногодишњих гранчица, морфолошке карактеристике женских репродуктивних органа, морфолошке карактеристике мушких репродуктивних органа и клијавост полена.

Истраживања морфолошких карактеристика једногодишњих гранчица вршена су у виду четворофакторијалног огледа са следећим факторима: сорта, година, дужина и тип гранчица. Из различитих делова крошње сваког од испитиваних генотипова узимано је по 30 једногодишњих гранчица развијених из вегетативних пупољака (обичних летораста) и исти број гранчица формираних из мешовитих пупољака (плодоносних прираста). У оквиру сваког од наведених типова гранчица формирана су на основу њихове дужине по три подскупа са по десет гранчица: 1) гранчице краће од 6 cm, 2) гранчице дужине 8-18 cm и 3) гранчице дуже од 20 cm. Анализа морфолошких карактеристика гранчица обухватала је испитивање следећих параметара: дужине гранчице (лењиром); дебљине гранчице (помичним кљунастим мерилом); индекса издужености гранчице (однос дужине гранчице и дебљине гранчице); броја нодуса на гранчици; броја реса, вегетативних и мешовитих пупољака на првом, другом и трећем нодусу, затим на целој гранчици и по једном нодусу. Одређивање врсте пупољака вршено је отварањем и анализом пупољака под бинокуларном лупом при повећању 10-60 пута. Пупољци у којима је утврђено присуство најмање једног зачетка женског цвета сматрани су мешовитим пупољцима.

После отварања и анализе свих пупољака који се налазе на гранчицама, све једногодишње гранчице класификоване су у четири категорије: 1) вегетативне гранчице

(без генеративних пупољака); 2) мушке гранчице (садрже само ресе или ресе и вегетативне пупољке); 3) женске родне гранчице (на себи имају само женске пупољке или женске и вегетативне пупољке); 4) комбиноване родне гранчице (садрже женске пупољке и ресе у комбинацији са вегетативним пупољцима или без њих) (Мићић и сар., 1987). Испитиван је удео наведених категорија гранчица у узорку једногодишњег дрвета у зависности од генотипа, дужине и типа гранчице (обични летораст и плоносни прирасти).

Морфолошке карактеристике женских репродуктивних органа. Морфолошке карактеристике мешовитих пупољака и женских цветова испитиване су посматрањем свежег материјала под стереоскопским микроскопом STM-9 Pro (Nanjing Microtech Scientific Instrument Co., Jiangsu, China) при повећању 10-60 пута. Фотографисање свежих узорака извршено је дигиталном камером Canon EOS 700D (Canon Inc., Tokyo, Japan), која је била постављена одговарајућим адаптером на окулар стереоскопског микроскопа. Део узорака коришћен је за израду трајних хистолошких препарата, који су касније посматрани под светлосним микроскопом BIM 312T (Nanjing Microtech Scientific Instrument Co., Jiangsu, China) при повећању 100-1000 пута.

За израду трајних хистолошких препарата коришћена је парафинска метода. Читав поступак обављен је у ткивном процесору Leica TP 1020 (Leica Microsystems, Nussloch, Germany), у лабораторији Пољопривредног факултета у Земуну у укупном трајању од 11 дана. Инклузија узорака у парафин (тачке топљења 50-54°C) вршена је у више фаза (у ксилол-парафину 24 часа, у чистом парафину 24 часа и у парафин-воску 48 часова), у парафинском диспанзеру са топлотом плочом Leica EG 1120 и хладном плочом Leica EG 1130. Укалупљени препарати сечени су микротомом Leica SM 2000 R (Leica Microsystems, Nussloch, Germany), на листиће дебљине 5 μm . Након депарафинисања одабраних пресека, вршено је њихово бојење алциан плавим и сафранином у центру за бојење Leica ST 4040, затим инклузија у канада балзам и прекривање покровним стаклом.

Величина женских цветова и семених заметака (дужина и ширина) одређивана је помоћу окулар са микрометарском скалом. Баждарење окулар извршено је помоћу микрометарског препарата са најмањим подеком од 10 μm . Дужина женских цветова мерена је од основе цвета до највише тачке жигова. Ширина женских цветова, као и ширина семених заметака мерена је у медијалној равни (у којој се налазе карпеле).

Морфолошке карактеристике мушких репродуктивних органа. Морфолошке карактеристике реса и мушких цветова испитиване су посматрањем свежег материјала под стереоскопским микроскопом при повећању 10-60 пута. У циљу анатомске анализе мушких репродуктивних органа и формирања мушког гаметофита, део узорака коришћен је за израду трајних хистолошких препарата применом парафинске методе. Они су касније посматрани под светлосним микроскопом при повећању 100-1000 пута. Величина антера (дужина, ширина и дебљина) одређивана је помоћу окулар са микрометарском скалом. Димензије реса (дужина и ширина) одређиване су на милиметарском папиру. Ресе су узимане са нодуса у средишњем делу гранчице.

Број цветова по реси одређиван је као просечна вредност 30 реса по генотипу. Број прашника по мушком цвету одређиван је као просечна вредност из три цвета на средини ресе, са десет реса по генотипу.

Одређивање димензија хидратисаног полена обављено је помоћу светлосног микроскопа на 30 случајно одабраних поленових зрна. Припрема хидратисаног полена за микроскопирање вршена је тако што је на кап воде, постављеној на предметно стакло, присут полен фином четкицом, а затим је она покривена покровном љуспицом и остављена два часа на собној температури. Узорак са поленом је посматран под

светлосним микроскопом при повећању 400 пута а мерења су вршена помоћу окулар са микрометарском скалом.

Морфометријска испитивања нехидратисаног полена обављена су помоћу скенирајућег електронског микроскопа JEOL JSM-6390LV (JEOL, Токуо, Јапан), при напону од 15 kV. Мала количина полена наношена је помоћу fine четкице на двострану транспарентну траку, монтирану на носач објекта микроскопа. За напаравање узорака полена слојем злата (0,02 μm) коришћен је „sputter-coater” BAL-TEC SCD 005 (Carovani Brothers Inc., Scotia, NY, USA). Испитивани су поларност, симетрија, облик поленовог зрна (поларни и екваторијални поглед), величина поленовог зрна (дужина, ширина, однос дужина/ширина), апертурација (број, облик, дужина и ширина отвора), као и орнаментација егзине (величина и међусобна удаљеност апертуре и орнаментација). Цела поленова зрна фотографисана су и анализирана при увећању 400 пута и 2000 пута, а карактеристике егзине при повећању 15.000 пута. Код сваког генотипа анализирано је по 30 поленових зрна.

Клијавост полена испитивана је методом наклијавања *in vitro* на хранљивој подлози са сахарозом и агаром. Одређивање броја клијалих и неклијалих поленових зрна вршено је под светлосним микроскопом при увећању 100 пута. Полен је сматран клијалим ако је дужина поленове цевчице била већа од пречника поленовог зрна. По свакој Петри посуди посматрано је 15 случајно одабраних видних поља. Свако видно поље садржало је просечно 20-50 поленових зрна и сматрано је једним понављањем. По једној Петри посуди посматрано је око 400-600 поленових зрна.

У пролеће 2010. спроведен је прелиминарни оглед у којем је испитивана клијавост полена сорте Шејново на подлози са 0,6% агара. Подлоге су садржавале различите концентрације сахарозе (10, 15, 20 и 25%), борне киселине (0, 200, 400 и 600 ppm) и калцијум хлорида (0, 20 и 40 ppm). Наклијавање полена вршено је на 48 различитих подлога. На основу резултата који су добијени у овом огледу, у току 2011. и 2012. године изведен је петофакторијални оглед у којем је за наклијавање коришћен полен четири сорте (Шејново, Шампион, Г-251 и Елит) који је засејаван је на 54 различите хранљиве подлоге, које су добијене комбиновањем три концентрације агара (0,6, 0,8 и 1%), три концентрације сахарозе (10, 15 и 20%), три концентрације борне киселине (0, 200 и 400 ppm) и две концентрације калцијум хлорида (0 и 50 ppm).

Испитивање утицаја састава хранљиве подлоге на дужину поленових цевчица вршено је у 2012. години на полену сорте Г-251. Дужина поленових цевчица мерена је помоћу окулар са микрометарском скалом. По једној Петри посуди мерење је обављено на 30 случајно одабраних поленових зрна. Полен је засејаван на 36 различитих хранљивих подлога, које су добијене комбиновањем две концентрације агара (0,6 и 1%), три концентрације сахарозе (10, 15 и 20%), три концентрације борне киселине (0, 200 и 400 ppm) и две концентрације калцијум хлорида (0 и 50 ppm).

Испитивање утицаја температуре на клијање полена *in vitro* обављено је у току 2012. и 2013. године. У огледима је коришћен полен сорти Шејново, Шампион, Г-139, Г-251 и Елит. Наклијавање полена вршено је на подлози која је садржала: 0,6% агара, 15% сахарозе, 400 ppm борне киселине и 50 ppm калцијум хлорида. Инкубација полена спровођена је на температурама: $12\pm 1^\circ\text{C}$, $17\pm 1^\circ\text{C}$, $22\pm 1^\circ\text{C}$, $27\pm 1^\circ\text{C}$ и $32\pm 1^\circ\text{C}$.

Испитивање утицаја времена и услова чувања на клијавост полена је обављено у току 2011. и 2012. године са поленом сорти Шампион, Шејново, Г-139, Г-251 и Елит. Полен наведених сорти чуван је на три температуре (4, 20 и -18°C). Чување полена на 4 и 20°C вршено је у обичним условима влажности ваздуха, док је чување полена на -18°C вршено у херметички затвореним посудама изнад засићеног раствора калцијум хлорида (Luza и Polito, 1985). Један дан пре планираног посматрања под микроскопом,

Петри посуде су из коморе за замрзавање пренесене у фрижидер на 4°C, ради одмрзавања, као што су то описали **Hedhly et al.** (2005).

Испитивање клијавости полена чуваног на 4 и 20°C вршено је после 1, 2, 4, 12 и 36 дана чувања, а клијавост полена чуваног на -18°C испитивана је после 36 и 365 дана чувања. Добијени резултати упоређивани су са клијавошћу свежег полена, која је испитивана два часа по узимању узорака. При наклијавању полена примењена су два третмана: (1) без претходне рехидратације; (2) уз претходну хидратацију у атмосфери zasiћеног ваздуха воденом паром у трајању три часа на температури 20°C. Испитивање клијавости обављено је на подлози следећег састава: 0,6% агара, 15% сахарозе, 400 ppm борне киселине и 50 ppm калцијум хлорида.

Статистичка обрада података. Анализа добијених резултата вршена је применом Фишеровог модела анализе варијансе. У случајевима појаве статистичке значајности F показатеља код неког од фактора, вршено је тестирање значајности разлика између средњих вредности испитиваних параметара помоћу Такијевог теста за праг значајности $P < 0,05$. Испитивани параметри представљени су као просечне вредности $\pm SE$ (вредност стандардне грешке).

Повезаност и природа веза између појединих испитиваних параметара испитивана је регресионо-корелационом анализом, а јачина ових веза Пирсоновим коефицијентом корелације (r). Интерпретација вредности коефицијента корелације извршена је на следећи начин: $0,00 < |r| \leq 0,50$ - слаба зависност; $0,50 < |r| \leq 0,75$ - средња зависност; $0,75 < |r| \leq 0,90$ - јака зависност; $0,90 < |r| \leq 1,00$ - врло јака зависност (**Станковић** и сар., 2002). За статистичку обраду података коришћен је софтверски пакет XLSTAT 2014 (Addinsoft, USA).

У поглављу **Агроколошки услови** приказани су основни климатски параметри за Краљево (средње месечне температуре и количине падавина) за време трајања огледа (2010-2012. године), као и за период од 30 година (1981-2010). У току 2010. године средње месечне температуре нису битно одступале од вишегодишњег просека, док је укупна сума падавина у току године, као и у периоду од априла до октобра, била већа за више од 60 mm. У 2011. години средња годишња температура је била једнака тридесетогодишњем просеку, али је средња месечна температура за јул била већа за 2,5°C, а за август за 4°C. Количина падавина у овој години износила је 512 mm и била је нижа за 228 mm од вишегодишњег просека. Дефицит влаге био је нарочито изражен у периоду јул-септембар. У 2012. години средња годишња температура била је већа за 1°C од тридесетогодишњег просека, док су у летњим месецима средње месечне температуре биле веће за 3,3-4,1°C. Количина падавина у овој години износила је 597 mm и била је за 143 mm мања од просечних вредности. Велики дефицит влаге наступио је у току лета, при чему је сума падавина за август и септембар износила свега 7,7 mm. Ниске температуре у току зиме и пролећа нису изазвале оштећења дрвета и родних пупољака ораха ни у једној години истраживања.

Земљиште у огледном засаду је било средње киселе реакције, средњег садржаја хумуса и укупног приступачног азота и високог садржаја приступачног калијума. Садржај приступачног фосфора био је висок на дубини 0-30 cm, а низак на дубини 30-60 cm. Садржај приступачног калцијума био је средњи, а приступачног магнезијума висок. Односи и количине ова два елемента били су повољни за исхрану ораха.

Поглавље **Резултати истраживања** се састоји од четири подпоглавља: Морфолошке карактеристике родних гранчица, Морфолошке карактеристике женских репродуктивних органа, Морфолошке карактеристике мушких репродуктивних органа и Клијавост полена.

Прво подпоглавље **Морфолошке карактеристике родних гранчица** обухвата резултате проучавања: дебљине гранчица, броја нодуса, броја и распореда мешовитих

пупољака, броја и распореда реса, броја и распореда вегетативних пупољака, као и заступљености вегетативних и различитих категорија генеративних прираста у структури једногодишњих гранчица.

Просечна дебљина гранчица износила је 8,41 mm, а по сортама је варијала од 7,85 mm (Шампион) до 9,01 mm (Елит). Врло високо значајан утицај на дебљину гранчица испољили су генотип, дужина гранчице и тип гранчице, а значајан утицај имала је година.

Највећи просечан број нодуса по гранчици утврђен је код сорте Елит (9,50), а најмањи код сорте Шампион (7,76). Дуже гранчице нису имале пропорционално већи број нодуса, што значи да дужина гранчица више зависи од дужине интернодија него од броја интернодија.

Просечан број мешовитих пупољака на гранчицама износио је 1,56. Најмањи број мешовитих пупољака утврђен је на гранчицама сорте Шампион (0,95), а највећи на гранчицама генотипова Г-139 (2,03) и М1 (1,96). Највећи удео мешовитих пупољака утврђен је на вршном нодусу (0,88), док се према основи гранчице он нагло смањивао.

Код плодноносних прираста на првом нодусу утврђен је мањи удео мешовитих пупољака него код летораста, а на другом и трећем нодусу просечан број мешовитих пупољака на плодноносним прирастима био је вишеструко већи у односу на леторасте. Претпоставка је да женски цветови или млади плодови делују инхибиторно на индукцију женских цвасти у пупољцима који су им најближи. На дужим гранчицама утврђен је већи број мешовитих пупољака него на краћим гранчицама. Укупан број мешовитих пупољака, као и број латералних мешовитих пупољака био је већи на плодноносним прирастима него на леторастима.

Просечан број реса по гранчици износио је 4,05. Највећи број реса по гранчици имала је сорта Шампион (5,61), а најмањи сорта Елит (2,96). Код свих генотипова ресе су биле претежно диференциране на нодусима који су се налазили ближе основи младара. Између броја реса и вегетативне снаге раста гранчица утврђена је негативна корелација. Присуство женских цветова на првом нодусу негативно је утицало на диференцијацију реса, не само на том и суседном нодусу, већ и на читавој гранчици.

Код сорте Елит утврђен је највећи број вегетативних пупољака по гранчици (7,34), док је код сорти Шејново, Г-251 и Шампион он био мањи од два. Код дужих гранчица утврђен је већи просечан број вегетативних пупољака по нодусу него код краћих. Просечан број вегетативних пупољака био је мањи на терминалном положају него на субтерминалном.

Женске и комбиноване гранчице представљају родне гранчице ораха јер се на њима формирају плодови. Укупан просечан удео родних гранчица у структури једногодишњег дрвета износио је 86,5%. Највећи број родних гранчица утврђен је код сејанца М1 (93,3%), сорте Елит (92,2%) и сорте Г-139 (91,1%), а најмањи код сорте Шампион (74,4%). Утврђена је позитивна корелација између броја родних гранчица и дужине гранчице, дебљине гранчице и броја нодуса на гранчици. Међу леторастима удео родних гранчица био је већи него код плодноносних прираста.

Друго подпоглавље *Морфолошке карактеристике женских репродуктивних органа* обухвата испитивања грађе мешовитих пупољака, грађе женских цветова, морфометрије женских цветова и семених заметака, морфогенезе женских цветова, макроспорогенезе и макрогаметогенезе.

На сегментираној осовини мешовитог пупољка налазе се примордије различитих категорија листова, у чијим пазусима могу бити диференциране вегетативне купе, а на врху осовине пупољка издиференцирана је цваст са једним или више женских цветова. Укупан просечан број лисних примордија на осовини мешовитог пупољка у трогодишњем периоду испитивања износио је 18,1. На број женских цветова у

мешовитим пупољцима утицали су положај пупољка на гранчици, генотип, година, дужина гранчице и тип гранчице. Број цветова у женским цвастима представља генотипску специфичност која је важна компонента родног потенцијала неке сорте. Код испитиваних сорти он је варирао од 1,9 (Шампион и Елит) до 2,7 (сејанац М1).

Женски цвет ораха је апеталан, са потцветним синкарпним тучком, који је изграђен од две карпеле. Обавијен је инволукромом у чији састав улазе чашични листићи, брактеја и две брактеоле. У плодниковој шупљини налази се један седећи, ортотропан, унитегмичан, красинуцелатан семени заметак.

Просечна дужина женских цветова износила је 9 mm. Највећа просечна дужина женских цветова утврђена је код сорте Елит (10,1 mm), а најмања код спонтаног сејанца М1 (8,0 mm). На дужину женских цветова врло високо значајан утицај имали су година и генотип. Укупна просечна ширина женских цветова била је 3,6 mm. Разлике између генотипова у погледу ширине женских цветова нису биле значајне. Просечна дужина, као и ширина, семених заметака износила је 0,55 mm. На дужину семених заметака година и генотип нису испољили значајан утицај, док је ширина семених заметака врло високо значајно зависила од генотипа.

Код свих испитиваних генотипова процес морфогенезе женског цвета одвијао се сукцесивно и истим редоследом, што омогућава да буде представљен општим моделом који се састоји од следећих фаза: 1) иницијација зачетка дршке женске цвасти; 2) иницијација и раст зачетака женских цветова; 3) иницијација инволукрома; 4) иницијација примордија чашичних листића; 5) иницијација и раст карпела; 6) иницијација и раст семеног заметка; 7) почетак цветања; 8) пуно цветање; 9) завршетак цветања. Иницијација женских цветова ораха код генотипова са ранијим листањем дешава се просечно у трећој декади јуна, а код сорти са каснијим листањем у току прве и друге декаде јула. Код протандричних сорти на крају вегетационог периода зачеци женских цветова имају инициран само инволукрум, док су код хомогамних или протогиничних генотипова на зачецима женских цветова присутне примордије чашичних листића.

У оквиру процеса макроспорогенезе и макрогаметогенезе ораха могу се дефинисати следеће карактеристичне фазе: 1) диференцијација и раст археспоријалних ћелија; 2) мејоза материнске ћелије макроспоре и формирање тетрада; 3) двоједарни стадијум ембрионове кесице; 4) четвороједарни стадијум ембрионове кесице; 5) осмоједарни стадијум ембрионове кесице; 6) цитолошко организовање ембрионове кесице до њене зрелости за оплођење. У процесу макрогаметогенезе код ораха формира се моноспорна, биполарна, осмоједарна ембрионова кесица *Polygonum* типа. Између микрофенофаза у развоју семеног заметка и карактеристичних стадијума у процесима макроспорогенезе и макрогаметогенезе утврђен је висок степен подударности, што омогућава да се процеси у ембрионовој кесици могу пратити на основу морфолошких промена на семеном заметку.

Најраније су почињали да цветају женски цветови сејанца М1 (18. априла), а затим цветови сорти Шејново (23. априла), Шампион и Г-139 (27. априла), Г-251 (29. априла) и Елит (7. маја). Временски размак између почетка цветања женских цветова најранијег и најкаснијег генотипа износио је 19 дана. Цветање женских цветова трајало је најдуже код сејанца М1 (19 дана), а најкраће код сорте Елит (13 дана).

У оквиру трећег подпоглавља **Морфолошке карактеристике мушких репродуктивних органа** приказани су резултати проучавања грађе реса, грађе мушких цветова, морфометрије реса и антера, морфогенезе реса и мушких цветова, формирања макрогаметофита, као и грађе и морфометрије поленових зрна.

Мушка цваст ораха (реса) састоји се из осовине цвасти, на којој су у спиралном распореду поређани мушки цветови. Просечна дужина реса у време пуцања антера

износила је 120 mm, а ширина 14,7 mm. Сорте са ранијим ресањем имале су краће ресе од сорти са каснијим ресањем.

Мушки цветови ораха су ситни, неугледни, без круничних листића, са четири зелена чашична листића који граде перијант. Са спољашње стране перијанта налазе се две маљаве брактеоле и једна брактеја, а са унутрашње стране перијанта густо су распоређени прашници. Прашници имају врло кратке филаменте (1-2 mm), тако да антере изгледају као да су директно причвршћене за цвет.

Ресе су садржале просечно 120 цветова. Највећи број цветова по реси имали су сејанац М1 и сорта Елит (приближно 139), док је најмањи број цветова по реси утврђен код сорте Шејново (100,8). Просечан број прашника у мушким цветовима износио је 18,8. Највећи просечан број прашника по цвету утврђен је код сорти Г-139 (19,8) и Г-251 (19,6), а најмањи код сејанца М1 (17). Од основе ресе према њеном врху смањивао се број прашника у цветовима. На број прашника у цвету врло високо значајан утицај имали су генотип и година.

Просечне димензије антера износиле су: дужина 2,31 mm, ширина 0,96 mm и дебљина 0,75 mm. Највећу просечну дужину антера имала је сорта Елит (2,53 mm), а најмању сорта Шампион (2,10 mm). Поред генотипа, на димензије антера врло високо значајан утицај испољила је и година. Између дужине антера и дужине реса утврђена је јака позитивна корелација. Сорте каснијег ресања имале су дуже антере.

Почетак и динамика морфогенезе мушких цветова ораха условљена је генотипом и климатским условима. Време почетка листања је у јачој корелацији са временом почетка диференцијације мушких цветова него са почетком диференцијације женских цветова. У каснијим фазама диференцијације мушких цветова тип дихогамије испољава јачи утицај на динамику овог процеса у односу на време листања.

Захваљујући постојању корелације између морфолошких промена на мушким репродуктивним органима и хистогенетских процеса у спорогеним ткивима антера, могуће је дефинисати модел за олакшано праћење процеса микроспорогенезе и микрогаметогенезе ораха посматрањем фенолошких промена на мушким цветовима.

Динамика процеса микроспорогенезе и формирања микрогаметофита зависи од типа дихогамије. Код протандричних сорти раног листања диференцијација спорогеног ткива почиње у јуну, док је присуство спорогеног ткива у поленовим кесицама протогиничних сорти, чак и код генотипова раног кретања вегетације, утврђено тек у марту. Прецизно дефинисање времена мејозе у ресама ораха отежано је због сукцесивног развоја мушких цветова од основе ресе према њеном врху. Истовремено док се у најнижим цветовима ресе формирају тетраде, у њеним вршним цветовима најчешће је још присутно спорогено ткиво.

У процесу формирања микрогаметофита ораха могуће је дефинисати следеће развојне периоде: 1. период тетрада; 2. период ослобађања микроспора из тетрада; 3. превакуоларни период; 4. рани вакуоларни период; 5. средњи вакуоларни период; 6. позни вакуоларни период; 7. рани период сазревања поленовог зрна; 8. позни период сазревања поленовог зрна.

Међу проучаваним генотиповима најранијим почетком листања одликује се сејанац М1 (просечно 6. априла), а затим следе сорте Шејново, Шампион, Г-139, Г-251 и Елит. Ресе почињу да праше најпре код сорте Шејново (просечно 15. априла), затим код сорте Шампион (17. априла), сејанца М1 (27. априла), сорте Г-139 (2. маја), Г-251 (7. маја), а најкасније код сорте Елит (11. маја). Прашење реса траје најдуже код сорте Шејново и спонтаног сејанца М1 (12 дана), а најкраће код сорте Г-251 (осам дана). Сорте Шампион и Шејново су протандричне, док су сорте Г-139, Г-251 и сејанац М1 протогинични. Сорта Елит је најчешће протогинична, али у појединим годинама нагиње хомогамији.

На основу распореда пора, поленова зрна ораха су полипоратна, хетерополарна. Растојање између пора износило је око 16 μm и није зависило од генотипа. Површина егзине је микроехинатна. Хидратисани полен ораха је облатносфероидног облика, док је делимично дехидратисан полен угнут на проксималном полу. Дужина поленових зрна, у зависности од генотипа, износила је 40,5-44,5 μm , док је ширина полена имала вредности 44,1-48,3 μm . На морфометријске особине полена, генотип је испољио значајан утицај, док утицаји године и интеракције година \times генотип, нису били значајни. То значи да се наведене морфометријске особине полена могу користити за детерминисање сорти ораха.

Четврто подпоглавље *Клијавост полена* приказује резултате испитивања утицаја састава хранљиве подлоге, температуре, времена и услова складиштења на клијавост полена ораха.

Клијавост полена, зависила је од генотипа и садржаја агара, сахарозе, борне киселине и калцијум хлорида у хранљивој подлози. Просечна клијавост полена сорте Шампион износила је 15,9%, Елита 15,6%, Шејнова 13,7% и Г-251 6,6%. Највећа просечна клијавост полена остварена је на хранљивој подлози која је садржала 0,6-0,8%, агара, 15% сахарозе, 400 ppm борне киселине и 50 ppm калцијум хлорида. Интеракције између наведених фактора такође су испољиле значајан утицај на клијавост полена, из чега произилази закључак да је приликом испитивања клијавости полена неке сорте потребно претходно одредити оптималан састав хранљиве подлоге. Састав хранљиве подлоге утицао је значајно и на дужину поленових цевчица.

Клијавост полена испитиваних сорти ораха значајно је зависила од температуре. Оптимална температура за клијање полена сорти Шејново и Шампион износила је $22\pm 1^\circ\text{C}$, а сорти Г-139, Г-251 и Елит $27\pm 1^\circ\text{C}$. Код сорти које касно ресају оптимална температура за клијање полена је била виша у односу на сорте ранијег ресања.

Генотип, температура, време чувања полена и стање хидратисаности полена пре наклијавања имали су значајан утицај на његову клијавост. Повећање температуре и времена складиштења полена утицало је негативно на клијавост полена. Контролисана хидратација полена пре наклијавања имала је позитиван ефекат на клијавост полена. Од свих варијанти огледа, клијавост полена се најбоље одржала када је његово чување обављено на температури -18°C , у херметички затвореним судовима у којима се налазио засићени раствор калцијум хлорида, уз рехидратисање пре наклијавања.

У поглављу *Дискусија* 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.

У *Закључку* докторанд сумира резултате трогодишњих испитивања морфолошко-анатомских карактеристика и морфогенезе мушких и женских репродуктивних органа код шест генотипова ораха.

Кандидат закључује да су између испитиваних генотипова ораха утврђене значајне разлике у погледу морфолошких карактеристика родних гранчица, као што су дебљина гранчица, број нодуса, број и распоред мешовитих пупољака, реса и вегетативних пупољака, као и заступљеност вегетативних и генеративних прираста у структури једногодишњих гранчица. Просечан број мешовитих пупољака на гранчицама варирао је од 0,95 код сорте Шампион до 2,03 код сорте Г-139. Највећи удео мешовитих пупољака утврђен је на вршном нодусу, док се према основи гранчице

он нагло смањивао. Према заступљености бочних мешовитих пупољака на родним границима, спонтани сејанац М1 и сорта Г-139 припадају прелазном типу рађања, док се остале сорте одликују терминалним типом рађања. Најмањи просечан број реса по граници имала је сорта Елит (2,96), а највећи сорта Шампион (5,61). Код свих генотипова ресе су се претежно формирале на нодусима који су се налазили ближе основи младара. Највећи број реса по граници и по нодусу имале су изразито протандричне сорте, док је код протогиничних генотипова овај број био знатно мањи. Најмањи просечан удео родних граници у структури једногодишњег дрвета имала је сорта Шампион (74,4%), а највећи сејанац М1 (93,3%). За производну праксу је важно да њихов удео у структури једногодишњег дрвета буде што већи.

Докторанд истиче генотипске специфичности у погледу морфолошких карактеристика женских репродуктивних органа, морфогенезе женских цветова, макроспорогенезе и макрогаметогенезе. Број женских цветова у мешовитим пупољцима је био најмањи код сорти Шампион и Елит (1,9), а највећи код сејанца М1 (2,7). Иако се код свих генотипова процес морфогенезе женских репродуктивних органа одвијао истим редоследом и може бити представљен општим моделом, испољене су разлике у времену одвијања појединих фаза. Диференцирање зачетака женских цветова код генотипова са ранијим листањем почињало је просечно у трећој декади јуна, а код сорти са каснијим листањем у току прве и друге декаде јула. Код протандричних сорти на крају вегетације зачеци женских цветова имали су инициран само инволукрум, док су код хомогамних и протогиничних генотипова они имали диференциране примордије чашичних листића. Генотипови чији су зачеци цветова ушли у период мировања у нижим стадијумима диференцијације, у пролеће тај заостатак надокнађују бржим темпом развоја. Најраније цветање женских цветова је било код сејанца М1 (18. априла), који је имао и најдуже трајање цветања (19 дана). Најкасније цветање женских цветова је било код сорте Елит (7. маја), која је имала и најкраће цветање (13 дана).

Морфолошке карактеристике мушких репродуктивних органа такође су испољиле генотипске специфичности. Дужина реса варирала је од 85 mm код сорте Шампион до 150,8 mm код сорте Елит. Сорте са ранијим ресањем имале су краће ресе од сорти са каснијим ресањем. Највећи број цветова по реси имали су сејанац М1 и сорта Елит (139), док је најмањи број утврђен код сорте Шејново (101). Просечан број прашника у мушким цветовима варирао је од 17 код сејанца М1 до 19,8 код сорте Г-139. Од основе ресе према њеном врху смањивао се број прашника у цветовима. Почетак и динамика морфогенезе мушких цветова ораха била је условљена генотипом и климатским условима. Код протандричних сорти диференцијација спорогеног ткива у поленовим кесицама почиње у јуну, док је код протогиничних сорти она утврђена тек у марту. Време мејозе у ресама ораха је развучено због сукцесивног развоја мушких цветова од основе ресе према њеном врху. Док се у најнижим цветовима ресе формирају тетраде, у њеним вршним цветовима најчешће је још увек присутно спорогено ткиво. Ресе почињу да праше најпре код сорте Шејново (просечно 15. априла), а најкасније код сорте Елит (11. маја). Сорте Шампион и Шејново су протандричне, док су сорте Г-139, Г-251 и сејанац М1 протогинични. Сорта Елит је најчешће протогинична, али у појединим годинама нагиње хомогамији. Генотип је испољио значајан утицај на морфометријске особине полена. Дужина поленових зрна варирала је од 40,5 до 44,5 μm , док је ширина имала вредности од 44,1 до 48,3 μm .

На крају, кандидат даје закључке испитивања клијавости полена ораха и утицаја различитих фактора на њу, као што су састав хранљиве подлоге, температура и услови чувања. Просечна клијавост полена испитиваних сорти ораха је била релативно мала и варирала је од 6,6 до 15,9%. Утврђен је оптималан састав хранљиве подлоге за клијавост полена (0,6-0,8%, агара, 15% сахарозе, 400 ppm борне киселине и 50 ppm

калцијум хлорида), као и оптимална температура за клијање (22-27°C). Код сорти које касно ресају оптимална температура за клијање полена је била виша у односу на сорте ранијег ресања. Полен ораха је најбоље очувао клијавост при чувању на температури од -18°C, у херметички затвореним судовима у којима се налазио засићени раствор калцијум хлорида, уз рехидратисање пре наклијавања.

Поглавље **Литература** садржи 313 референци које су коришћене приликом писања докторске дисертације. Цитиране референце одговарају проучаваној проблематици. Оне су сложене по абecedном реду и написане правилно, у складу са прихваћеним стандардима за навођење литературе.

3. Закључак и предлог

Докторска дисертација дипл. инж. Слађане Јанковић под насловом: **„Морфогенеза и анатомско физиолошке карактеристике репродуктивних органа ораха (*Juglans regia* L.)“** представља оригиналан научни рад из области Помологије. Одабрана тема је значајна како са научног, тако и са практичног становишта. У оквиру ове докторске дисертације испитиване су морфолошке карактеристике родних граница ораха, морфогенеза мушких и женских репродуктивних органа, као и утицај састава хранљиве подлоге, температуре и услова чувања на клијавост полена.

Морфолошке карактеристике мушких и женских цветова испитиване су посматрањем свежег материјала под светлосним микроскопом. Анатомска анализа формирања мушког и женског гаметофита обављена је на трајним хистолошким препаратима применом парафинске методе. Морфометријска испитивања полена обављена су методом скенирајуће електронске микроскопије. Клијавост полена испитивана је методом *in vitro* наклијавања на хранљивој подлози са сахарозом и агаром.

На основу спроведених истраживања код шест испитиваних генотипова ораха утврђене су значајне разлике у погледу морфолошких карактеристика родних граница, женских и мушких репродуктивних органа, као и клијавости полена. Утврђено је да сорта Г-139 и сејанац М1 и припадају прелазном типу рађања, док се остале сорте одликују терминалним типом рађања. Диференцирање зачетака женских цветова код генотипова са ранијим листањем почињало је просечно у трећој декади јуна, а код сорти са каснијим листањем у току прве и друге декаде јула. Код хомогамних и протогиничних генотипова овај процес се одвијао брже него код протандричних сорти. Диференцирање спорогеног ткива у поленовим кесицама код протандричних сорти почиње у јуну, док је код протогиничних сорти оно утврђено тек у марту наредне године. Сорте Шампион и Шејново су протандричне, док су сорте Г-139, Г-251, Елит и сејанац М1 протогинични. С обзиром на то да полен ораха има релативно малу клијавост, утврђени су оптимални услови за његово клијање (састав хранљиве подлоге, температура, и услови чувања).

Научни допринос ове докторске дисертације огледа се у томе што омогућава осветљавање проблема репродуктивне биологије ораха, која је у односу на друге врсте воћака врло мало проучавана. Ова дисертација има и практичан значај за избор одговарајућих сорти опрашивача у савременом гајењу ораха, као и за утврђивање оптималних услова за клијање полена ораха, што је од великог значаја у оплемењивачком раду.

Добијени резултати ове докторске дисертације у потпуности испуњавају програм постављених истраживања. Кандидат се придржавао радних хипотеза и задатака које је поднео при пријави докторске дисертације. Рад је написан јасним стилем и разумљивим језиком.

Имајући у виду реализацију програма истраживања, извршену анализу добијених резултата и закључке, као и значај ових истраживања за воћарску науку и праксу, Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију дипл. инж. Слађане Јанковић под насловом: „**Морфогенеза и анатомско физиолошке карактеристике репродуктивних органа ораха (*Juglans regia L.*)**“ и предлаже Наставно-научном већу Пољопривредног факултета, Универзитета у Београду да прихвати ову позитивну оцену и да кандидату омогући да јавно брани докторску дисертацију.

У Београду, 05. 05. 2016.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

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

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

Др Никола Мићић, редовни професор
Универзитет у Бањалуци, Пољопривредни факултет

Др Милован Величковић, редовни професор
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет

Др Милица Фотирић Акшић, ванредни професор
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет

Прилог:

Рад кандидата Слађане Јанковић, дипл. инж. објављен у часопису са SCI листе

1. Paunović S.M., Miletic R., Janković D., **Janković S.** and Mitrović M. 2013. Effect of Humisol on survival and growth of nursery grafted walnut (*Juglans regia* L.) plants. Horticultural Science 40: 111–118. (M22).