

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

ШУМАРСКИ ФАКУЛТЕТ

Драгана М. Скочајић

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

Докторска дисертација

Београд, 2016.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF FORESTRY

Dragana M. Skočajić

**EARLY DETECTION OF THE GRAFT
COMPATIBILITY *SATO-ZAKURA* CHERRYS AND
DOMESTIC ROOTSTOCKS BY CALLUS FUSION
*IN VITRO***

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016.

ИНФОРМАЦИЈЕ О МЕНТОРУ И ЧЛАНОВИМА КОМИСИЈЕ

Ментор:

др Михаило Грбић, *редовни професор*
Универзитета у Београду – Шумарски факултет

Чланови Комисије:

Др Матилда Ђукић, *редовни професор*
Универзитета у Београду – Шумарски факултет

Др Ђурђина Ружић, *научни саветник Института за воћарство, Чачак*

Др Милица Фотирић Акшић, *ванредни професор*
Универзитета у Београду – Пољопривредни факултет

Др Драгана Ранчић, *доцент*,
Универзитета у Београду – Пољопривредни факултет

Датум одбране:

ИЗЈАВЕ ЗАХВАЛНОСТИ

Поред свих испланираних детаља које захтева овако обиман посао, понекад очекивано или не, преокрене се след ствари неким случајним (или намерним) догађајима или потезима људи, које не уочимо у првом трену, али их временом повежемо и схватимо, можда на прави начин. У редовима које бележим на почетку, а пишем на крају, покушаћу се захвалити свима уз чију помоћ успешно заврших своју тезу.

Првенствено свим члановима Комисије, а посебно свом професору и ментору, др Михаилу Грбићу.

За дугогодишњу подршку, подстрек и упорну веру у успех, искрено се захваљујем својој професорки др Матилди Ђукић. Велику и посебну захвалност за стрпљење у откривању дела сазнања на пољу анатомије, дугујем професорки Драгани Ранчић.

Две особе за које искрено верујем да својим знањем и позитивном енергијом померају след и ток многих ствари, које су саветима и несебичним позитивним ставом према проблемима које треба решавати брзо и ефикасно, најзаслужније за успешан завршетак ове дисертације, су др Ђурђина Ружић и др Милица Фотирић Акшић. За све што су сматрале дужношћу, а посебно свему што је превазилази, обема бескрајно Хвала.

Посебну захвалност за помоћ током лабораторијског рада и тумачења добијених резултата, за уступање простора, опреме и изнад свега знања, уз могућност за спознајом нових, дугујем:

- колегиницама и колегама професорке Дајић Стевановић, са Катедре за Агроботанику, посебно драгом колеги Раденку на посвећености у раду са анатомским пресецима
- сарадницима професора Тешића, са Катедре за Аналитичку хемију: др Маји Натић, др Драгани Дабић, Урошу Гашићу, Томиславу Гостију, Милицу, Сашки и Александри
- колегиници др Данијели Мишић са Института за биолошка истраживања Сениша Станковић, на великој стручној помоћи, подршци и пријатељском охрабрењу

За помоћ у прикупљању и уступању материјала за започињање експерименталних истраживања захваљујем се Колегама расадничарима: члановима породице Манојловић, Драгану Гајићу и Невени Јовичић из расадника „Лепо Поље“, Владану Станојчићу, Милану Топаловићу и колегиници Марији Митровић. На корисним саветима и размени искустава у раду са украсним трешњама посебну захвалност дугујем колегама Ивану и Немањи Топаловић као и драгим колегама и пријатељима из расадника „Оморика“, Мирку и Зорану Сремчевићу.

Хвала велико мојим колегама који су били ту, са искреном жељом и вољом да у сваком тренутку помогну: професоркама Драгици Обратов Петковић, Весни Голубовић Ђургуз, Милицу Ранчић и њеној сарадници Ивани, професорима Драгану Карацићу, Ненаду Кечи, др Ивану Миленковићу и колегиницама Драгани Чавловић и Сузани Гавриловић, а посебно својим драгим колегама и пријатељима: Ивани, Андреји, Нени, Јелени, Вели, Невени и Борису.

Пријатељици и колегиници Марији Нешић, која је у последњих неколико година уназад, са мном делила и добре и лоше тренутке, искрено ме храбрећи да у њима истрајем, посебно хвала за сваку помоћ, савет и поклоњено време.

Свим мојим драгим пријатељима, који су ме бодрили и искрено прижељкивали завршетак започетог посла, хвала на стрпљењу и разумевању.

Путем у речи, задате именици **хвала** огромну одговорност коју носи, без сигурног сазнања да ли је оправдала ваша хтења, али се надате...

Сигурна сам само за исконе, за моје ближње, за оне за које знам да су ту и кад реч не стигне до њих, а и кад им имена не напишем.

**УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ - ШУМАРСКИ ФАКУЛТЕТ
КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИОНА ИНФОРМАЦИЈА**

Редни број (РББ)	
Идентификациони број (ИБР)	
Тип документације (ТД)	Монографска публикација
Тип записа (ТЗ)	Текстуални штампани материјал
Врста рада (ВР)	Докторска дисертација
Аутор (АУ)	Мр Драгана М. Скочајић, дипл.инж. шумарства за пејзажну архитектуру
Ментор (МН)	др Михаило Грбић, редовни професор Универзитета у Београду Шумарски факултет
Наслов рада (НР)	Рано утврђивање компатибилности <i>Sato-zakura</i> трешања и домаћих подлога спајањем калуса у условима <i>in vitro</i>
Језик публикације (ЈП)	Српски / ћирилица
Земља публикације (ЗП)	Република Србија
Географско подручје (ГП)	Србија
Година издавања (ГИ)	2016.
Издавач (ИЗ)	Ауторски репринт
Место издавања и адреса (МС)	11030 Београд, Р. Србија, Кнеза Вишеслава 1
Физички обим рада (ФО) (број поглавља/страна/литературних цитата/табела/графикона/шема/карти/слика/прилога)	8 поглавља, 260 страница, 280 литературна навода, 79 илустрације, 27 табела, 38 графикона, 4 карте
Научна област (НО)	Биотехничке науке
Научна дисциплина (ДИС)	Пејзажна архитектура и хортикултура
Предметна одредница/Кључне речи (ПО)	инкомпатибилност, <i>in vitro</i> , калемљење, калус, спој, феноли.
УДК	635.92.012:582.711.713(043.3)
Чува се (ЧУ)	Библиотека Шумарског факултета, Кнеза Вишеслава 1, 11030 Београд, Р. Србија
Важна напомена (ВН)	Нема
Извод (ИЗ)	Јапанске цветајуће трешње из групе <i>Sato-zakura</i> имају посебан значај за пејзажну архитектуру и хортикултуру. Фузијом калуса подлоге и племке у условима <i>in vitro</i> , вршена је рана детекција компатибилности <i>Sato-zakura</i> трешања и домаћих подлога: визуелним и хистохемијским анализама споја (распоред и обојеност ћелијских зидова и присуство липида и фенолних компоненти у калусу).
Датум прихватања теме (ДП)	Одлука ННВ Шумарског факултета, бр 01-4170/1, од 27.05.2015.год. Одлука Већа научних области биотехничких наука, 02 бр. 61206-2638/2-15, од 17.06.2015.
Датум одбране (ДО)	
Комисија за оцену (КО)	др Михаило Грбић, редовни професор Шумарски факултет, Београд Др Матилда Ђукић, редовни професор Шумарски факултет Др Ђурђина Ружић, научни саветник Института за воћарство Чачак Др Милица Фотирић Акшић, ванредни професор Пољопривредни факултет Др Драгана Ранчић, доцент, Пољопривредни факултет

UNIVERSITY OF BELGRADE - FACULTY OF FORESTRY
KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number (ANO)	
Identification number (INO)	
Document type (DT)	Monographic publication
Type of record (TR)	Textual printed document
Contains code (CC)	Doctoral Dissertation
Author (AU)	Dragana M. Skočajić, Msc. of Forestry for Landscape architecture and horticulture
Mentor (MN)	Dr Mihailo Grbić, Full Professor
Title (TI)	Early detection of the graft compatibility <i>Sato-zakura</i> cherries and domestic rootstocks by callus fusion <i>in vitro</i>
Language of text (LT)	Serbian/ Cyrillic alphabet
Country of publication (CP)	Republic of Serbia
Locality of publication (LP)	Serbia
Publication year (PY)	2016
Publisher	Author's reprint
Publication place (PL)	11030 Belgrade, R. Serbia, Kneza Višeslava 1
Physical description (PD) (number of chapters/pages/citations/tables/charts/maps/images/annexes)	8 chapters, 260 pages, 280 references, 79 figures, 27 tables, 38 charts, 4 maps
Science field (SF)	Biotechnological sciences
Science discipline (SD)	Landscape architecture and horticulture
Subject/Key words (CX)	<i>in vitro</i> , incompatibility, grafting, callus, fusion, union, phenols
UDC	
Holding data (HD)	Library of Faculty of Forestry, Kneza Višeslava 1, 11030 Belgrade, R. Serbia
Note (N)	None
Abstract (AB)	Japanese flowering cherry trees from the group <i>Sato-zakura</i> are of great importance for landscape architecture and horticulture. The early detection of the compatibility of the aforementioned scions and rootstocks was being carried out by fusing the calluses of the scion and rootstock <i>in vitro</i> : The unions were obtained by visual and histochemical union analyses (the cell arrangement and the cell wall staining as well as the presence of lipids and phenol components in the callus).
Accepted by scientific board on (ACB)	Decision of Academic-Scientific Council of Faculty of Forestry, No. 01-4170/1, from 27.05.2015. Decision of Professional Board of Biotechnical Sciences, 02 No. 61206-2638/2-15, from 17.06.2015.
Defended on (DE)	
Thesis defend board (DB)	Dr. Mihailo Grbić, full professor Faculty of Forestry, Belgrade Dr. Matilda Đukić, full professor Faculty of Forestry, Belgrade Dr. Đurđina Ružić, Principal Research Fellow Fruit Research Institute, Čačak Dr. Milica Fotirić Akšić, associate professor Faculty of Agriculture, Belgrade Dr Dragana Rančić, assistant professor Faculty of Agriculture, Belgrade

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

Резиме

Јапанске цветајуће трешње из групе *Sato zakura* имају посебан значај за пејзажну архитектуру и хортикултуру широм света па и код нас. Како се већина добија путем хетеровегетативног размножавања, поље истраживања је компатибилност најчешће гајених култивара украсних трешања на нашем поднебљу: *Prunus serrulata* 'Amanogawa', *Prunus serrulata* 'Kanzan', *Prunus serrulata* 'Kiku-shidare-zakura', са домаћим подлогама за трешању: *Prunus avium*, *Prunus* 'Colt' и *Prunus mahaleb*. Таксон који је коришћен у истраживању као позитивна (компатибилна) контрола је *Prunus serrulata*, а два потенцијално инкомпатибилна таксона - *Prunus serotina* и *Pyrus communis* 'Pyrodwarf'. Фузијом калуса подлоге и племке у условима *in vitro*, на релативно брз и поуздан начин вршена је рана детекција компатибилности поменутих племки и подлога. Резултати о јачини и компатибилности спојева добијени су визуелним (процент успешно спојених, степен јачине споја) и хистохемијским анализама споја (распоред и обојеност ћелијских зидова и присуство липида и фенолних компоненти у калусу).

Од три коришћене хранљиве подлоге (MS, SH и WP), за највећи број таксона, најпогоднија у процесу индукције калуса се показала MS. За обичну трешњу и култиваре *Prunus serrulata* 'Kanzan' и *Prunus* 'Colt', у процесу индукције калуса из пупољака или вегетативних делова летораста, одговарајућа је била и SH подлога, док се једино за врсту *Prunus mahaleb*, WP издвојила као погодна хранљива подлога. Са ауксином NAA у концентрацији 2 mg/L и цитокинином BAP 0,5 mg/L за већину таксона добијени су најбољи резултати у калогенези. За генотипове *Prunus avium*, *Prunus* 'Colt', *Prunus serotina* и *Prunus serrulata* 'Kanzan', могуће је користити у истој концентрацији и 2,4-D као замену, док се ИВА показао неодговарајућим ауксином за индукцију калуса код истраживаних врста.

На спојевима делова добијеног калуса подлоге и племке, визуелно оцењена јачина споја показала је јаке спојеве код комбинација: *P. avium*/*P. serrulata* 'Kanzan', *Prunus* 'Colt'/*P. serrulata* 'Amanogawa', *Prunus* 'Colt'/*P. serrulata* 'Kiku-shidare-zakura' и *P. serrulata* са сва три култивара. Делимично јаки спојеви остварени су код калуса *P. avium*/*P. serrulata* 'Amanogawa' и 'Kiku-shidare-zakura', *Prunus* 'Colt'/ *P. serrulata* 'Kanzan' и код спојева сва три култивара са касном сремзом (*Prunus serotina*). Јасне знаке неподударности калуса кроз лако одвајање на споју, показале су, очекивано, комбинације сва три култивара јапанских украсних трешања са култиваром *Pyrus communis* 'Pyrodwarf' и са магривом (*Prunus mahaleb*).

Анатомске анализе су указале на значајне манифестације у ткиву спојева калуса: бојењем рутенијум црвеном бојом локализоване су веће количине пектинских полисахарида код потенцијално компатибилних спојева, насупрот мањој локализацији ових једињења код инкомпатибилних. Бојењем толуидин и алцијан плавом и сафранином, доста прецизно су локализовани феноли, као и сенесценција ткива, што може да укаже на ране знаке неподударности калуса. Поменуте појаве јасно су забележене код спојева култивара *P. serrulata* са магривом и патуљастом крушком ('Pyrodwarf') и местимично на спојевима са култиваром 'Colt' и са обичном трешњом (*P. avium/P. serrulata* 'Amanogawa' и *P. avium/P. serrulata* 'Kiku-shidare-zakura') и код спојева са касном сремзом.

Хемијским анализама спојева, потврђена је компатибилност из претходне две анализе као и постојање одређеног броја неподударних спојева. Детекција неких полифенола који су показатељи инкомпатибилности калемљења (р - кумаринска киселина, кемферол, кверцетин, ферулинска киселина, нарингенин и баикалеин), потврдила је на још један, посредан начин, потенцијално инкомпатибилне спојеве. Код магриве, хемијским анализама укупних и појединачних полифенола потврђено је њихово нагомилавање јасно манифестовано потамњивањем ткива, а на спојевима са обичном трешњом (која се код нас најчешће користи као подлога за калемљење јапанских украсних трешања), хемијске анализе су потврдиле постојање одређених сметњи у споју ове врсте са култиварима 'Amanogawa' и 'Kiku-shidare-zakura'. Према свим анализама за ова два култивара боље резултате су дале подлога *Prunus serrulata* и *Prunus* 'Colt'. Основни таксон *Prunus serrulata* могао би се користити као алтернативна подлога и/или посредник калемљења између наших подлога и јапанских украсних трешања, а *Prunus* 'Colt' као алтернатива за домаћу трешњу као подлогу, чиме би се превазишла неподударност између поменутих компонената калемљења.

Сумирањем резултата спроведених истраживања, може се констатовати да се примењена метода фузије калуса у *in vitro* условима може сматрати ефикасним начином добијања релативно брзог одговора о потенцијалној подударности две компоненте калемљења и да је метода применљива и за друге таксоне. Применом ове технике могли би се, макар у одређеном обиму, избећи пољски огледи у којима се одговор о подударности калемљења може чекати више година.

Кључне речи: трешња, *Prunus serrulata*, инкомпатибилност, *in vitro*, калемљење, калус, спој, подлога, племка, феноли

EARLY DETECTION OF THE COMPATIBILITY OF *SATO-ZAKURA* CHERRY TREES AND DOMESTIC ROOTSTOCKS BY FUSING CALLUS *IN VITRO*

Abstract

Japanese flowering cherry trees from the group *Sato zakura* are of great importance for landscape architecture and horticulture both world wide and in our country. As the majority are reproduced via heterovegetative propagation, the field of research is the compatibility of the most frequently cultivated ornamental cherry trees cultivars in our region: *Prunus serrulata* ‘Amanogawa’, *Prunus serrulata* ‘Kanzan’, *Prunus serrulata* ‘Kiku-shidare-zakura’, with domestic cherry rootstocks: *Prunus avium*, *Prunus* ‘Colt’ and *Prunus mahaleb*. The taxon that was used in the research as a positive (compatible) control is *Prunus serrulata*, while the two potentially incompatible taxons were *Prunus serotina* and *Pyrus communis* ‘Pyrodwarf’.

The early detection of the compatibility of the aforementioned scions and rootstocks was being carried out relatively quickly and reliably by fusing the calluses of the scion and rootstock *in vitro*. The results of the strength and compatibility of the unions were obtained by visual (the percentage of the successful unions, the degree of the union strength) and histochemical union analyses (the cell arrangement and the cell wall staining as well as the presence of lipids and phenol components in the callus).

Of the three used plant growth media (MS, SH and WP), it was the MS that proved to be the most favourable for the greatest number of taxons during the callus induction process. For the ordinary cherry tree and the cultivars *Prunus serrulata* ‘Kanzan’ and *Prunus* ‘Colt’, the SH plant growth medium was also appropriate, whereas the WP plant growth medium was favourable only for the species *Prunus mahaleb*. The best results in callogenesis were obtained for the majority of taxons with the auxin at the concentration 2 mg/L NAA and the cytokinin BAP 0.5 mg/L. It is also possible to use 2,4-D at the same concentration as a substitute for the genotypes *Prunus avium*, *Prunus* ‘Colt’, *Prunus serotina* and *Prunus serrulata* ‘Kanzan’, whereas IBA proved to be an inappropriate auxin for the callus induction in investigated species.

The visually assessed strength on the unions of the parts of the obtained callus of the scion and rootstock showed strong unions with the following combinations: *P. avium*/ *P. serrulata* ‘Kanzan’, *Prunus* ‘Colt’/ *P. serrulata* ‘Amanogawa’, *Prunus* ‘Colt’/ *P. serrulata* ‘Kiku-shidare-zakura’ and *P. serrulata* with all the three cultivars. Partly strong unions appeared in the calluses *P. avium*/*P. serrulata* ‘Amanogawa’ and ‘Kiku-shidare-zakura’, *Prunus* ‘Colt’/ *P. serrulata* ‘Kanzan’ and in the unions of all the three cultivars with the black cherry tree (*Prunus serotina*). Expectedly, the clear signs of callus incompatibility via easy disuniting

at the union appeared in all the three cultivars of Japanese ornamental cherry trees with the cultivar *Pyrus communis* 'Pyrodwarf' and with the Mahaleb cherry tree (*Prunus mahaleb*).

The anatomical analyses indicated the significant manifestations in the tissue of the callus unions: greater amounts of pectin polysaccharides in potentially compatible unions were localized by ruthenium red staining in contrast to a smaller localization of these compounds in the incompatible unions. Phenols as well as tissue senescence were very precisely localized by toluidin blue and alcian blue as well as safranin staining, which can indicate the early signs of the callus incompatibility. The abovementioned phenomena were clearly defined in the unions of the cultivar *P. serrulata* with the Mahaleb cherry tree and the dwarf pear tree ('Pyrodwarf') and in some places on the unions with the cultivar 'Colt' and with the ordinary cherry tree (*P. avium*/*P. serrulata* 'Amanogawa' и *P. avium*/*P. serrulata* 'Kiku-shidare-zakura') as well as in the unions with the black cherry tree.

It is by the chemical analysis of the unions that the compatibility from the previous two analyses as well as the existence of some incompatible unions has been corroborated. The detection of certain polyphenols which are the indicators of graft incompatibility (p - coumaric acid, kaempferol, ferulic acid, naringenin and baicalein), confirmed the potentially incompatible unions in another, indirect way. In the Mahaleb cherry tree, the chemical analyses of total and individual polyphenols confirmed their agglomeration by clearly manifested tissue browning and in the unions with the ordinary cherry tree (which is most frequently used as a rootstock for grafting Japanese ornamental cherry trees in our country), the chemical analyses confirmed the existence of certain troubles in the union of this species with the cultivars 'Amanogawa' and 'Kiku-shidare-zakura'. According to all the analyses in relation to these two cultivars, better results were achieved by the rootstocks *Prunus serrulata* и *Prunus* 'Colt'. The basic taxon *Prunus serrulata* could be used as an alternative rootstock and/or an interstock between our rootstocks and Japanese ornamental cherry trees, and *Prunus* 'Colt' as an alternative for the domestic cherry tree as a rootstock, whereby the incompatibility between the aforementioned grafting components would be surmounted.

Summarizing the results of the performed research, it can be ascertained that the applied method of the callus fusion *in vitro* may be considered an efficient way of receiving a relatively quick response concerning the potential compatibility of two grafting components and the applicability of the method on other taxons. It is by applying this technique that, at least to some extent, field experiments, where a response concerning the grafting incompatibility could be expected for several years, could be avoided.

Key words: cherry tree, *Prunus serrulata*, *in vitro*, incompatibility, grafting, callus, fusion, union, rootstock, scion, phenols

СПИСАК СКРАЋЕНИЦА

A	Апсорбанца
ACLSV	Apple Chlorotic Leafspot Virus (вирус хлоротичне лисне пегавости јабуке)
ANOVA	Analysis of Variance (анализа варијансе)
APG	Angiosperm Phylogeny Group (филогенетска група скривеносеменица)
ApMV	Apple Mosaic Virus (вирусни мозаик јабуке)
BAP	6-benzil aminopurin
CGRMV	Cherry Green Ring Mottle Virus (вирус зеленог прстенастог шаренила трешње)
DAD	Diode Array Detector (диодни детектор)
DNA	Дезоксирибонуклеинска киселина
DPPH	2,2 - дифенил-1-пикрилхидразил
ESI	Electro Spray Ionization (електроспреј јонизација)
FAA	Formalin–Acetic acid–Alcohol
FPS	Foundation Plant Services
GA	Гална киселина
HCl	Хлороводонична киселина
HPLC	High-Pressure Liquid Chromatography (течна хроматографија високих перформанси)
IAA	Indol-3-sirćetna kiselina
IBA	Indol-3-buterna kiselina
ICNCP	International Code of Nomenclature for Cultivated Plants
ITS	Internal Transcribed Spacer
LSD	Fisher's least significant difference test
MeOH	Метанол, метил алкохол
MS	Murashige & Skoog
NAA	α Naftil sirćetna kiselina
Na ₂ CO ₃	Натријум карбонат
NaOCl	Натријум-хипохлорит
NaOH	Натријум хидроксид
NRSP5	National Research Support Program 5
PAL	Phenylalanine ammonia-lyase (фенилаланин амонијум лијаза)
PCA	Principal Component Analysis (анализа главних компонената)
PDV	Prune dwarf virus (вирус кржљавости шљиве)
PNRSV	Prunus Necrotic Ringspot Virus (вирус некротичне прстенасте пегавости)
POD	Polyphenol peroxidase (полифенол пероксидаза)
PPO	Polyphenol oxidase (полифенол оксидаза)
QQQ	Triple Quadrapol (троструки квадрупол)
RAM	Root Apical Meristem (апикални меристем корена)

RHS	Royal Horticultural Society
RNA	Рибонуклеинска киселина
RSA	Radical Scavenging Activity (укупна антиоксидативна активност)
PPK	Релативан раст калуса
SAM	Shoot Apical Meristem (пикални меристем изданка)
SH	Schenk & Hildebrandt
СПК	Степен покривености експланта калусом
TPC	Total Phenolic Component (укупан садржај фенола)
TWEEN 20	Nonionic detergent - polyethylene glycol sorbitan monolaurate (нејонски детерџент)
UHPLC	Ultra High Pressure Chromatography (течна хроматографија веома високих перформанси)
UV/VIS	Ultra Violet Visible
WP	Woody Plant Medium
Xy	Ксилол
2,4-D	2,4 Dihlorofenoksi sirćetna kiselina

Apigenin 7-O-apioglucoside	апин
Apigenin 7-O-glucoside	апигетрин
Kaempferol 3-O-glucoside	астрагалин
Luteolin 7-O-glucoside	цинарозид
Quercetin 3-O-galactoside	хиперозид
Quercetin 3-O-rutinoside	рутин
5-O-Caffeoylquinic acid	неохлорогена киселина

СПИСАК ТАБЕЛА И ГРАФИКОНА

Табеле:

- 3.2. **Табела 1.** Компоненте медијума за успостављање култура
- 3.2. **Табела 2.** Концентрације регулатора растења у хранљивим медијумима (у mg/L)
- 3.4.1. **Табела 3.** Ознаке бројева којима су означене врсте и култивари
- 4.1. **Табела 4.** Однос процента контаминираних, здравих, калусираних и некротираних пупољака
- 4.1. **Табела 5.** Процентуално пропадање пупољака узетих са адултних и јувенилних стабала.
- 4.1. **Табела 6.** Средње вредности процента контаминација на пупољцима са јувенилних матични стабала.
- 4.2.1. **Табела 7.** Средње вредности процента индукције калуса код три култивара јапанских трешања.
- 4.2.2. **Табела 8.** Средње вредности процента индукције калуса на свим хранљивим медијумима
- 4.2.2. **Табела 9.** Средње време индукције калуса код таксона изражен у данима
- 4.2.2. **Табела 10.** Средње време индукције калуса на различитим подлогама изражен у данима
- 4.2.3. **Табела 11.** Средње вредности масе индукованог калуса врста племки мерене после 35 дана и степени потамњивања калуса
- 4.2.3. **Табела 12.** Средње вредности масе индукованог калуса врста подлога мерене после 35 дана и степени потамњивања калуса
- 4.2.3. **Табела 13.** Резултати корелације параметара % индукције калуса и масе калуса за све таксоне
- 4.2.4. **Табела 14.** Анализа средњих вредности параметара индукције калуса према типу експланта и средњег времена индукције калуса, израженог у данима
- 4.2.4. **Табела 15.** Анализа средњих вредности параметара индукције калуса према типу експланта и средњег времена индукције калуса, израженог у данима за култивар *Prunus serrulata* 'Kanzan'
- 4.2.4. **Табела 16.** Анализа средњих вредности параметара индукције калуса према типу експланта и средњег времена индукције калуса, израженог у данима за култивар 'Kiku-shidare-zakura'
- 4.2.4. **Табела 17.** Анализа средњих вредности параметара индукције калуса према типу експланта и средњег времена индукције калуса, израженог у данима за обичну трешњу
- 4.2.4. **Табела 18.** Анализа средњих вредности параметара индукције калуса према типу експланта и средњег времена индукције калуса, израженог у данима за култивар 'Colt'.
- 4.2.5.2. **Табела 19.** Анализа вишеструких опсега за релативан раст калуса (РПК)
- 4.2.5.2. **Табела 20.** Најпогодније хранљиве подлоге за индукцију калуса свих таксона

- 4.3.1. **Табела 21.** Анализа варијансе и вишеструких опсега за параметре % успешних спојева и оцене јачине споја у односу на контролни спој 7.7.
- 4.3.2. **Табела 22.** Анализа варијансе и вишеструких опсега за параметре % успешних спојева и оцене јачине споја у односу на контролни спој 8.8.
- 4.3.3. **Табела 23.** Анализа варијансе и вишеструких опсега за параметре % успешних спојева и оцене јачине споја у односу на контролни спој 9.9.
- 4.3.4. **Табела 24.** Анализа варијансе и вишеструких опсега за параметре % успешних спојева и оцене јачине споја у односу на контролни спој 4.4.
- 4.4. **Табела 25.** Анализа варијансе и вишеструких опсега средњих вредности садржаја укупних фенола TPC (g GAE/kg) и антиоксидативне активности RSA (mmol TE/kg) екстракта свеже масе калуса хомео и хетеропластичних спојева
- 4.4. **Табела 26.** Анализа варијансе и вишеструких опсега средњих вредности садржаја укупних фенола TCA (g GAE/kg) у спојевима култивара 'Amanogawa', 'Kanzan' и 'Kiku-shidare-zakura' са одређеном подлогом
- 4.5. **Табела 27.** Идентификација и квантификација фенолних једињења у екстрактима калуса хомео и хетеропластичних спојева; н.д. - није детектовано присуство; 1. флавоноиди: 1а. флавоноли, 1б. флаволи, 1в. флаванони; 2. дихидрохалкони; 3. фенолне киселине

Графикони:

- 4.2.2. **Графикон 1.** Индукција калуса из пупољака таксона коришћених као подлога
- 4.2.2. **Графикон 2.** Индукција калуса из пупољака врста *Prunus serrulata* и *Prunus serotina*.
- 4.2.2. **Графикон 3.** Kruskal-Wallis тест за индукцију калуса свих таксона
- 4.2.3. **Графикон 4.** Процент индукованог калуса и маса калуса код свих таксона.
- 4.2.3. **Графикон 5.** Међуоднос вредности параметара индукције калуса и масе калуса на свим подлогама
- 4.2.4. **Графикон 6.** Индукције калуса свих типова за експланате култивара 'Amanogawa' на изабраним хранљивим подлогама
- 4.2.4. **Графикон 7.** Процент индукције калуса и степен покривености калусом лисне дршке
- 4.2.4. **Графикон 8.** Процент индукције калуса и степен покривености калусом основе листа
- 4.2.4. **Графикон 9.** Процент индукције калуса и степен покривености калусом лисне плоче
- 4.2.4. **Графикон 10.** Процент индукције калуса и степен покривености изданка калусом
- 4.2.4. **Графикон 11.** Процент индукције калуса свих експланата на изабраним хранљивим подлогама за експланте култивара 'Kanzan'
- 4.2.4. **Графикон 12.** Процент индукције калуса и степен покривености калусом лисне дршке
- 4.2.4. **Графикон 13.** Процент индукције калуса основе листа и степен покривености калусом
- 4.2.4. **Графикон 14.** Процент индукције калуса и степен покривености калусом лисне плоче
- 4.2.4. **Графикон 15.** Процент индукције калуса на делу изданка и степен покривености калусом

- 4.2.4. **Графикон 16.** Процент индукције калуса свих експаната на изабраним хранљивим подлогама за експланте култивара 'Kiku-shidare-zakura'.
- 4.2.4. **Графикон 17.** Процент индукције калуса и степен покривености калусом лисне дршке
- 4.2.4. **Графикон 18.** Процент индукције калуса основе листа и степен покривености калусом
- 4.2.4. **Графикон 19.** Процент индукције калуса лисне плоче и степен покривености калусом
- 4.2.4. **Графикон 20.** Процент индукције калуса на делу изданка и степен покривености калусом
- 4.2.4. **Графикон 21.** Средње вредности процента индукције калуса свих експаната на изабраним хранљивим подлогама за обичну трешњу
- 4.2.4. **Графикон 22.** Процент индукције калуса лисне дршке и степен покривености калусом
- 4.2.4. **Графикон 23.** Процент индукције калуса и степен покривености калусом основе листа
- 4.2.4. **Графикон 24.** Процент индукције калуса лисне плоче и степен покривености калусом
- 4.2.4. **Графикон 25.** Процент индукције калуса изданка са пупољком оса и степен покривености калусом
- 4.2.4. **Графикон 26.** Процент индукције калуса свих експаната на изабраним хранљивим подлогама за клон 'Colt'.
- 4.2.4. **Графикон 27.** Процент индукције калуса лисне дршке и степен покривености калусом
- 4.2.4. **Графикон 28.** Процент индукције калуса основе листа и степен покривености калусом
- 4.2.4. **Графикон 29.** Процент индукције калуса лисне плоче и степен покривености калусом
- 4.2.4. **Графикон 30.** Процент индукције калуса изданка и степен покривености калусом
- 4.2.4. **Графикон 31.** Анализа варијансе и вишеструких опсега за процентуално изражене вредности индукције калуса и степена покривености калусом типа експланта за сваки култивар и врсту
- 4.2.5.1. **Графикон 32.** Динамика раста калуса свих култивара и врста мерена првог, 20, 30, 45. и 60. дана.
- 4.3.4. **Графикон 33.** Процента успешних спојева и оцене јачине споја за јапанску трешњу као посредника у калемљењу
- 4.4. **Графикон 34.** Однос садржаја укупних фенола за свих 9 таксона, после 21. и 45. дана
- 4.5.1. **Графикон 35.** Анализа главних компоненти, РСА график скорова и вектора латентних варијабли
- 4.5.1. **Графикон 36.** Дендрограм кластер анализе урађен на основу компонената појединачних полифенола у хетеропластичним спојевима
- 4.5.2. **Графикон 37.** Анализа главних компоненти, РСА график скорова и вектора латентних варијабли
- 4.5.2. **Графикон 38.** Дендрограм кластер анализе урађен на основу компонената појединачних полифенола у хомеопластичним спојевима старости 21 и 45 дана

СПИСАК КАРТА, ФОТО ТАБЕЛА И СЛИКА

Карте:

- 1.1.1. **Карта 1.** Дистрибуција трешње, вишње и степске трешње (према Faust & Suranyi, 1997)
- 1.1.1.1. **Карта 2.** Ареал дивље трешње (према Russell, 2003).
- 1.1.1.3. **Карта 3.** Ареал магриве (извор Botanic Garden and Botanical Museum Berlin-Dahlem, 2006, <http://ww2.bgbm.org/EuroPlusMed/>)
- 1.1.1.4. **Карта 4.** Ареал касне сремзе (<http://esp.cr.usgs.gov/data/little/prunsero.pdf>)

Фото табеле:

- 1.4. **Фото табела 1.** Различити типови калуса
- 3.2. **Фото табела 2.** Промене на експлантима (пупољцима), током културе
- 3.3. **Фото табела 3.** Типови експланата и степен покривености калусом (СПК)

Слике:

- 1.1.2. **Слика 1:** Типови цветова јапанског трешања а) прост цвет; б) полудупли цвет; в) дупли цвет; г) пун - хризантема цвет
- 1.3.1.1. **Слика 2.** а) Шематски приказ функционисања плазмодезме, прилагођена шема http://www.bio.bg.ac.rs/materijali_predmeta/transport-kroz-simplast-2015.pdf
б) А-Н: Формирање секундарних плазмодезми на површини калема. (према Kollmann & Glockmann, 1991)
- 1.4. **Слика 3.** Плурипотентне матичне ћелије (модификовано према Verdeil et al., 2007).
- 1.4. **Слика 4.** Тотопотентне матичне ћелије (модификовано према Verdeil et al., 2007)
- 3.2. **Слика 5.** Процес уклањања заштитних љуспи пупољка трешње
- 3.3. **Слика 6.** Типови експланта узиманих са младих изданака
- 3.4.1. **Слика 7.** Припрема калуса за утврђивање јачине споја визуелном оценом
- 3.4.2.1. **Слика 8.** Припрема спојева калуса за цитолошку анализу
- 3.4.2.1. **Слика 9.** Опрема за прављење парафинских препарата
- 3.4.2.2. **Слика 10.** Процес припреме узорака на криотому
- 3.4.3. **Слика 11.** Припрема спојева калуса за хемијску анализу
- 4.1. **Слика 12.** Изглед различитих типова индукованог калуса
- 4.2.2. **Слика 13.** Калус индукован из пупољка *Prunus serrulata* 'Kiku-shidare-zakura' и промена боје калуса током 35 дана
- 4.2.5.1. **Слика 14.** Раст калуса после 30 дана
- 4.2.5.2. **Слика 15.** Типови експланта за 'Pigodwarf': а) део стабљике, б) дршка листа и в) лисна ламина
- 4.2.5.2. **Слика 16.** Развој калуса на листу, дршци листа и делу стабљике на MS4
- 4.2.5.2. **Слика 17.** Развој калуса на листу, дршци листа и делу стабљике на SH2

- 4.2.5.2. **Слика 18.** Индукција калуса из листа
- 4.3.1. **Слика 19.** Изглед калуса у споју; блага промена боје калуса култивара ‘Amanogawa’
- 4.3.1. **Слика 20.** Калус без промене боје на споју
- 4.3.1. **Слика 21.** Изглед потамњивања калуса магриве на споју
- 4.3.1. **Слика 22.** Калус без промене у боји иако није остварен спој
- 4.3.1. **Слика 23.** Спој калуса подлоге *Prunus serotina* и култивара ‘Amanogawa’
- 4.3.1. **Слика 24.** Пектини у зидовима ћелија калуса у споју 1.7.
- 4.3.1. **Слика 25.** Пектински полисахариди у екстрацелуларном простору
- 4.3.1. **Слика 26.** Толуидин плаво бојење фенола у калусу подлоге
- 4.3.1. **Слика 27.** Аутофлуоресценција фенола уз ћелијске зидове; приказ флуоресценције и паралелног снимка са светлосним микроскопом
- 4.3.1. **Слика 28.** Пектини у међупростору између калуса на споју 2.7.
- 4.3.1. **Слика 29.** Пектини локализовани унутар ћелија на споју 4.7.
- 4.3.1. **Слика 30.** Локализација фенола у периферним деловима калуса у споју ‘Colt’/ ‘Amanogawa’
- 4.3.1. **Слика 31.** Бојење масти суданском плавом на споју 4.7.
- 4.3.1. **Слика 32.** Локализација фенола на пресецима споја магриве и ‘Amanogawa’
- 4.3.1. **Слика 33.** Пектини у ћелијама подлоге (магрива)
- 4.3.1. **Слика 34.** Промена садржаја фенола у ћелијама током времена у споју 3.7.
- 4.3.1. **Слика 35.** Аутофлуоресценција фенола локализована у ћелијама подлоге
- 4.3.1. **Слика 36.** Аутофлуоресценција фенола локализована у ћелијама племке
- 4.3.1. **Слика 37.** Аутофлуоресценција масе калуса на споју 3.7. без јаче реемисије саме линије споја
- 4.3.1. **Слика 38.** Локализација масти код споја магриве и култивара ‘Amanogawa’
- 4.3.1. **Слика 39.** Присуство пектина на компатибилном споју
- 4.3.1. **Слика 40.** Слабије присуство пектина у ћелијама на делимично слабир спојевима
- 4.3.1. **Слика 41** Локализација фенола у ћелијама споја калуса
- 4.3.1. **Слика 42.** Локализација липида у ћелијама и уз ћелијски зид код споја 6.7.
- 4.3.2. **Слика 43.** Промене у боји калуса на различитим спојевима култивара ‘Kanzan’
- 4.3.2. **Слика 44** Делови калуса касне сремзе спојени са калусом култивара ‘Kanzan’
- 4.3.2. **Слика 45.** Калуси у споју 6.8. без промене боје и код неуспелих спојева
- 4.3.2. **Слика 46.** Локализација пектина на споју обичне трешње и култивара ‘Kanzan’
- 4.3.2. **Слика 47.** Акумулација фенола у ћелијама на периферији споја 1.8.
- 4.3.2. **Слика 48.** Места добро оствареног споја 1.8. између калуса
- 4.3.2. **Слика 49.** Увеличани детаљи успешног споја и ћелије на периферији калуса који тамни уз повећан садржај фенола

- 4.3.2. **Слика 50.** Аутофлуоресценција фенола у зони ћелијског зида на споју 1.8.
- 4.3.2. **Слика 51.** Слаба локализација масти у ћелијама споја 1.8.
- 4.3.2. **Слика 52.** Пектини на пресецима у ћелијама подлоге и племке на споју 3.8.
- 4.3.2. **Слика 53.** Детаљи пресека бојени судан плавом за локализацију масти споја 3.8.
- 4.3.2. **Слика 54.** Дифузна локализација фенола на споју 5.8.
- 4.3.2. **Слика 55.** Феноли у ћелијама дуж споја 5.8. у ћелијама у линијским формацијама
- 4.3.2. **Слика 56.** Детаљи локализације масти на пресеку споја 5.8.
- 4.3.2. **Слика 57.** Пектински полисахариди који нису локализовани у међућелијском простору споја 6.8.
- 4.3.2. **Слика 58.** Појава фенола у ћелијама на споју 6.8.
- 4.3.2. **Слика 59.** Јача аутофлуоресценција код споја 6.8.
- 4.3.2. **Слика 60.** Локализација масти у ћелијама споја култивара 'Kanzan' и култивара крушке 'Pyrodwarf'
- 4.3.3. **Слика 61.** Разлика у промени боје калуса култивара и домаће трешње (спој 1.9.)
- 4.3.3. **Слика 62.** Чврсти спојеви код комбинације 2.9.
- 4.3.3. **Слика 63.** Интензивна промена боје калуса у споју 3.9.
- 4.3.3. **Слика 64.** Јак и успешан спој јапанских трешања, спој 4.9.
- 4.3.3. **Слика 65.** Разлика у боји калуса на споју јапанског култивара и касне сремзе (спој 5.9.)
- 4.3.3. **Слика 66.** Појава пектинских полисахарида на споју 1.9.
- 4.3.3. **Слика 67.** Делимично нагомилавање фенола уз зидове споја 1.9.
- 4.3.3. **Слика 68.** Спојеви 1.9.: са или без накупљања фенола на споју
- 4.3.3. **Слика 69.** Аутофлуоресценција калуса у споју 1.9.
- 4.3.3. **Слика 70.** Пектини у већим површинама на пресеку споја калуса 5.9.
- 4.3.3. **Слика 71.** Аутофлуоресцирање ћелија калуса на споју 5.9.
- 4.3.3. **Слика 72.** Слабије локализовани пектини у ћелијама калуса на споју 6.9. бојени рутенијум црвеном бојом
- 4.3.3. **Слика 73.** Фенолна једињења: у појединачним ћелијама и на деловима споја 6.9.
- 4.3.3. **Слика 74.** Делимична локализација масти унутар појединачних ћелија или уз саму ивицу ћелијског зида 6.9.
- 4.3.4. **Слика 75.** Калус у споју јапанске и обичне трешње (спој 1.4.)
- 4.3.4. **Слика 76.** Калус јапанске трешње у споју са 'Colt' (спој 2.4.)
- 4.3.4. **Слика 77.** Спој јапанске трешње и касне сремзе (спој 5.4)
- 4.3.4. **Слика 78.** Локализација пектина на спојевима 1.4. и споју 2.4.
- 4.3.4. **Слика 79.** Присуство пектина у спојевима јапанске трешње и касне сремзе, спој 5.4.
а) бојење рутенијум црвеном бојом б) бојење сафранином и алцијен плавом

СПИСАК ПРИЛОГА

- Прилог 1.** Млада стабла домаћих трешања
- Прилог 2.** Млада стабла јапанских трешања
- Прилог 3.** Изглед младих гранчица домаћих трешања
- Прилог 4.** Изглед младих гранчица јапанских трешања
- Прилог 5.** Изглед листова домаћих трешања
- Прилог 6.** Изглед листова јапанских трешања
- Прилог 7.** Изглед цветова домаћих трешања
- Прилог 8.** Изглед цветова јапанских трешања
- Прилог 9.** Типови експаната
- Прилог 10.** Типови експаната

САДРЖАЈ

РЕЗИМЕ	i
АВСТРАСТ	iii
СПИСАК СКРАЋЕНИЦА	v
СПИСАК ТАБЕЛА И ГРАФИКОНА	vii
СПИСАК КАРАТА, ФОТО ТАБЕЛА И СЛИКА	x
СПИСАК ПРИЛОГА	xiii
1. УВОД	1
1.1. ОПШТЕ И ТАКСОНОМСКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ И СИСТЕМАТИКА РОДА <i>PRUNUS</i> L.	2
1.1.1. Подрод <i>Cerasus</i> Pers.	4
1.1.1.1. <i>Prunus avium</i> L.	6
1.1.1.2. <i>Prunus</i> ‘Colt’ (<i>P. avium</i> x <i>P. pseudocerasus</i>)	8
1.1.1.3. <i>Prunus mahaleb</i> L.	9
1.1.1.4. <i>Prunus serotina</i> Ehrh.	11
1.1.2. Опште карактеристике и систематика групе јапанских цветајућих трешања	12
1.1.2.1. <i>Prunus serrulata</i> Lindl.	18
1.1.2.2. <i>Prunus serrulata</i> ‘Amanogawa’	21
1.1.2.3. <i>Prunus serrulata</i> ‘Kanzan’	22
1.1.2.4. <i>Prunus serrulata</i> ‘Kiku-shidare-zakura’	23
1.2. НАЧИНИ РАЗМНОЖАВАЊА ЈАПАНСКИХ ТАКСОНА ТРЕШЊЕ ...	24
1.3. КАЛЕМЉЕЊЕ И ФОРМИРАЊЕ СПОЈА КАЛЕМА	27
1.3.1. Инкомпатибилност калемљења: класификација и узроци настанка	29
1.3.1.1. Ђелијски механизми који доводе до појаве инкомпатибилности	31
1.3.1.2. Биохемијске основе појаве инкомпатибилности	35
1.4. КУЛТУРА КАЛУСНИХ ТКИВА И ПРОУЧАВАЊЕ ИНКОПАТИБИЛНОСТИ	41
1.4.1. Калус формиран под утицајем хормона из хранљивог медијума	46
1.4.2. Калус индукован озледама	47

1.5. ДОСАДАШЊА ИСТРАЖИВАЊА НА ПОЉУ ОПШТЕ ИНКОМПАТИБИЛНОСТИ ВРСТА РОДА <i>PRUNUS</i> И КОРИШЋЕЊЕ <i>IN VITRO</i> ТЕХНИКА	48
2. ЦИЉ РАДА	54
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА	56
3.1. ПРИПРЕМАЊЕ УЗОРАКА ЗА ПОВРШИНСКУ СТЕРИЛИЗАЦИЈУ ..	57
3.2. ИНДУКЦИЈА КАЛУСА ИЗ МЕРИСТЕМА БОЧНИХ ПУПОЉАКА	57
3.3. ИНДУКЦИЈА КАЛУСА ИЗ ВЕГЕТАТИВНИХ ДЕЛОВА МАТИЧНИХ БИЉАКА	60
3.4. УТВРЂИВАЊЕ ЈАЧИНЕ СПОЈА КАЛУСА ПОДЛОГЕ И ПЛЕМКЕ ...	62
3.4.1. Припрема узорака за утврђивање јачине споја визуелном оценом	63
3.4.2. Припрема спојева калуса за цитолошку анализу	64
3.4.2.1. Припрема трајних препарата	64
3.4.2.2. Припрема привремених препарата	67
3.4.3. Припремање узорака за хемијску анализу полифенола и укупне антиоксидативне активности	68
3.4.3.1. Одређивање укупних полифенолних једињења	69
3.4.3.2. Одређивање антиоксидативне активности	70
3.4.3.3. Одређивање састава фенолних једињења УНPLC течном хроматографијом – масеном спектрометријом (LC/MS)	71
4. РЕЗУЛТАТИ РАДА	74
4.1. УСПОСТАВЉАЊЕ СТЕРИЛНЕ КУЛТУРЕ НА ПРЕЛИМИНАРНИМ УЗОРЦИМА	74
4.2. РЕЗУЛТАТИ ИНДУКЦИЈЕ КАЛУСА ИЗ МЕРИСТЕМА БОЧНИХ ПУПОЉАКА И ВЕГЕТАТИВНИХ ДЕЛОВА ЛЕТОРАСТА	77
4.2.1. Индукција калуса из меристема пупољака три култивара култивара <i>Prunus serrulata</i>	77
4.2.2. Индукција калуса код врста коришћених као подлоге за калемљење	80
4.2.3. Анализа пораста масе и степен потамњивања индукованог калуса из меристема пупољака	86
4.2.4. Индукција калуса из вегетативних делова са адултних матичних биљака	93
4.2.5. Анализа масе калуса из супкултуре индукованог калуса	109

4.2.5.1. Динамика раста калуса у супкултури	109
4.2.5.2. Анализа релативног раста калуса (РРК) у супкултури	111
4.3. УТВРЂИВАЊЕ ЈАЧИНЕ СПОЈА КАЛУСА ПЛЕМКЕ И ПОДЛОГЕ ...	115
4.3.1. Успешност спајања <i>Prunus serrulata</i> ‘Amanogawa’ са различитим врстама подлога	115
4.3.2. Успешност спајања <i>Prunus serrulata</i> ‘Kanzan’ са различитим врстама подлога	128
4.3.3. Успешност спајања <i>Prunus serrulata</i> ‘Kiku-shidare-zakura’ са различитим врстама подлога	138
4.3.4. Успешност спајања <i>Prunus serrulata</i> као посредника са подлогама <i>Prunus avium</i> , <i>Prunus</i> ‘Colt’ и <i>Prunus serotina</i>	146
4.4. АНАЛИЗА САДРЖАЈА УКУПНИХ ФЕНОЛА (ТРС) И АНТИОКСИДАТИВНЕ АКТИВНОСТИ (RSA)	150
4.5. АНАЛИЗА САДРЖАЈА ПОЈЕДИНАЧНИХ ПОЛИФЕНОЛА У СПОЈЕВИМА РАЗЛИЧИТИХ КОМБИНАЦИЈА КАЛУСА	155
4.5.1. Анализа главних компонената (РСА) хомео и хетеропластичних спојева и фенолних једињења	159
4.5.2. Анализа главних компонената (РСА) хомеопластичних спојева старих 21 и 45 дана	163
5. ДИСКУСИЈА	166
6. ЗАКЉУЧЦИ	203
7. ЛИТЕРАТУРА	210
8. ПРИЛОЗИ	237

1. УВОД

Успех срастања подлоге и племке после калемљења зависи од степена сродности врста и ограничен је углавном на припадност истој фамилији, а за неке врсте и истом роду (Hartmann et al., 1997). Истраживања на пољу компатибилности код калемљења, односе се већим делом на врсте које су од великог значаја за област утилитарне хортикултуре, било повртарских (фамилија Solanaceae) или воћних и виноградарских врста (фамилије Rosaceae и Vitaceae). За украсне дрвенасте врсте знатно је мање радова који се баве физиолошким, хистохемијским, анатомским и другим аспектима подударности ткива компонената калемљења, иако је број родова код којих је забележена појава инкомпатибилности међу врстама и култиварима значајан: *Acer*, *Cornus*, *Juglans*, *Magnolia*, *Prunus*, *Quercus*, *Rhododendron*, *Sorbus*, *Tilia* (Tubbs, 1973; Hererro, 1951; Jonard et al., 1990; Грбић, 2004).

Посебну групу дрвећа, која је на прелазу између утилитарне и орнаменталне хортикултуре, чине украсни таксони подрода *Cerasus* који су интересантни посебно због разноликости цветова, различитог периода цветања и дужине трајања цвета тако и због специфичног хабитуса и/или боја листова и коре стабла. Јапанске цветајуће трешње из групе *Sato-zakura* трешања, означене као форме врсте *Prunus serrulata* Lindl., имају посебан значај за пејзажну архитектуру и хортикултуру широм света, па и код нас. Како се већина добија путем хетеровегетативног размножавања, потенцијално поље истраживања је компатибилност најчешће гајених култивара украсних трешања на нашем поднебљу са подлогама домаћих трешања.

Спајањем калусног ткива две врсте у условима *in vitro*, могуће је на релативно брз и поуздан начин добити одговоре о јачини и компатибилности споја. Рану детекцију пружају хистохемијске и анатомске анализе ћелија на споју, распоред и обојеност ћелијских зидова и присуство липида и фенолних компоненти у ткиву подлоге и племке. Како наводи Мооге (1981), одговор о компатибилности не захтева посебан стадијум развоја ткива ни присуство диференцираних ћелија и може се добити истраживањима калуса индукованог *in*

in vitro културом. Самим тим коришћење *in vitro* техника може бити значајно и за истраживање феномена компатибилности уз добру корелацију између *in vivo* и *in vitro* резултата спајања код хетеровегетативног размножавања.

Предмет истраживања ове докторске дисертације је анализа спојева калусног ткива између култивара јапанских трешања *Prunus serrulata* 'Amanogawa', *Prunus serrulata* 'Kanzan' и *Prunus serrulata* 'Kiku-shidare-zakura' са калусом обичне трешње (*Prunus avium* L.), врсте које се код нас најчешће користи као подлога за калемљење јапанских трешања. У циљу могућности коришћења још неких потенцијалних подлога за калемљење у истраживања су укључени и спојеви калуса поменутих култивара са калусом *Prunus* 'Colt' (*P. avium* L. × *P. pseudocerasus* Lindl.), *Prunus mahaleb* L. и *Prunus serrulata*. Поред тога, са калусом добијеним из ткива јапанске трешње (*Prunus serrulata*) извршено је испитивање могућности коришћења ове врсте као посредника у калемљењу између наших подлога и јапанских култивара. Као негативна контрола компатибилности подлоге и племке, спајани су калуси јапанских култивара са калусом сремзе (*Prunus serotina* Ehrh.) и калусом патуљастог клона крушке (*Pyrus communis* 'Pyrodwarf').

1.1. ОПШТЕ ТАКСОНОМСКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ И СИСТЕМАТИКА РОДА *PRUNUS* L.

Род *Prunus* L. обухвата око 200, већином листопадних, а ређе зимзелених врста, које су природно распрострањене на северној хемисфери од подручја Северозападне Африке – Марока и Алжира и подручја Мале Азије до јужних делова Скандинавског полуострва. Ка истоку су врсте овог рода распрострањене по читавој Азији, а род насељава велика пространства и у Северној Америци (Russell, 2003). Род припада подфамилији Prunoideae (Amygdaloideae, коштуњава воће), фамилији Rosaceae, реду *Rosales*, нареду Rosanae, подкласи Rosidae, класи Magnoliatae (Dicotyledones) и одељку Magnoliophyta (Angiospermae). О врстама које припадају богатој фамилији ружа, постоје богати фосилни остаци (цветови, плодови, семена, полен, листови и дрво) из доба еоцена – у Северној Америци, Европи, Азији, северној Африци и деловима Гондване на различитим локацијама.

Фамилија Rosaceae је 19. по величини биљна фамилија и укључује од 95 до више од 100 родова и 2830–3100 врста. Фамилија је космополитска до суб-космополитска и иако садржи врсте великих морфолошких различитости, како наводе Dickinson et al., (2002), заједно са морфолошким и хемијским проценама, анализама rbcL секвенци¹ снажно је подржана монофилија Rosaceae (Morgan et al., 1994). Како *gynoeseum* увелико варира међу врстама ове фамилије, ову варијацију Takhtajan (1997) користи за класификацију унутар фамилије и дели је на подфамилије: Rosoideae – са многобројним апокарпним тучковима који дозревају у ахеније; Amygdaloideae (Prunoideae) – један монокарпни тучак сазрева у коштуницу; Spiraeoideae – *gynoeseum* се састоји од два или више апокарпних тучкова који дозревају у мешак (foliculus); и Maloideae (Pomoideae) – плодник је сложен и инфериоран, а може се јавити и епигини тип плодника.

Потфамилија Prunoideae (Amygdalaceae) садржи родове економски веома исплативих врста познатијих као коштичаве врсте воћака, односно врсте са јестивим плодовима чији је ендокарп одрвенео, а који сазревају током лета (шљиве, брескве, трешње, вишње), или касније – бадем (као економски најважнија језграста врста воћака широм света). *Prunus serotina* Ehrh. је једна од дрвно економски важних врста чија је експлоатација на америчком континенту веома интензивна. Посебну групу ове потфамилије чине цветајуће трешње, које имају посебно место у орнаменталној хортикултури и пејзажној архитектури.

Према Lee & Wen (2001) модерној класификацији рода *Prunus* претходио је низ класификација насталих на основу морфологије плода или типа цвасти, али је за детаљнију поделу, родове било потребно анализирати филогенетски. У неколико студија покушано је да се изгради еволутивна веза између родова (Badenes & Parfitt, 1995), а анализа Mowrey & Werner (1990) са 34 врсте рода *Prunus* је остала најобимнија филогенетска студија. Мада поделу коју је дао Rehder (1940) следе истраживачи Charkevicz (1996) и Bartholomew & Li (2003), не подржавају је у потпуности Bortiri et al. (2001, 2002), Lee & Wen (2001) као и

¹ На основу анализе филогенетских група скривеносеменица (APG I, 1998; APG II, 2003), систем APG се заснива на анализи хлоропласта и рибозомалног кодирања гена у комбинацији са морфолошким карактеристикама уз помоћ којих се решавају недостаци и контроверзе у класификацији скривеносеменица.

Potter et al. (2007). Lee & Wen (2001), користећи нуклеинске рибозомалне ITS² секвенце показали су да подродови *Padus* и *Laurocerasus* нису правилно раздељени, а Bortiri et al. (2001, 2002) су реконструисали род *Prunus* и доказали исте тврдње.

Подржавајући ширу поделу рода коју су предложили Bortiri et al. (2001), Lee & Wen (2001) и Potter et al. (2007) и доказе до којих су дошли Chin et al. (2010), Shi et al. (2013) наглашавају да су неопходне промене у класификацији и да проблеми који се односе на решавање филогеније рода *Prunus* L. *sensu lato* (*s.l.*) далеко од тога да су решени, јер подаци из ограничених група нису довољни за разјашњење таксономских питања целог рода. Они показују да је род монофилетски и описују га као један род са 3 главна монофилетска кладуса (односно подрода): *Cladus I* – подрод *Padus* (припадају му врсте из родова *Laurocerasus*, *Maddenia*, *Padus* и *Pygeum*), *Cladus II* – подрод *Cerasus* (коме припадају праве трешње, и придружене су још две врсте које су раније третиране као врсте рода *Padus*³) и *Cladus III* – подрод *Prunus* (кладус се разилази на седам монофилетских подкладуса који се поистовећују са седам секција: *Amygdalus*, *Armeniaca*, *Emplectocladus*, *Microcerasus*, *Persicae*, *Prunocerasus* и *Prunus*. Секција *Amygdalus* и *Persicae* су блиске једна другој као ни једна друга).

1.1.1. Подрод *Cerasus* Pers.

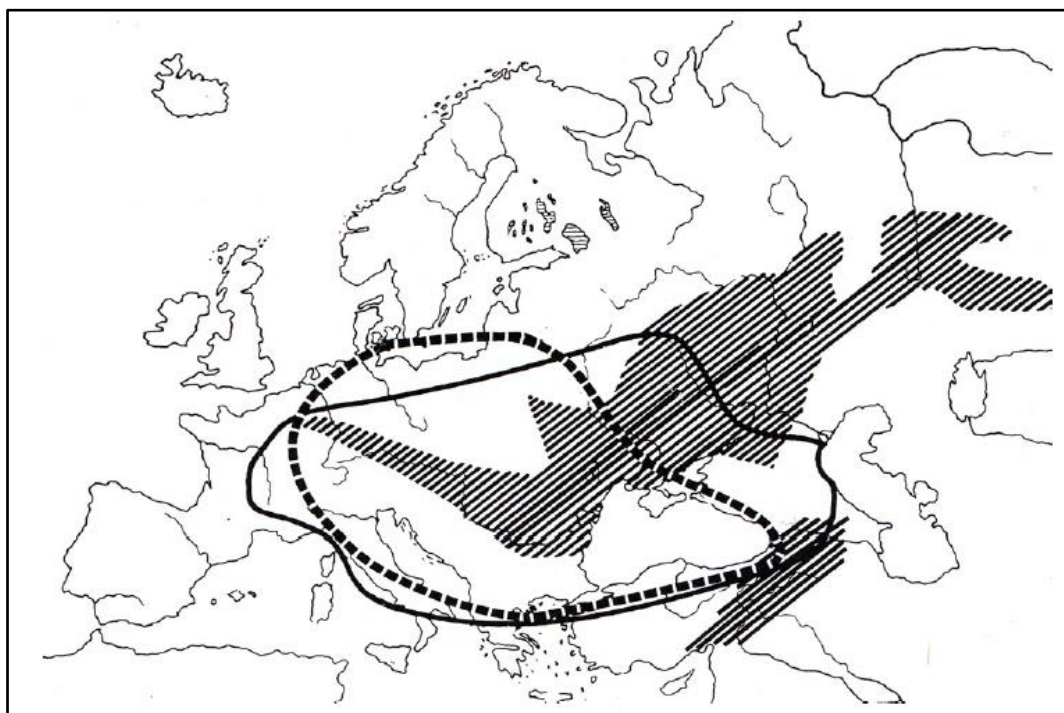
Watkins (1976) указује на то да су врсте у подроду *Cerasus* која укључује трешње, вишње и степску вишњу (*P. fruticosa* Pall.), биле рани преци врста рода *Prunus* и да је први диплоид *Prunus* врста, настао у централној Азији. Најранији опис „кератион“ долази од Theophrasta око 300 п.н.е. Layne et al. (1996) наводе да

² ITS (Internal transcribed spacer). Некодирајући региони који раздвајају индивидуалне компоненте јединица рибозомне DNA. Ти региони показују много више полиморфизма секвенце него сами генски региони, и због тога су као интергенски спајсери, користан извор генетичких маркера за рибозомни локус DNA.

³ Истраживања Shi et al. (2013) су показала да *P. mahaleb* L. и *P. maackii* Rupr. треба придружити подроду *Cerasus*. Ове две врсте су припадале роду *Padus* због типа рацемозне цвасти. За *Prunus mahaleb* је и Krüssmann et al. (1981) указао да је слична трешњама и да је диплоид, као и већина врста подрода *Cerasus* (док су врсте рода *Padus* тетраплоиди (Goldblatt & Johnson 1979-2012). Слични докази постоје и за *Prunus maackii* за коју су Li & Jiang (2001) утврдили да је природни хибрид *Prunus maximowiczii* Rupr. врсте подрода *Cerasus*.

је трешњу (*Prunus avium* L.) из Cerasunta на Црном мору у Рим донео 74 п.н.е. римски генерал Lucullus, а одатле је проширена у Немачку и Британију. После уношења трешања у Енглеску култивација се вршила и у осталим европским земљама. Култивација је резултирала стварањем неколико екотипова трешања и вишања, или степске трешње у различитим подручјима Европе, а делом и у Азији. Већина врста подрода *Cerasus* су самоникле у Европи и Азији (Rehder, 1940). *Prunus avium* и *Prunus cerasus* су пореклом из средње Азије, Иран, Ирак и Сирија (Vavilov, 1951). Још прецизније, вишња је пореклом из подручја Карпата, а трешња самоникло расте у Русији (северни делови Кавказа) и у северним деловима Француске.

Природни ареал трешње укључује умерени појас Европе, од северних делова Шпаније, до југоисточних делова Русије и Далеког истока, као и Северну Индију, са највећим уделом између Каспијског и Црног мора. Ширење у друга подручја је релативно споро и углавном уз помоћ птица. Поред тога, иако се трешње узгајају на великом подручју умереног појаса, било је мало покушаја да се даље шире ка суптропским крајевима. У прилог томе иде и чињеница да међу генотиповима трешања има сорти које захтевају хладан период.



Карта 1. Дистрибуције трешње (шрафирана површина); вишње (пуна линија) и степске трешње (испрекидана линија) према Faust & Suranyi (1997)

Центар порекла *Prunus fruticosa* Pall. је западна и централна Азија, посебно Русија (Watkins, 1976) и широко је распрострањена дуж читаве централне Европе, Сибира и северне Азије. Како има шире подручје дистрибуције (карта 1), које се поклапа и са центром дивље трешње, степска трешња – *P. fruticosa*, сматра се вероватно родитељем *P. avium* и *P. cerasus* (Fogle, 1975).

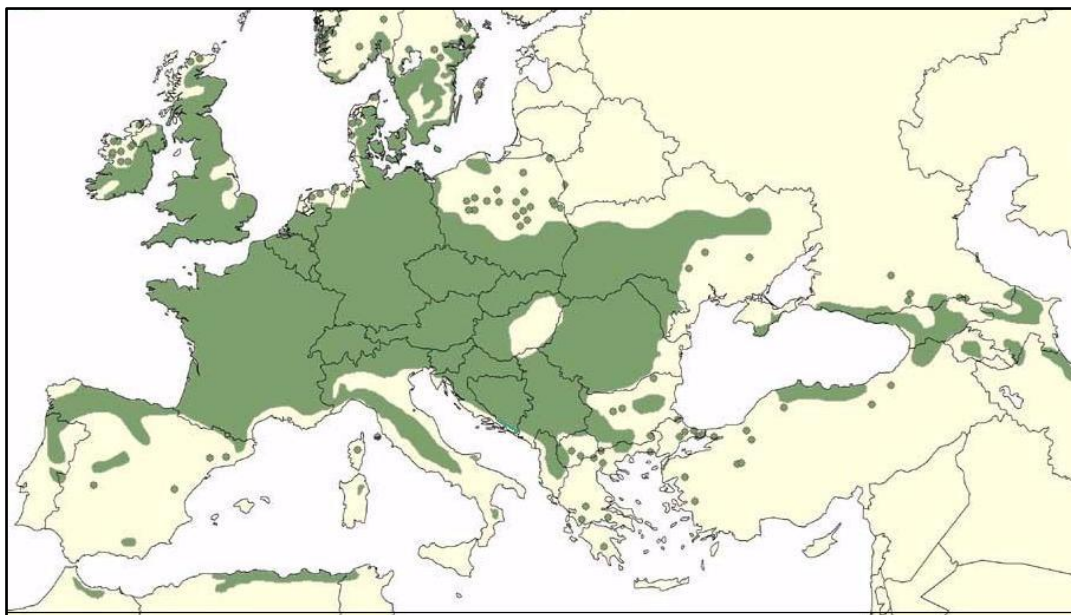
Полиплоидија је раширена појава у роду *Prunus* и од великог је значаја за развој нових врста или унутарврских таксона и са практичног становишта, јер су биљке са овим карактеристикама често врло снажне, а могу бити и отпорније на мраз и нападе паразитних гљива. Код рода *Prunus*, основни број хромозома у соматским ћелијама је осам. Због међуврсне хибридизације, полиплоидија се јавила у филогенији и одговорна је за самостерилност и интерстерилност врста овог рода. За вишњу *P. cerasus* L. која је сегментни алотетраплоид (Klagges et al., 2013) број хромозома је 32, а претпоставља се да је настала природном међуврсном хибридизацијом између трешње (*P. avium*, диплоид) и степске вишње (*P. fruticosa* Pall., тетраплоид) (Olden & Nybom, 1968).

Зависно од варијетета и регионалних климатских услова, трешње цветају од априла до маја од 5 до 26 дана. Трешња цвета пре вишње, мада им се време цветања може преклопити. Северноамеричке врсте трешања из подрода *Lithocerasus* (нпр. *P. besseyi* L. H. Bailey) које су добијене од азијских врста рода *Prunus*, управо због тога могу формирати генетски мост у хибридизацији између врста у подродовима *Cerasus*, *Amygdalus* и *Prunophora*.

1.1.1.1. *Prunus avium* L. (syn. *Cerasus avium* Moench.) –

дивља трешња, трешња врапчара

Родоначелник преко 2000 сорти трешања је само једна врста – *Prunus avium* L. или трешња врапчара. Она се среће у храстовим шумама и шумама доњег буковог појаса од Мале Азије на истоку, преко Кавказа до јужне и средње Европе на западу. Расте готово у читавој Европи, изузев северних и североисточних делова (карта 2).



Карта 2. Ареал дивље трешње: природне популације се распростиру од западног дела Азије до северног дела Африке. Дистрибуција се креће од 30°–60° географске ширине, а у вертикалном правцу и до 1.900 м.н.в. (Russell, 2003).

Дивља трешња је листопадно дрво, висине до 20 (25) m и пречника стабла до 50 cm, достиже старост од преко 90 година (Јовановић, 1967). Дивља трешња је брзорастућа врста. Висински прираст је интензиван у првих 40 година старости, а завршава у наредних 20 година. Има добру изданачку снагу па се среће и у ниским шумама. Крошња је широка и неправилна, у састојини високо формирана, са многобројним гранама и ретким лишћем. Гранчице су голе, светло-сиво обојене. Пупољци су зашиљени или јајасто-чуњаста са 6 или више голих љуспи, смеђе боје са сивим рубом. Пупољци су често нагомилани у основи дугачких изданака, па се из њих развијају привидни пршљенови грана. Листови су око 10 cm дуги (8–15 cm) и око 5 cm широки, елиптични, јајаста и објајаста у основи заокружени или клинасти, по ободу крупно тестерасти, а на врху зашиљени. Лист на лицу тамно зелен, млад у основи мало длакав, по ободу двоструко назубљен. Лисна петелјка је око 2 cm дуга и има на себи 1–2 црвенкасте жлезде (прилог 1). Понекад су жлезде смештене и на лисној површини, а понекад их уопште нема. Листови у јесен попримају црвену боју. Цвета у априлу, паралелно са листањем или нешто раније, у густим белим гроњама са дугим петелјкама. Плод је округласт, ситан, до 1 cm величине, углавном црвене или црне боје (мада може бити и жуте боје), са округлом коштицом и слатким или горким меснатим делом.

Плодовима се углавном хране птице које разносе семе које је дормантно. Назив који је у нашем поднебљу чест за дивљу трешњу –трешња врапчара – не одговара стварности, јер врапци не користе плодове дивље трешње за исхрану већ крупније птице и сисари – голубови, дроздови, чворци, шојке као и мали сисари и дивље свиње (Марковић, 2012). Према Јовановић (1967) дивља трешња се јавља већином појединачно, врло ретко у већим групама, претежно у мешовитим групама ниског раста и у средњим шумама, најчешће у мезофилним, а није ретка ни у топлијим шумама храста китњака и граба, те у планинским шумама букве, горског јавора и белог јасена и у неким другим шумским асоцијацијама. Као пионирска врста, насељава ивице шума и ливада где се јавља као пратећа, примешана врста. Показује добру отпорност на високе и ниске температуре. (Марковић, 2012) наводи да је крајња висинска граница 1.500 м.н.в. на предњим Алпима, а на јужним Алпима чак до 2.000. Дивља трешња није избирљива на тип земљишта, али свој оптимални раст постиже на неутралним и слабо киселим, дубоким земљиштима. Толерантна је у погледу киселости (рН 5.5–8.5), расте и на кречњачким рендзинама, али на њима постиже скромне димензије. Трешња као једна од најстаријих привредно искоришћаваних врста воћака се користи у исхрани људи, птица и животиња, а због раног и обилног цветања представља одличну пашу за пчеле. Чај од петелки одличан је диуретик и регулатор крвног притиска а форме трешње црних плодова, који садрже антоцијане имају дијетопрофилактичко и дијето-терапеутско дејство на вид. Погодна је за подизање дрвореда и пољозаштитиних појасева. Као подлога за калемљење користе се сејанци произведени од форми дивље трешње, глатке коре, ситних, црних и горких плодова, који касно сазревају.

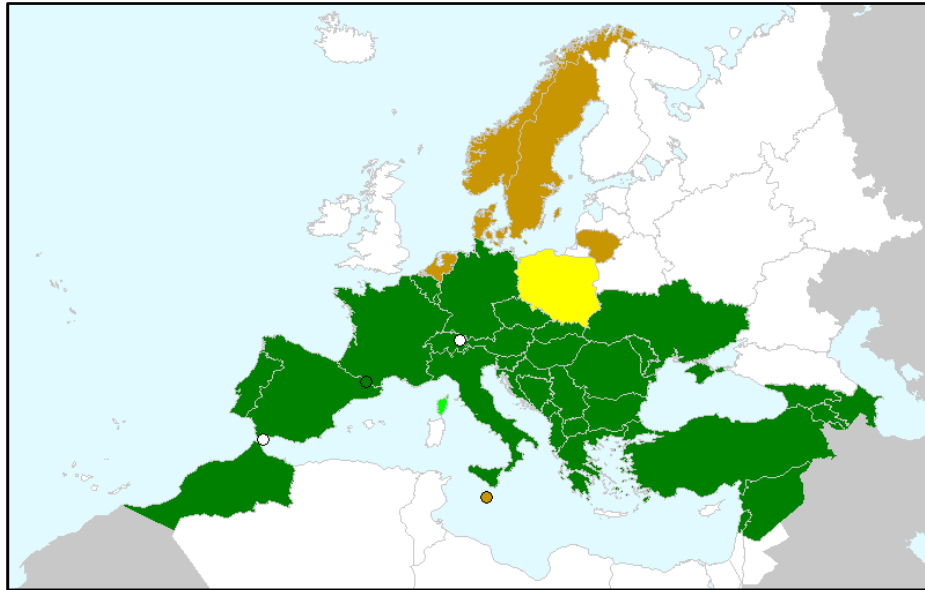
1.1.1.2. *Prunus* 'Colt' (*P. avium* L. × *P. pseudocerasus* Lindl.)

Култивари трешања се углавном размножавају калемљењем на генеративним подлогама дивље трешње (*Prunus avium* L.) и магриве (*Prunus mahaleb* L.), што има за последицу формирање доста бујних стабала. Новија достигнућа у воћарству поред измене сортимента уводе и слабо-бујне подлоге, које омогућавају примену новијих технологија гајења. То се првенствено односи на већи број стабала по јединици површине, мањи хабитус што поједностављује

многе помотехничке захвате у засаду, а чиме се постиже задовољавајућа родност. Једна од таквих подлога је ‘Colt’ – средње бујна вегетативна подлога за трешњу и вишњу настала укршањем *Prunus avium* и *Prunus pseudocerasus*. За подлогу је призната 1970. године. James et al. (1987) су у *in vitro* условима третирали калус ‘Colt’ колхицином и добили хексаплоидни клон бољих особина, чиме су превазишли проблем стерилности који постоји код триплоидног клона. Позитивна особина подлоге ‘Colt’ у односу на вегетативну подлогу F12/1 је у томе што се она лакше размножава у поређењу са њом, и код младица индукује боље дозревање. Ružić & Cerović (1987) су успешно развили протокол за *in vitro* размножавање ове подлоге. ‘Colt’ се често сади, односно користи у Калифорнији због отпорности на болести - на труљење корена изазвано *Phytophthora*, бактеријски рак и оштећења од глодара, али је подложна формирању гала; култивар је осетљив и на сува земљишта и зимске температуре. Према Ognjanov et al. (2007) ‘Colt’ је подударна подлога са свим племенитим сортама трешње и врло је распрострањена код нас и у свету (прилог 2).

1.1.1.3. *Prunus mahaleb* L. (Syn. *Cerasus mahaleb* (L.) Mill.) – рашељка, магрива

Магрива је дрво висине око 10 m са 35–40 cm широким деблом и разгранатом, округлом и светлом крошњом. Кора је дуго глатка и сјајна, касније избраздана око 1 cm дебела, а садржи, као и дрво, кумарин (мирис). Листови су округласти или широко јајасте, дуги 3–6 cm, по ободу ситно жлездасти, тестерасти, на лицу сјајни, на наличју длакави око нерава. Петелка листа је дуга око 2 cm, са или без 1–2 жлезде при врху (прилог 3). Цвета пре листања (април–мај). Цветови су бели, у гроњама по 12 (5–14) миришљави. Плод је црна округласта сочна коштунца око 10 mm величине, горког укуса. Сазревањем плод мења боју, од жуте ка црвенкастој, а у зрелом стању (јули–август) је црне боје. Коштица је глатка, бледожута 6 mm дуга, око 4 mm широка. Магрива је отпорна на мраз и на сушу, а нема велике захтеве у односу на земљиште. Ареал јој је велики: Европа, Молдавија, западна Украјина, Крим, Закавказје до средње Азије (карта 3).



Карта 3. Ареал магриве (*P. mahaleb*): природно распрострањење (зелена боја); непотврђено природно распрострањење (светло зелена); култивисана (жута боја); инвазивна врста (браон боја); (извор Botanic Garden and Botanical Museum Berlin-Dahlem, 2006, <http://ww2.bgbm.org/EuroPlusMed/>)

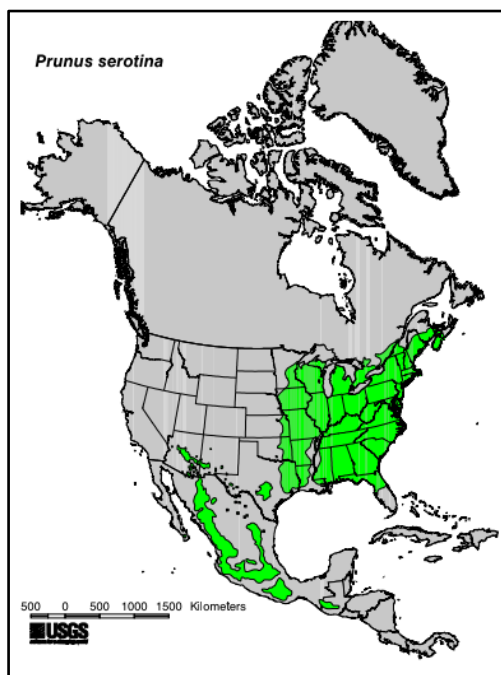
Код нас је једна од најсеротермнијих врста, честа је у шумама свезе *Ostryo-Carpinion orientalis*, на базичним, каменитим, топлим и сувим земљиштима са кречњачком подлогом (Јовановић, 1967). Залази дубоко и у унутрашњост континента, где је заступљена само на најтоплијим јужним падинама. Расте до око 1.500 м.н.в. Дрво има велику примену у кућној радиности.

У воћарској расадничкој производњи размножава се углавном семеном, што са собом носи одређене проблеме везане за дормантност семена и клијавост. Како наводи Milatović (2014) семе дуго сачува клијавост (и до 50 година). Као подлога, не подноси тешка земљишта, висок ниво подземних вода, задржавање воде у земљишту, нити обилне кише. Отпорнија је на смрзавање од дивље трешње. Првих 5 година има јачу бујност, а после тога се агротехничким мерама, подрезивањем корена и зеленом резидбом може врло успешно контролисати на нивоу потребном за интензивне густе засаде. Стабла калемљена на ову подлогу боље подnose сушу и раније пророде (Ognjanov et al., 2010).

Сејанци магриве су једна од највише коришћених подлога за трешњу и вишњу у свету. Нарочито је погодна за сува, песковита, каменита и кречна земљишта (Milatović, 2014).

1.1.1.4. *Prunus serotina* Ehrh. (Syn. *Prunus eximia* Small., *Cerasus serotina* (Ehrh.) Loisel., non (Roth) Poit. & Turpin.) – касна сремза

Подрод *Padus* се састоји од око 20 врста које расту у Азији (у Кини се гаји око 16 врста од којих су девет ендемских), три врсте расту у Северној Америци (*P. serotina*, *P. alabamensis* C.Mohr. и *P. virginiana* L.) и једна врста у Европи - *P. padus* L. *Prunus serotina* Ehrh. је врста чије је природно распрострањење источни део Северне Америке (карта 4), уз опсег интродукције широм Америке и Европе.



Карта 4. Ареал врсте *Prunus serotina*; <http://esp.cr.usgs.gov/data/little/prunsero.pdf>

Достиге висину од 30m, са пречником стабла од 70–120cm. Кора је ситно испуцала, тамнобраон боје, ароматична. Листови су издужено јајасте или ланцетасти, дуги 5–12 cm, широки 2.5–4,5 cm, на врху постепено зашиљени, при основи клинасти, по ободу ситно тестерасте са жлездицама на зупцима листа. Лист је на лицу сјајан, тамнозелен, на наличју светлији са густим беличастим длачицама до половине главног нерва које током вегетације попримају рђасту боју. При основи лисне плоче или у горњем делу лисне петељке налазе се крупне жлездице (прилог 4). Цветови су у цилиндричним гроздастим цвастима које су дугачке 10–14 cm и 2–3 cm широке, са по 40 цветова и 2–4 листа при основи. Коштуница је округласта, 8–10 mm у пречнику, у почетку црвена, при сазревању црна. Коштица је јајаста, 6–7 mm дуга.

На природним стаништима расте на богатом и влажном земљишту али добро подноси и сушу. Расте брзо, прилично је отпорна на мраз, нарочито је отпорна на дим и расте добро у градским условима. Врста има велики значај као економски експлоатисано дрво у САД. Размножава се и вегетативним и генеративним путем. Максимална продукција плода је у периоду од 30. до 100. године. Биљке плодносе сваке, или сваке друге године, зависно од услова станишта. После сече стабала или пожара, ова врста се јако брзо шири изданачки. Лист, посебно по опадању, садржи цијаногене гликозиде, који варењем прелазе у изузетно токсичну цијановодоничну киселину.

Ова врста је из Северне Америке интродукована у Европу још половином XVII века. Почела је да се користи у ветрозаштитним појасевима, затим за пошумљавање пожаришта и као врста која поправља квалитет земљишта. Половином XX века испоставило да је врста инвазивна и да као таква представља велики проблем у Немачкој и централној Европи где је од украсне и утилитарне постала инвазивна.

1.1.2. Опште карактеристике и систематика групе јапанских цветајућих трешања

Таксономија и номенклатура јапанских цветајућих трешања у фамилији Rosaceae, роду *Prunus* и подроду *Cerasus* (Rehder, 1940) и данас се сматра компликованом и још увек у потпуности неразјашњеном (Charkevicz, 1996; Bartholomew & Li, 2003). Према Rehder (1940, цитат по Milatović, 2014), цветајуће трешње своди у врсте подрода *Pseudocerasus*. Јапанске цветајуће трешње се у Јапану дуго гаје, још од феудалног *Edo* периода (1603–1868) и могу се наћи у многим вртовима и на јавним површинама у свету. Данас је познато више од 200 традиционалних сорти (Kobayashi, 1992) које показују разноврсне цветне карактеристике и особине које се ретко могу наћи у дивљини. Морфолошке студије о сортама цветајућих трешања су покренуте почетком двадесетог века од стране три истраживача Koidzumја из 1913. године Miyoshija и Wilsona 1916. године, а каснији радови су успоставили таксономију за ове сорте која је и данас широко прихваћена (Ohta et al., 2007). На основу морфолошких запажања, показано је да већина сорти потиче од природних јапански таксона и хибрида

између њих (Kuitert & Peterse (1999) али ове поделе сорти на бази морфологије требало би да буду потврђене анализама на генетским основама.

Основна карактеристика која групу јапанске цветајуће трешње одваја од осталих врста овог рода и разлог зашто се сврставају у посебну групу је њихов плод. За разлику од познатих представника из овог рода: трешње, вишње, шљиве, кајсије, брескве, нектарине, итд. чија су вредност углавном плодови, код цветајућих трешња плодови су ситни, црни и често нејестиви. Велики број дивљих цватајућих трешња је раширен у умереној климатској зони северне хемисфере, посебно у Источној Азији: 33 у Кини, 9 у Јапану и 5 у Тајвану. Карактеристика ових таксона је постојање стотине цветајућих украсних сорти, од којих је већина настала у Јапану. Велики значај цветајућих трешња се огледа кроз ритуал посматрања цвета трешња која традиционално траје већ преко 1.000 година. У време када су трешње у цвату, Јапанци славе повратак пролећа или *Hanami*. Назив за цветајуће трешње у Јапану је *Sakura* и то није назив само за врсту дрвећа. За трешњин цвет се може рећи да симболизује национални карактер јапанаца и односи се на кратко трајање цвета трешње, као алегорије на кратак живот самураја, који су у свако доба могли очекивати да ће жртвовати живот за свог господара. Једна изрека у Јапану гласи: „Трешња је међу цветовима исто што и самурај међу мушкарцима“. Друга чињеница која даје на важности цветајућим трешњама је за неке *Sakura* трешње ареал једино подручје Јапана. Због великог значаја као симбола Јапана, трешње су постале део културе ове нације. *Sakura* је поштована као најлепши и најважнији цвет. У Јапану реч *hana* (цвет) односи се на *Sakura*, а појам *hanami* (видети цвет) односи се само на изглед цвета трешњиног дрвета. Током цветања трешња⁴, паралелно траје и опадање латица што симболизује пролазност природе ствари и има посебан значај међу монасима у

⁴ Посматрање расцветалог дрвећа као обичај потиче из Кине, где је посебно развијен у време династије Танг, која је извршила значајан утицај на Јапан током периода Нара (710-794). У то доба више се пажње посвећивало гледању расцветалих шљива - уме (*Prunus mume* Siebold et Zucc. чији су народни називи и кинеска шљива или јапанска кајсија), које међу првима цветају на јапанским острвима. Током *Heian* периода (794–1185) све више се придаје важности јапанској трешњи, чиме ханами постаје синоним за сакуру. Од тада ће се у танка и хаику песмама под цветом мислити на трешњу. Термин „*hanami*“ први пут је употребљен за гледање трешња у роману дворске даме Шикибу Мурасаки „Прича о Генђију“, најстаријем светском роману, писаном почетком XI века.

Зен храмовима широм земље.

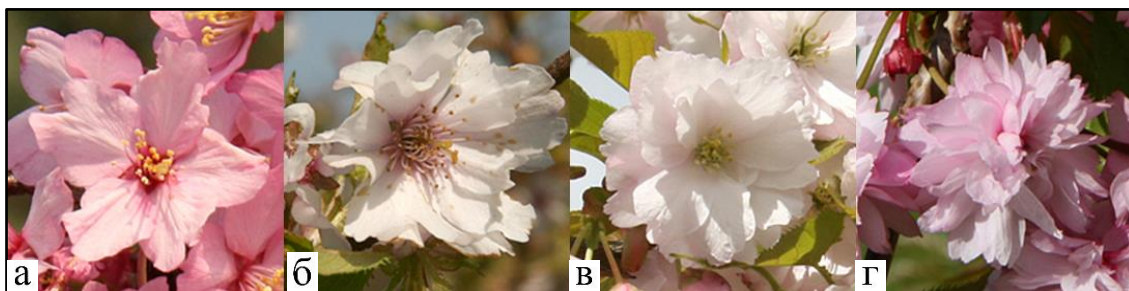
Током векова синтетисани су многи варијетети *Sakura*, са цветовима различитих боја и различитог времена цветања који се гаје у читавом Јапану. У топлијим јужним крајевима трешње цветају раније него у северним и због оријентације острва у правцу север-југ, цветање трешње у Јапану траје више од неколико месеци. Поред тога, геологија и топографија јапанског архипелага пружа могућности за регионалну или локалну разноврсност форми. Због младе вулканско геолошке формације, после вулканских ерупција настајале су нове форме као последица адаптивности биљака на нове услове средине. Регион планине Фуџи и оближњег залива Ошима су познати по уништавању и поновном оживљавању вегетације, па се у растојању од неколико стотина метара јављају потпуно различити типови вегетације. Као последица ове разноврсности многе цветајуће украсне трешње, које се разликују не само у боји већ и времену цветања, размножаване су и гајене у Јапану. На подручјима где је дошло до преклапања станишта, дошло је и до хибридизације, што је врло уочљиво у шумама Ибаракиа где је активна хибридизација у сталном процесу и јасно демонстрира колико промене класификације у таксономији могу зависити од природе. Ohta et al. (2007) анализирајући односе међу јапанским цветајућим трешањама указали су да подрод *Cerasus* има веома компликовану еволуциону историју у коју је укључена хибридизација.

Sato-zakura група цветајућих трешања

У Јапану су установљена два термина за разликовање дивљих трешања од оних добијених укрштањем: „*Yama-zakura*“ (планинске трешње) за дивље представнике и „*Sato-zakura*“ (баштенске, сеоске трешње) за гајене облике. Како наводи Russell (1938), не зна се тачна година када су настале „*Sato-zakura*“ трешње. Он помиње да најмање 150 *Sato-zakura* сорти датира између 794. и 1192. када су многе од њих засађене у вртovima. Иако су „*Yama-zakura*“ и „*Sato-zakura*“ древна народна имена за дивље и култивисане јапанске трешње, ови називи су и даље у употреби у Јапану. Израз „*Sato-zakura*“ се користи и на одговарајући начин у Енглеској за култивисане форме јапанских цветајућих трешања и поред јапанских аутора Makino (1901), Miyoshi (1916), британски научник Ingram (1945),

Hillier & Coombes (2002) и Bean (1950) користе ове термине за раздвајање сорти јапанских цватајућих трешања од дивљих врста. Израз „*Sato-zakura*“ је стога, установљен у јапанској и европској литератури (термин прихваћен и од стране International Code for Cultivated Plants, 2009) и јасно разликује оплемењене сорте познатог и непознатог порекла од дивљих таксона са важећим посебним ботаничким редом (Jefferson & Wain, 1984)⁵.

Цвет јапанских трешања (слика 1) садржи од 5 до 300 латица и према њиховом броју могу се поделити на 4 групе: са простим цветом - са 5 латица, полудупли цвет садржи од 10–20 латица и дупли од 25–50. Цветови који имају 100 и више латица су сврстани у групу означену као „пун хризантема цвет“. Повећан број латица у релацији је са смањењем броја прашника, што се код цветова типа хризантема – огледа у непостојању прашника. Такође има великих разлика у броју прашника, чак и на истој индивидуи. Боја латица варира, и мења се и током старења цветова, од пупљења до опадања. Неке од најчешћих боја, у преводу са јапанског језика, су: *beni* – ружичаст; *hana* – цветни; *kiku* – хризантема цвет; *nioi* – мирисан; *shidare* – жалостан; *yae* – дупли цвет; *zakura* – трешња (Keele, 1990). Специфичност цветова је и да се уз отворене цветове и развијене листове често формирају и издужени усечени залисци, дужине 5–7,5 cm.



Слика 1: Типови цветова јапанских трешања: а) прост цвет; б) полудупли цвет; в) дупли цвет; г) пун - хризантема цвет

⁵ Од 1900. године постоје покушаји неколико ботаничара и хортикултуриста у Јапану, Европи и Сједињеним Америчким Државама да створе таксономски ред и смање конфузију у номенклатури јапанских цватајућих трешања. Према (Jefferson & Wain, 1984) најчешће помињани су Veitch, „Hortus Veitchii“ из 1906; Koehne, „Die in Deutschland Eingefuehrten Japanischen Zierkirschen in Mitteilungen der Deutschen Dendrologischen Gesellschaft“ 1909; Koidzumi, „Conspectus Rosacearum Japonicarum“ из 1913; Miyoshi, „Japanische Bergkirschen ihre Wildformen und Kulturrassen“ 1916; Wilsonov „The Cherries of Japan“ из 1916; Miyoshi, „Oka gaisetsu“ из 1921; „The Oriental Flowering Cherries“ од Russell-a из 1934; Ingram „Ornamental Cherries“ из 1945; Ohwi „Flowering Cherries of Japan“ из 1973.

Култиваре је Russell (1938) у оквиру *Sato-zakura* групе поделио на: варијетете са жалосном формом грана, са усправном формом грана, са раширеним и усправним гранама који имају зеленкасто-жуте цветове, беле просте цветове, беле полудупле или дупле цветове, ружичасте просте или ружичасте полудупле или дупле цветове. Исти аутор бележи и запажање да према времену цветања, варијетети *Prunus yedoensis* Matsum., *P. subhirtella* Miq., *P. sargentii* Rehder и *P. campanulata* Maxim. цветају пре листања, а култивари врста *P. sieboldii* Witmack и *P. serrulata* отварају цветове паралелно са листањем.

Диференцијалне особине по којима се врши раздвајање различитих украсних трешања су број цветова у цвасти, величина цвета, дужина петелке и густина длачица на петелци. На основу морфолошких запажања показано је да већина сорти трешања *Sato-zakura* групе потиче од природних јапански таксона и хибрида између њих (Kuitert & Peterse (1999). Велики број украсних таксона цветајућих трешања довео је до конфузије у разврставању и таксономији која траје и до данашњих дана. Отежавајућа околност коју треба поменути је и уклапање назива одомаћених у Јапану са онима који се користе у осталим деловима света, где се украсне цветајуће трешње успешно гаје и даље укрштају ради добијања нових сорти. Први покушај да се класификују украсне трешње учинио је јапански биолог Miyoshi 1916. године који их је, објединивши све врсте украсних цветајућих баштенских трешања у групу *Sato-zakura* трешње, класификовао као форме врсте *Prunus serrulata* (иако све дефакто то нису биле) наводећи латинске преводе њихових јапанских имена, што је појашњавало описану форму Russell (1938). На пример, познат култивар 'Amanogawa' је описан као *Prunus serrulata f. erecta*. Већина латинских епитета су у међувремену претворена у имена сорти и тренутно су још увек у употреби у Јапану.

Тако настаје врло збуњујућа ситуација у којој западни хортикултуристи користе јапанске колоквијалне називе сорти, а јапанци сами користе латинске називе за те исте сорте (Jefferson & Wain, 1984). Целокупној конфузији која је владала у таксономској расподели врста и унутарврских таксона јапанских цветајућих трешања, допринела је и чињеница да су неки аутори сматрали да је *P. serrulata* комплекс варијетета полиморфне врсте: према Russell (1938), Wilson 1916. године описује дивљу форму цветајуће трешње са простим цветом која је

распрострањена у Азији и раширена ка северној и централној Кини преко Манџурије до Кореје и Јапана и назива је *Prunus serrulata* var. *spontanea* (Maxim.) E. H. Wilson., па *P. serrulata* обухвата два варијетета: var. *serrulata*, као основни типични варијетет и var. *spontanea* (касније описана као *P. jamasakura*).

Wilson-ова истраживања почетком двадесетог века у Јапану, показују такође да су готово све трешње са двоструким цветом у јапанским вртovima изведене од *P. serrulata* Lindley и *P. lannesiana* Wilson. Уствари, не постоји доказ за или против ове теорије, али аутор је склон веровању да су трешње са двоструким цветом настале као спортови матичних врста, које су јапански селекционари учврстили као сорте путем вегетативног размножавања (Jefferson & Wain, 1984). Ohwi (1973) и Ohba (1992) дају овом варијетету категорију врсте⁶ која расте у Кини, Кореји и Јапану. У настојању да се стандардизује ова сложена номенклатура, Jefferson & Wain (1984), користећи Hepburn систем (Hepburn-shiki) преведених јапанских знакова, објављују попис имена сорти који је готово у потпуности заснован на старим јапанском именима.

Јапанци су ову групу трешања увек звали *Sato-zakura* група (дословно, сеоске трешње) и предлажу овај назив као одговарајући. У Јапану, давно пре него што је оформљен International Code of Nomenclature for Cultivated Plants, ова група трешања је била позната по свакодневним именима или називима на дијалекту⁷ подручја одакле потичу. Kuitert & Peterse (1999) појашњавају да се у данашњој литератури јапанских извора, група свих баштенских сорти сврстава у подтаксон *Prunus lannesiana* док је према Међународном кодексу за културне форме признат назив *Prunus serrulata*. Неслагања по питању сврставања различитих варијетета у комплекс *P. serrulata* настављен је и током XXI века. Chang et al. (2007) дају

⁶ После интензивне студије јапанских ботаничара, раније описани варијетети врсте *Prunus serrulata* подигнута су на ниво врсте, јер је утврђено да су то природне (дивље) врсте трешања са називима: *P. jamasakura* (*P. serrulata* var. *spontanea*) и *P. lannesiana* (Carriere) Wilson (*P. serrulata* var. *lannesiana*) *P. sargentii* Rehder (*P. serrulata* var. *sachalinensis* (Fr. Schmidt) Wilson) као и *P. verucunda* (*P. serrulata* var. *pubescens*) и ови називи су прихваћени од стране RHS.

⁷ Одређени јапански расадници као што је Yokohama расадник, који је извозио биљке у Еуропу и САД крајем деветнаестог и почетком двадесетог века, користи та имена у својим каталозима, па су самим тим то имена по којима су први пут постали познати у западној хортикултури. У својим каталозима за 1905. године, на пример, у овом расаднику наведено је укупно четрнаест форми, међу којима су и позната имена као што су 'Ama-no-gawa', 'Kanzan' (као 'Sekizan'), 'Shirofugen', 'Washino-o' и 'Ukon'.

опсежну морфолошку анализу листова, делова цвета и плода на основу које постављају нове закључке и неслагања са поделама које помињу претходни аутори.

Поделе на бази морфологије потврђене су за неке сорте анализама генетских основа уз коришћење молекуларних маркера (Ma et al., 2009; Kato et al., 2012, 2014). Kato et al. (2014) сумирају истраживања и изводе осам јапанских таксона који су релевантни за историју укрштања и добијање нових сорти. За варијетет, који се у најчешће помиње под називом *Prunus lannesiana* (Cart.) Wilson var. *speciosa* (Koidz.) Makino са домаћим називом Oshima трешња, у ширим научним круговима се сматра да је одиграла важну улогу у развоју групе *Sato-zakura* трешања. Морфолошке анализе указују да култивари *P. lannesiana* (на западу познати као култивари *P. serrulata*) воде порекло од *P. lannesiana* var. *speciosa*. Kato et al. (2012, 2014) потврђују да око половине генома ових култивара припада кластеру *P. lannesiana* var. *speciosa*, а код скоро свих култивара је откривена сигнификантна здруженост и са врстом *P. jamasakura* (око 30% генома је смештено у кластер *P. jamasakura*). Из свега изнетог је јасно да култивари *P. lannesiana* (односно *P. serrulata*) нису једноставни хибриди између ове две врсте и да су свакако у вези и са осталим дивљим таксонима. Према наводима International Code of Nomenclature for Cultivated Plants (2009), група украсних трешања *Sato-zakura* означена је као култиген⁸ *Prunus serrulata Sato-zakura group*.

1.1.2.1. *Prunus serrulata* Lindl.

(Synonym(s): *Cerasus serratifolia* Carrière, *Cerasus serrulata* (Lindl.) G. Don ex Loudon, *Padus serrulata* (Lindl.), *Prunus serratifolia* Booth ex Salomon, *Prunus*

⁸ Култиген (од латинског *cultus* - гајен, и *gens* - врста, тип) је културна биљка (или у животињском царству, домаћа животиња) који нема одговарајућу дивљу форму од које је потекла. Ово може да се деси из два разлога: (1) као последица изумирања дивљег облика или (2) због толике измењености културног облика да он може да се класификује као друга врста или подврста. Термин је настао 1918. године, а у науку га је увео американац Liberty Hyde Bailey (1858–1954) хортикултураиста и ботаничар, саоснивач Америчког удружења за хортикултурне науке (American Society for Horticultural Science), са жељом да се именују посебне категорије културних биљака насталих свесном активношћу човека, а које не могу да се уклопе у Линеову класификацију, односно ону која се користи у ботаничкој номенклатури (International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants - ICN) или номенклатури културних биљака (International Code of Nomenclature for Cultivated Plants).

tenuiflora Koehne. Јапански назив: Yama zakura; енглески назив: Oriental cherry, East Asian cherry.

Prunus serrulata је први описао Lindley 1830. године, мада се као врста може пратити унатраг још од петнаестог века, као култивисана форма са дуплим белим цветовима. Wilson 1916. године мења назив у *Prunus lannesiana* (Carriere) Wilson описујући следеће карактеристике: „Листови зелени или мало у горњем делу црвенкасти, светлозелени на наличју; наzubљени; цветови розикасти или бели, мирисни; кора глатка, бледосива“. Многе врсте украсних трешања пореклом из Азије прво су у Европи постале познате по облицима вртних сорти које су се разликовале од дивљих потомака у дуплим цветовима или неким другим карактеристикама (Jefferson & Wain, 1984). За *Prunus serrulata* се сматрало да је настала од брдске трешње Кине и Јапана, која се морала издвојити као *Prunus serrulata* var. *spontanea* (Maxim.) Wils. (данас призната као врста *P. jamasakura* Sieb. ex Koidz.). Касније, када су дивљи примерци откривени и било је потребно дати им име, морали су се водити као варијетети првоописаних вртних индивидуа.

По опису морфолошких карактеристика, *Prunus serrulata* Lindl. расте до 15 m висине са црнкастом или смеђесивом танком и глатком кором са бледом траком лентицела и широке овалне, густе крошње. Листови елиптични до округласти са ушиленим или витким врхом и широко клинастом, срцастом или округластом основом. Величине од 6–12 cm ширине 3–6 cm и наzubљеним или двоструко наzubљеним ивицама. На лицу зелени, голи, на наличју плавичастозелени, са длачицама по средњем нерву и смеђим длачицама у угловима нерава. Лисна петељка дуга 2–3 cm, са 1 до 4 мале тамно браонкасте жлезде које се налазе на петељци листа. Цвета пре или паралелно са отварањем лисних пупољака, током априла. Боја цветова је ружичаста а приликом отварања се мења ка белој. Цветови су прости или полупуни 2–3,5 cm у пречнику, у цвастима их је од 2–5, понекад слабо миришљави. Плод је месната, овалана коштуница, сјајна и црна када је зрела. Елиптична је са нешто извученим врхом, дуга око 8 mm, није јестива.

Врста је толерантна на промене рН вредности земљишта, али најбоље расте на благо киселим земљиштима. Ако је на алкалним земљиштима, могу да се појаве симптоми дефицита Mn у виду хлорозе дуж нерава посебно млађих

листова. Врста није толерантна на задржавање воде у зони корена јер се у супротном веома брзо шири фитопфтора (Jacobs & Johnson, 1996). Најбоље расте на умерено влажним, добро дренираним земљиштима чиме се смањује потенцијална појава патогена.

Спада у врло варијабилне врсте која формира природне хибриде са блиским врстама, као што су *P. sargentii* и *P. speciosa* што је разлог постојања великог броја различитих форми у Јапну, Кореји, Кини и остатку света. Велики број варијетета јапанских трешања се убраја у варијетете ове врсте, али се према таксономској систематизацији NCBI⁹ Кине и Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, April 2013¹⁰, у списку који следи наводе следећи варијетети:

1. *Prunus serrulata* var. *pubescens* (Makino) E.H. Wilson

Синоними:

- *Prunus verucunda* (Koidz.) Koehne
 - *Cerasus leveilleana* (Koehne) H. Ohba
 - *Prunus leveilleana* Koehne (према: Krussmann)
 - *Prunus quelpaertensis* Nakai
 - *Prunus serrulata* var. *tomentella* Nakai

2. *Prunus serrulata* var. *spontanea* (Maxim.) E. H. Wilson

Синоними: *Prunus jamasakura* Siebold ex Koidz.

3. *Prunus serrulata* var. *hupehensis* Ingram

4. *P. serrulata* var. *sachalinensis* (Fr. Schmidt) Wilson

Синоними: *P. lannesiana* (Carrière) Wilson), *P. sargentii* Rehder

5. *Prunus serrulata* var. *lannesiana* (Carrière) Makino

Синоними:

- *Cerasus lannesiana* Carrière
- *Cerasus serrulata* var. *lannesiana* (Carrière) T. T. Yu & C. L. Li
- *Prunus lannesiana* (Carrière) E. H. Wilson

⁹ (The National Center for Biotechnology Information, <http://eol.org/pages/632451/names>)

¹⁰ (http://eol.org/pages/632451/hierarchy_entries/52830573/names/synonyms)

- *Prunus serrulata* var. *pendula* Bean

6. *Prunus serrulata* f. *albida* Makino

Синоними:

- *Prunus speciosa* (Koidz.) Nakai - Oshima cherry
 - *Cerasus speciosa* (Koidz.) H. Ohba
 - *Prunus jamasakura* var. *speciosa* Koidz. (basionym)
 - *Prunus lannesiana* f. *albida* E. H. Wilson
 - *Prunus lannesiana* var. *speciosa* (Koidz.) Makino ex Ohwi

1.1.2.1. *Prunus serrulata* ‘Amanogawa’

(syn. *P. serrulata* f. *erecta* Miyoshi; *P. lannesiana* f. *erecta* (Miyoshi) Wils., *P. lannesiana* var. *erecta*)¹¹ - бела усправна трешња

Овај култивар украсне трешње има изразито узан хабитус посебно док је стабло младо. Касније се крошња делимично рашири али је то идеално ниже дрво усправне форме. Име значи „небеска река“ или „млечни пут“. На западу овај култивар називају стубастом трешњом. Цветови су благо мирисни, једноструки или полу-дупли, са (5) 9 (15) латица, врло бледо ружичасте боје или готово беле (прилог 5 и 6). Цвета крајем априла, почетком маја а младо лишће је жућкасто-бронзане боје пре опадања (<http://botanyboy.org/japanese-cherry-trees-and-hanami-the-japanese-cherry-blossom-viewing-season/>).

Ohwi (1973), овај култивар наводе као *P. lannesiana* Wilson cv. *erecta*, док је у Сједињеним Државама и Европи познат као *P. serrulata* cv. *Amanogawa*. Латински епитет *erecta* (синоним за *Amanogawa*) први пут се користи у Јапану од стране ботаничара Miyoshi 1916. године, као назив којим се номенклатура за све врсте јапанских цватајућих трешања усклађивала са „Међународним Кодом Ботаничке Номенклатуре“ тог времена у Европи и Америци (Jefferson & Wain, 1984).

¹¹ Према наводима Jefferson & Wain (1984) сви релевантни називи и синоними за овај култивар су: *Amanogawa* Sakamoto по Kozen-у из 1830. године као *P. pseudo-cerasus amanogawa* по Galloway из 1907. године и *Amanogawa* према Sano из 1970. године, Hillier & Sons 1974 и Bean (1950) воде га као *P.* cv. *Amanogawa*. са синонимима *P. lannesiana* cv. *Erecta* и *P. serrulata* f. *erecta* према Miyoshiju. Nara га 1970 назива *P. lannesiana* f. *multiplex* и *P. serrulata* f. *multiplex*.

1.1.2.2. *Prunus serrulata* ‘Kanzan’

(syn. *Prunus serrulata* ‘Kanzan’ = *Prunus serrulata* ‘Sekiyama’¹² (syn. *Prunus serrulata* ‘Kwanzan’ или *Prunus serrulata* ‘Kansan’, *P. serrulata* f. *purpurascens* Miyoshi; *P. serrulata* var. *sachalinensis* f. *sekiyama* (Koidz.) Wils.; *P.* ‘Sekiyama’; *P.* ‘Kwanzan’)

Овај унутарврсни таксон је уствари хибрид настао укрштањем *Prunus donarium* Sieb., *P. lannesiana* Sieb. и *P. serrulata* Lindl. и понекад се класификује као култивар ове три поменуте врсте. Kanzan (назив који се на подручју САД изговара и пише Kwanzan) и Sekiyama су два превода идиограма за кинеску свету будистичку планину; први је кинески назив како се изговара у Јапану, а други назив је име на јапанском. Према међународном кодексу номенклатуре културних биљака (ICNCP, 2009) име сорте се пише одмах после назива рода (у случајевима када је сорта настала укрштањем две или више врста), на пр. *Prunus* ‘Kanzan’, када је у питању култивар међуврсног хибрида уз препоруку да се користи *Prunus serrulata* ‘Kanzan’. Иначе ово је најчешће гајена трешња од свих из *Sato-zakura* групе. Дрво је јако и масивно, висине око 10–12 m, ширине до 10 m. Брзорастућа је врста, са широком круном. Олиставање креће паралелно са цветањем крајем априла, почетком маја, а листови су бронзане боје приликом отварања. Листови су веома велики. Јесења боја лишћа је наранџасто-бронзана (прилог 7 и 8). Цветови су велики, дупли, са 20–30 (50) латица, тамно ружичасто-розе, који бледе временом; чашични листићи су неназубљени. Боље подноси мраз од већине врста из *Sato-zakura* групе.

Овај култивар јапанских трешања, значајну примену има у проучавању вирусних обољења, односно откривању зараженог садног материјала, тзв. „индексирању“ латентних вируса, посебно у области воћарства. Како наводи

¹² Аутори су имали проблем и због романизације у заступању јапанских имена и термина на енглеском језику са словима латиничног алфабета. Јапанска имена у кањима (знаковима) могу се изрећи на више начина, што је резултирало и различитим писменим приказима. Према Jefferson & Wain (1984) на пример, „sekiyama“ се може појавити на енглеском језику као „sekizan“ или „kanzan“; „taguiarashi“ може бити представљени као „ruiarashi“ и „ruiran“, или „taguiran“; и „shirayuki“ може као „shiroyuki“, „hakusetsu“, „hakuuyuki“ или „byakusetsu“. „Kwanzan = Sekiyama“ по наводима Jefferson & Wain (1984), Gashu као *P. lannesiana* f. *masuyama*. „Miyoshi *P. serrulata* f. *purpurascens* subf. *pallida* и Ingram-у Masuyama као синоним за *P. serrulata* *sekiyama* и Wilson-у као *P. lannesiana* f. *mazakura*.

Грбић (2004) пошто се вирусне болести преносе калемљењем, метода се може искористити за доказ присуства вируса код биљака код којих се не испољавају симптоми болести. На подлогу (биљку коју испитујемо), калем се одговарајућа племка, која има особину видног испољавања присуства вируса (кратку инкубацију) па се присуство манифестује уколико они постоје у подлози. У овим истраживањима два култивара јапанских украсних трешања су нашла широку примену: култивар ‘Shirofungen’ и ‘Kanzan’. Zilkah et al. (1995) су успешно индексирани вирус (PNRSV) код два култивара трешње калемљењем на култивар *Prunus serrulata* ‘Shirofungen’. Nemeth et al. (2010) износе обимне резултате о детекцији различитих вируса на украсним дрвенастим врстама коришћењем истог култивара у процесу индексирања. Сличним методама калемљења у условима *in vitro*, култивар ‘Kanzan’ се користи за детекцију вируса код разних врста трешања и вишања иако нема трајније компатибилност са различитим врстама са којима се спаја у циљу детекције вируса. Према наводима Li & Mock (2005), Matic et al. (2009) рутинска детекција CGRMV вируса (cherry green ring mottle virus) се изводи уз помоћ теста калемљењем култиваром ‘Kanzan’, методом која је призната од стране FPS (Foundation Plant Services) и NRSP5 (National Research Support Program 5) (Rowhani et al., 2005). Истраживања вируса трешања и вишања у Србији такође су рађена индексирањем уз помоћ култивара ‘Kanzan’ (Mandić et al., 2007).

1.1.2.3. *Prunus serrulata* ‘Kiku-shidare-zakura’

(syn. *Prunus jamasakura* ‘Plena-pendula’, *P. serratifolia rosea*, *Prunus* ‘Kiku-shidare-zakura’, *P. serrulata* ‘Cheal’s Weeping Cherry’, *P. serrulata* ‘Double Pink Weeping’)

Ова жалосна форма оријенталне трешње из *Sato-zakura* групе је стари јапански култивар који је унет у Европу око 1915. године. Култивар хризантемског цвета чешће се спомиње у литератури на енглеском језику, у Европи, Аустралији и Америци као Cheal’s жалосна трешња где је много познатији култивар него у Јапану. По Russell (1938), Miyochi помиње овај варијетет само на два локалитета и наводи да су непознати разлози зашто у Јапану овај варијетет није заступљенији. Недоумице око тачног назива ове трешње са хризантема пуним цветовима и данас нису разјашњене. Наиме, конфузија око имена овог култивара настала је употребом епитета „rosea“ који је Wilson (1916)

искористио да би описао жалосну форму *Prunus serrulata* Lindl. 'Rosea' (Syn.: *Prunus serrulata* Lindl. 'Roseo Plena', *Prunus serrulata* Lindl. 'Kiku-shidare-zakura') са дуплим цветом (weeping chrysanthemum cherry). По неким ауторима укључујући и Hillier & Coombes (2002), 'Kiku-shidare' је исти култивар у Европи познат као 'Cheal's Weeping'. Насупрот томе, Tuitert истиче да је култивар 'Kiku-shidare-zakura' уствари култивар 'Cheal's Weeping cherry' који потиче из Енглеске и да је добијен култивацијом 1915. године као спорт култивара 'Kiku-shidare', који има тање и полегле гране са „не тако много цветова“ на њима. Култивар 'Kiku-shidare-zakura' често се поистовећује и са другим висећим трешњама са двоструким цветом, као што је *P. subhirtella* var. *pendula* ('Yae-beni-shidare') чији су цветови крупнији и са већим бројем латица.

P. serrulata 'Kiku-shidare-zakura' је ниско дрво, до 4 m висине са гранама које су извијене или донекле висеће; гранчице светле жућкасто смеђе. Цветови су розе боје, величине до 3 cm (спадају у ситније цветове) у кластерима их је 4–6. Латице ушиљене и има их од 75–125 и цвет потсећа на цвет хризантеме (опис имена варијетета). Цвета током друге половине марта и прве половине априла. По мирисној ноти, 'Kiku-Shidare-zakura' је аналог 'Sekiyama'. Листови су 8–10 cm дужине, а ужи су од листова већине трешања из *Sato-zakura* групе. Млади листови су бронзанозелени, касније са лица тамно зелени, сјајни, истакнуто назубљени. Кора стабла је црвенкаста. Због повијених грана, 'Kiku-shidare-zakura' (прилог 9 и 10). се обично калема у круну. Врсти одговарају богата и влажнија земљишта (која су добро дренирана), чак и тешке глинуше, осим у случајевима кад земљиште постане забарено током зиме. Подноси кречњачка и алкална земљишта (pH од 5,5–8,5). Може да расте и у сенци (слабије цвета) иако јој више одговарају осунчана станишта. Расте и до 1.600 m.n.v. Врста је врло подложна смеђој трулежи и бактеријском раку и обично страда од ових обољења.

1.2. НАЧИНИ РАЗМНОЖАВАЊА ЈАПАНСКИХ ТАКСОНА ТРЕШЊЕ

О начинима размножавања украсних трешања доста детаља се може наћи и у старијој литератури. Тако Russell (1938) наводи да се све врсте украсних трешања са једноструким цветом које плоносе, могу размножавати семеном. То

се односи и на врсту *Prunus serrulata* уз напомену да треба водити рачуна да није дошло до укрштања током опрашивања са другим врстама украсних трешања које раније цветају. Према даљим наводима истог аутора, размножавање резницама није давало већег успеха, односно метод се препоручује само у областима са блажом климом. Зрелим резницама узиманим у фебруару и побаданим у песак на отвореном, проценат ожиљавања је око 30%, док исти метод примењен у стаклари даје око 90 % ожиљених резница. Од других метода вегетативног размножавања успешно се примењује и полагање, али се мора рачунати са мањим фактором мултипликације.

Грбић (2004) наводи да је култиваре *Prunus serrulata* могуће размножавати у јуну уз коришћење 0,8 % ИВА, а Lamb et al. (1975) истим поступком добија око 80–100 % ожиљених полузрелих резница култивара ‘Kanzan’ узетих током јула, уз употребу 1% ИВА. Међутим, култивар ‘Amanogawa’ се слабо развија после ожиљавања. Поред фитохормона ИВА, Hartmann et al. (1997) наводе да се култивар ‘Kanzan’ добро ожиљава зеленим резницама применом quick-dip методе (NAA: 1 и 5 g/L) под мистом.

Као најчешћи метод у производњи украсних трешања ипак се користи калемљење, било окулирањем (најчешће на спавајући пупољак од јула до септембра) или копулирањем (у фебруару, марту). Russell (1938) наводи да се све украсне трешње добијају методама окулирања или копулирања које се изводе у различито доба године, зависно од временских услова, локалитета и жеља самог расадничара. У Калифорнији се са окулирањем почиње од средине јуна и траје до средине септембра, а на истоку САД, окулирање се изводи у августу или почетком септембра. У Вашингтону у расаднику специјализованом за украсне трешње окулира се у пролеће, са мирујућим пупољцима узиманим са грана које су биле на хладном. По пријему калема, подлога се превршава на око 30 cm од места калемљења, а после кретања пупољка, преостали део подлоге се преврши до самог пупољка (Russell, 1938). Од метода копулирања најчешће се примењује енглеско спајање на део корена обичне или јапанске трешње *Prunus serrulata*. Калеми се на висини од око 10 cm, на генеративним подлогама старости од једне до 5 година. Калемљење се врши у фебруару (најраније крајем јануара до раног маја, најкасније). Исти аутор бележи да Wilson 1916. године описује калемљење

украшних трешања у Јапану где метод изводе рутински, жене и дечаци на отвореном у марту месецу. У литератури новијег датума нема много другачијих података о калемљењу украсних јапанских трешања. Како наводи и Krussmann et al. (1981), *P. avium* је најбоља подлога за све јапанске украсне трешње које се калеме - најједноставније и са највише успеха копулирањем, у пролеће или окулирањем у јулу/августу. Исти аутор наводи да се у Холандији јапанске трешње калеме у пролеће из руке, са такође добрим успехом. У САД, подлога која се препоручује је *P. sargentii* Rehder мада Krussmann et al. (1981) наводи да дугогодишња истраживања ипак фаворизују обичну трешњу.

Hartmann et al. (1997) напомињу, да се поред обичне трешње користе и вегетативне селекције *Prunus avium* F12-1, генеративна подлога јапанске трешње *Prunus serrulata*, а за култивар *Prunus serrulata* 'Kanzan' може се користити *Prunus x dropmoreana* Skinner et Dropmore (*P. cerasus* L. x *P. fruticosa* Pall. x *P. maackii* Rupr.) као подлога. Davidsonia (2007) указује да инкомпатибилност код калемљења украсних трешања може претстављати значајан проблем, у толикој мери да, ако се одређени култивар може добити резницама или микропропагацијом ове методе изабери као начин размножавања. За домаћу трешњу као најчешћу подлогу, овај аутор наводи као непожељну, честу појаву изданака из подлоге које брзо надрастају племку. Погодна врста подлоге је и *Prunus serrula*, али је и у овој комбинацији могућа појава инкомпатибилности. Świerczyński & Stachowiak (2007) са успехом преко 75%, калеме у трећој декади априла на обичној трешњи и 'Colt' култивар 'Amanogawa' бочним спајањем на висини од 30 cm, енглеским спајањем 'Kanzan' на 100 cm висине и 'Kiku-shidare' на 150 cm. Macdonald (2006) препоручује 'Colt' као подлогу при калемљењу, свакако и због особине да је отпорна на *Thielaviopsis basicola* (црна трулеж корена трешње) и *Agrobacterium tumefaciens* (бактеријски рак корена). Поред ове подлоге, исти аутор наводи веома популарну подлогу за јапанске трешње у Великој Британији и Канади - *Prunus serrula* (енг. Birch bark cherry) са сјајном, изразито црвенкасто браон бојом коре: за добијање калема познатог под колоквијалним називом Sheraton Cherry Trees, на подлогу Mazzard F12/1 калеме се *Prunus serrula*, па се на висини од 1,5 m калеме култивар *Prunus serrulata* 'Kanzan'.

Од метода калемљења, у Британији се већ дужи низ година форкертова

метода показала као много погоднија од Т окулирања за култиваре украсних трешања. Коришћењем ове методе проценат успешности калемљења *P. serrulata* ‘Kanzan’ је повећан од 50 до 100%.

За култивар ‘Kiku-shidare-zakura’, Macdonald (2006) препоручује да се калем на висини од 1,5 до 1,8 m, али и да се користе калем гранчице које су дуже од уобичајених (25 до 30 cm), због добијања лепше крошње. Танка потпора се везује око подлоге и око племке после калемљења и чврсто утеже, што калем обезбеђује од лома ветром. Око споја се обавија и полиетиленска трака која потпуно прекрије племку, чиме се смањује и исушивање ветром. За култивар ‘Amanogawa’, специфичног усправног хабитуса, Грбић (2004) наводи могућност коришћења метода калемљења на отвореном и добијања садница са више стабала.

1.3. КАЛЕМЉЕЊЕ И ФОРМИРАЊЕ СПОЈА КАЛЕМА

Калемљење или хетеровегетативно размножавање (етерос- различит, други) је поступак којим се део једне биљке (племка, епибионт, пелцер) сједињује са делом друге (подлога, хипобионт) и срастањем сједињених делова добија нова биљка–калем. Комбинација два (или више, у случају посредника) генотипова у једној биљци, која се добија калемљењем, може дати неуобичајене карактеристике раста, које се разликују од оних које би се добиле да су се ови делови развијали одвојено. Неке од ових карактеристика имају велику вредност како у орнаменталној, тако и у утилитарној хортикултури. Избором различитих врста подлога могуће је побољшати способност прилагођавања одређене сорте климатским и земљишним условима и модификовати разне друге особине сорте, као што су бујност, брзина ступања у род итд.

Процес спајања се одвија при повређивању ткива и спајању неиздиференцираног калуса једног или два различита организма, а заснива се на особини биљних организама да међусобно срастају. Срастање ткива виших биљака могуће је и међу индивидуама различитих врста, чак и родова, па се сходно сродности подлоге и племке, могу разликовати 1) аутопластична трансплантација (племка и подлога припадају истој индивидуи), 2) хомеопластична (када припадају истој врсти), и 3) хетеропластична (када

припадају различитим врстама). Способност регенерације недостајућих структура заснива се на двома особинама биљних ћелија: тотипотентности – особини коју су први објаснили Schleiden и Schwann 1838. и 1839. године, кроз теорију о тотипотентности ћелије по којој је биљна ћелија аутономна и способна да репродукује целу биљку (Грбић, 2004) и диференцијацији, способности неиздиференциране ћелије да се развије у ново ткиво. Приликом калемљења, између племке и подлоге се формира, као последица повреде, недиференцирана калусна маса. Пупољци на племци индукују, у наставку, диференцирање снопића, који се продужује и спаја са снопићем подлоге. Поларни правац диференцирања снопића је увек у правцу корена (Nešković et al., 2010) и подудара се са правцем транспорта ауксина, чиме је давно потврђено да је ауксин главни чинилац у том процесу.

После прављења реза на обе компоненте калемљења, иницијално се на пресеку формира некрозни слој (или изолациони слој ћелија) који временом нестане, или остане у цеповима (шупљинама) формираног калуса насталог активном деобом паренхимских ћелија. Недиференциране калусне ћелије које настају после повреде ткива, деле се и калусно ткиво формира перидерм озледе. Ова фаза се обележава као прва фаза. Формирање калусног моста—друга фаза је неопходна за успешно формирање споја: на месту пресека, живе ћелије показују високу цитоплазматичну активност што се огледа у распоређивању дихтиозома уз ћелијски зид најближи пресеку и лучењу везивног материјала у простор између ћелија који повећава адхезивност паренхимских ћелија које настају деобом тих ћелија. Нове паренхимске ћелије (калус) образују се обично у периоду од 1–7 дана из паренхима флоема и незрелих делова ксилема подлоге и племке (Грбић, 2004). Новостворене паренхимске ћелије са унутрашње стране некрозног слоја, ускоро пошто се повежу, попуњавају простор између подлоге и племке и формирају калусни мост на споју два калуса. На месту додира новоформираних паренхимских ћелија са камбијумом подлоге и племке долази до њихове диференцијације у нови камбијум кроз 2–3 недеље од калемљења. Ова фаза развоја споја калема је трећа фаза. И код дрвенстих и зељастих биљака, иницијални флоем и ксилем се углавном диференцирају пре диференцијације васкуларног камбијума преко калусног моста (Stoddard & McCully, 1979). Развиће

флоема увек претходи развићу ксилема, а с друге стране ксилем се никада не формира без флоема. Постоји претпоставка да је за диференцирање оба дела снопића, ауксин и ограничавајући и контролни фактор. Без ауксина не долази до диференцирања ниједног ткива али је праг концентрације ауксина за флоем знатно нижи, него за ксилем. Ова ниска концентрација ауксина довољна је да се индукује појава флоема, који преузима транспортну улогу. Тиме се количина ауксина који се транспортује значајно повећава, па се уз флоем диференцира и ксилем. Због тога се флоем може појавити без ксилема али обрнута појава није забележена (Nešković et al., 2010). Диференцијацијом калуса у васкуларне елементе директно се формирају иницијални флоем преко ситастих цеви и ксилем преко трахеја. Важно је да се васкуларни камбијуми споје и да се одржи веза озлеђеног ксилема и флоема, тако да се оствари секундарни развој спроводног система који је важан за успешно формирање камбијалног споја. Образовање спроводног ткива из камбијалних ћелија: елемената ксилема - са унутрашње стране и флоема - споља, представља последњу, четврту фазу.

1.3.1. Инкомпатибилност калемљења:

класификација и узроци настанка

Успостављање успешног споја између подлоге и племке је веома комплексан биохемијски и механички процес који подразумева тренутни одговор биљке после повређивања, формирање калуса и успостављање новог и функционалног васкуларног ткива између ткива оба биљна дела. Када се калеме различити генотипови, не формира се увек успешан спој, већ се испољавају различити видови инкомпатибилности. Hartmann et al. (1997) наводе да је инкомпатибилност калемљења потпун или делимичан неуспех срастања подлоге и племке који се може разматрати са различитих аспеката (физиолошких и анатомских) и веома је зависна од степена сродности калемљених компоненти па је компатибилност ограничена углавном на припадност истој фамилији. Поред тога, граница успеха и неуспеха калемљења између родова или чак између врста истог рода може бити врло уска. Како наводи Грбић (2004) код калемљења родова са великим бројем врста треба комбиновати врсте из истих унутарврских таксономских група (subgenus, sectio, subsectio, series, subseries). И мада је јасно да

је инкомпатибилност у вези са генетским различитостима између подлоге и племке, механизам по ком се испољава, није сасвим јасан.

Велики број генотипова који се могу комбиновати калемљењем дају широк опсег различитих физиолошких, биохемијских и анатомских интеракција после калемљења (Gur & Blum, 1973). Неки од визуелних симптома који могу да укажу на инкомпатибилност су: слаб развој пупољака племке или увенуће летораста племке, а интензиван раст изданака подлоге; понекад етиолиран лист, обилно цветање или рана промена боје листа у јесен и опадање; механичка слабост споја уз појаву хипертрофија на подлози и племци у близини споја и изразите разлике у структури и особинама коре подлоге и племке. Неподударне комбинације у пракси показују различите особине појављивања па могу довести до потпуног пропадања споја, понекад спој у почетку функционише успешно, али се постепено временом јављају симптоми изнурености, који доводе или до пропадања споја, или ненормалног развоја.

Ране класификације инкомпатибилности базирале су се, првенствено на разлици у симптомима који су се појављивали на калему (Argles, 1937). Недостатак овакве поделе се огледао у томе да се није правила разлика у узроцима настанка инкомпатибилности (услови средине, вирусне инфекције, слабо изведена техника калемљења итд). Касније класификације су се базирале на узроцима који су доводили до неуспеха спајања. Неггера (1951) класификује инкомпатибилност у 4 категорије: вирусом изазвано пропадање калема, лош развој пупољака, механички недостатак споја и развој ненормалних структура споја које су често у вези са диспропорционалном акумулацијом скроба.

Физиолошким факторима инкомпатибилности калемљења, бавио се Мосе (1962), који дели инкомпатибилност на преносни и локализован (непреносни) тип, мада је врло тешко разграничити симптоме који се јављају код оба типа. Локализован (непреносан) тип инкомпатибилности манифестује се преломом на месту споја (Herrero, 1951; Moose, 1962) и јавља се због абнормалности у васкуларном ткиву у самом калусном мосту (Hartmann et al., 1997). Непреносну инкомпатибилност могуће је превазићи са компатибилним посредником (interstock) између подлоге и племке. Посредник онемогућава физички контакт

подлоге и племке чиме се постиже физиолошки нормалан развој иначе инкомпатибилне подлоге и племке. У неким истраживањима, мембрански филтери који се умећу између ткива подлоге и племке показују да није неопходан физички контакт да би се развио инкомпатибилан спој (Moore, 1982, 1984). Преносна инкомпатибилност подразумева неподударност одређених подлога и племки код којих уметање посредника не превазилази инкомпатибилност. Делимично, неки биохемијски утицаји који пролазе кроз посредника проузрокују разградњу флоема. Овај тип инкомпатибилности се лако препознаје развојем некрозне линије на кори између подлоге и посредника.

У односу на временски период од извршеног калемљења до појаве симптома инкомпатибилности подлоге и племке, инкомпатибилност се може поделити на тренутну, делимично одложену и одложену. Уједно, ова подела је најпримењивија са становишта расадничарске праксе. Код тренутне, срашћивање подлоге и племке је незнатно или срастања уопште нема, а ако до срастања и дође племка пропада непосредно по активирању пупољака. Ако се инкомпатибилност јави у периоду између неколико месеци до 5 година, тада се може говорити о делимично одложеној инкомпатибилности, док се код одложене, инкомпатибилност може јавити и после 15 до 20 година (Грбић, 2004).

Без обзира на велики број радова који су се бавили овом проблематиком, како код зељастих (Moore & Walker, 1981; Jeffree & Yeoman, 1983; Wang & Kollmann, 1996), тако и код дрвенастих врста (Hartmann et al. 1997; Moore, 1986; Pina & Errea 2008), релативно су ограничене информације које се могу добити о механизмима који су укључени у ове процесе (систем ћелијске инкомпатибилности, формирање плазмодезми, спој васкуларних ткива), као и о биохемијским основама инкомпатибилности (утицај регулатора растења, пероксидазе, фенола, скроба, итд).

1.3.1.1. Ћелијски механизми који доводе до појаве инкомпатибилности

Истраживањима на нивоу ћелијских реакција калуса у процесу формирања споја између две компоненте калемљења, бавио се велики број истраживача. Прво документовање структуралног исхода са променама у ћелијским зидовима које се јављају током формирања калема код фамилије Solanaceae, описујући ћелијске

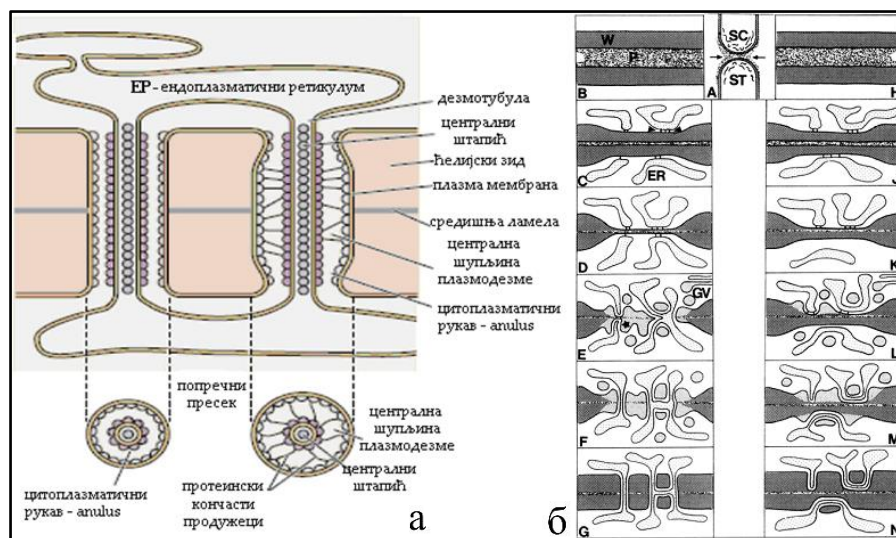
маханизме срастања подлоге и племке, објавили су Yeoman et al. (1978). Основу функционисања овог система они виде у молекулима протеина који се ослобађају из плазмолема, комбинујући се у комплекс са каталитичком активношћу који затим иницира развојне секвенце које доводе до формирања успешног споја. Када се овај комплекс не формира, током диференцијације између ћелија на споју, специјални протеин лектин проузрокује мутирајуће одбацивање ћелија калуса различитих ткива, што резултује инкомпатибилним калемом. Исти аутори претпостављају да је за успешно формирање споја код зељастих биљака, неопходно да се ћелије различитих компоненти калемљења препознају, већ при првом контакту. Насупрот овом становишту Moore & Walker (1981) наводе да само препознавање ћелија не мора бити фактор компатибилности калемљења у овако раној фази. Они сматрају да је иницијално спајање резултат отпуштања прекурсора из ћелијских зидова у простор између два ткива као одговор на озлеђивање и да не постоји ћелијско препознавање у овако раној фази формирања споја између подлоге и племке, већ да се оваква комуникација остварује тек приликом формирања васкуларног споја.

Фузија ћелија је једна од важних карактеристика ћелијског зида и диктирана је међућелијским везама преко формирања мреже полимера између целулозе и хемицелулозе које су неопходне за везивање суседних ћелија ткива подлоге и племке (Fry, 1988; Miller & Barnett, 1993). У калусном мосту, паренхимске ћелије подлоге и племке су међусобно повезане плазмодезмама (Moore, 1982). Ове цитоплазматичне нити, формирају континуиране, симпластичне ћелијске везе, повезујући ћелијске мембране тако да се формира могући међућелијски пут за комуникацију између ћелија у калусном мосту. Апопластичне везе се остварују помоћу зидова ћелија обе компоненте калемљења и држе се заједно путем екстрацелуларних капи које садрже смешу пектина, угљених хидрата и масних киселина.

Плазмодезме настају у току ћелијске деобе, при формирању примарне плоче између ћелија-сестара а могу и накнадно да се појаве између суседних ћелија које још нису диференциране и тада се зову секундарне плазмодезме. Секундарне плазмодезме развијају се независно од цитокинезе, потпуно *de novo* из постојећих ћелијских зидова (Lucas, 1999; Lucas et al., 1993, Ding et al. 1999).

Strasburger је 1901. године указао на формирање секундарних плазмодезми у свим неиздељеним зидовима између биљних ћелија и ткива разног порекла које нужно немају примарних плазмодезми. Осим тога, за секундарне плазмодезме може се очекивати да ће се формирати у свим оним издуженим ћелијама које пролазе кроз интензивано издуживање, да би се надокнадило прогресивно разређивање броја могућих, претходно постојећих примарних плазмодезми (Seagull, 1983).

Када калусне ћелије дођу у међусобни контакт, ћелијски зидови постају растворљиви и у њима се јављају отвори; плазмалеме се спајају и формирају се нове секундарне плазмодезме. Да би се разјаснио механизам формирања секундарних плазмодезми Kollmann & Glockmann (1985, 1991) су користили хетеропластичне спојеве калемова код биљака са специфичним субцелуларним маркерима. Формирање секундарне плазмодезме се дешава уз кооперацију оба партнера у споју уз синхронизовано тањење зида и прецизно позиционирање контаката еноплазматичних ретикулума супротних плазмодезми (слика 2).



Слика 2. а) Шематски приказ функционисања плазмодезме, прилагођена шема (http://www.bio.bg.ac.rs/materijali_predmeta/transport-kroz-simplast-2015.pdf)

б) А-Н: Формирање секундарних плазмодезми на површини калема. А. Приближавање калусних ћелија подлоге (ST) и племке (SC). Секундарна плазмодезма се развија у споју зидова у контактној површини (стрелице). Детаљи од А показују контакт зидова (W) и пектинског слоја (P) између. С-Г Места на којима се контакти зидова супротних делова синхроно тање и разређују (С и D), континуирано развијају секундарне плазмодезме од споја плазмалеме и еноплазматични ретикулум (ER) ћелије партнера (Е). У току обнове контаката зидова, разграната или једноставна плазмодезма се затвара голџијевом везикулом (GV) пореклом из материјала ћелијског зида (звездица у Е). I-N: Формирање испрекидане, половичне плазмодезме се јавља на местима где се асинхроно разређује зид супротних делова (K и L). Стрелица у С указује на непознате честице у међуспоју ER и плазмалеме (према Kollmann & Glockmann, 1991).

Као део овог процеса настају наново голци везикуле из појединачних дихтиозома. Дихтиозоми чине да излучене материје у ћелијским зидовима између компоненти калемљења преко везикула мигрирају ка плазмалемама, што резултира брзим пријањањем између паренхимских ћелија на површини споја. Обе, интер- и интраспецијске секундарне плазмодезме показују нормалну унутарашњу структуру и треба напоменути да секундарне интраспецијске плазмодезме на површини и ауто- и хомеопластичног калема имају идентичну морфологију. Будући да ови процеси отпочињу и пре успостављања било каквог симпластичког контакта ћелија-ћелија, могуће је да је размена информативног сигнала укључена у повезивању преко ћелијског зида (Jeffree & Yeoman, 1983; Kollmann & Glockmann, 1991).

Истраживања на механизмима плазмодезматских формација, између подлоге и племке упућујући на ћелијско препознавање и функционалну координацију који могу бити укључени у формирању калема (Ehlers & Kollmann, 1996, 2001). Код успешних спојева, одговор на озледу прати разлагање некротичног слоја између ћелија партнера калемљења, можда као предуслов за формирање секундарних плазмодезми (Tiedemann, 1989). Посебно специфична својства показују плазмодезме које спајају ситасте цеви и ћелије пратилице. Познато је да зреле ситасте цеви немају једра и рибозоме, али ипак садрже знатне количине протеина, који у случају повреде затварају ситасте плоче. Иако су ови протеини акумулирани у ситастим цевима, рибонуклеинске киселине (iRNK) за њихову синтезу, налазе се само у ћелијама пратилицама. У ситастим цевима је нађено око 200 различитих протеина, чија је синтеза и деградација подложна брзим променама. Све то указује на чињеницу да се ови протеини изграђују у ћелијама пратилицама, али се кроз плазмодезме транспортују у ситасте цеви.

Анатомске студије инкомпатибилних спојева указују на слабу васкуларну везу, васкуларни дисконтинуитет и дегенерацију флоема на површини споја, која се може детектовати неколико недеља после калемљења (Pina & Errea, 2005; Pina et al., 2009). Објашњење лежи у присуству делова калусног ткива које се не може диференцирати у камбијум и спроводно (васкуларно) ткиво, што резултује стварањем широких површина на споју, сличних недиференцираним калусним ћелијама. Ови недостаци у камбијалној активности у деловима површине споја

калемова може проузроковати активност у формирању новог ксилема и флоема, што доводи до дисконтинуитета у камбијуму и формирања паренхимских линија које прекидају васкуларне везе и стварају механички слаб спој на површини калема (Hartmann, 1997).

1.3.1.2. Биохемијске основе појаве инкомпатибилности

У данашњим истраживањима проблематике инкомпатибилности узимају се у обзир интеракције комбинованих метаболита који су у зависности од специфичних генетских интеракција између ћелија подлоге и племке, а не дејство само појединих једињења (Koeperke & Dhingra, 2013). Студија односа ћелијских процеса у споју калема иду у правцу метаболомике, као системског изучавања свих метаболита у ћелијама, ткивима, односно читавом биљном организму (Hall, 2006; Hardy & Hall, 2012).

Једна од група једињења која учествују у изградњи успешног споја приликом калемљења су ауксини, који се ослобађају из васкуларних ткива подлоге и племке и индукују диференцијацију спроводних ткива, функционишући као сигнална супстанца–морфогени (Moore, 1984; Mattsson et al., 2003). Два дана после калемљења код зељастих врста, количина ауксина повећава се у споју и стимулише ћелијску деобу и диференцијацију (Yin et al., 2012; Koeperke & Dhingra, 2013), а током трећег дана после калемљења, транспорт већ функционише на споју што указује да је пут формирања новог ксилема и флоема исти као код настанка изданака и корена Dengler (2001). Познато је да богат ниво ауксина у корену у активној форми утиче на раст и метаболизам корена, укључујући синтезу цитокинина, што заузврат треба да промовише раст ка врху (Lockard & Schneider, 1981), а ограничен капацитет транспорта ауксина могао би објаснити смањену активност камбијума, а самим тим и формирања ксилема, чиме се доприноси ефекту патуљастог раста (Soumelidou et al., 1994).

Aloni (1995) наводи да је диференцијација ситастих цеви и спроводних судова индукована са два хормонална сигнала, ауксинским (IAA) и цитокининским. Ипак, ауксин не треба сматрати посебним молекулом присутним искључиво при препознавању код калемљења (јер се ауксин појављује и укључује и у бројним другим развојним процесима) али се ова хипотеза може применити

код формирања споја код калемљења, са ауксином као потенцијалним сигналом неопходним за формирање споја. Када се егзогени ауксин IAA додаје у нижим концентрацијама на делове стабљике стимулише се диференцијација флоема, док се исти ефекат постиже на ксилему са вишим концентрацијама (Aloni, 1995, 2001; Aloni et al., 2010). Исти аутори доказују да ауксин који се ствара у племци и транслоцира ка подлози, после успостављања споја калема, и после достизања прага концентрације, постаје окидач за дегенеративне процесе који доводе до одумирања корена. Други аутори наводе да садржај ендogene IAA и код инкомпатибилних спојева може утицати на процес диференцијације ксилема и флоема као и лигнификацију (Pina & Errea, 2005; Коерке & Dhingra, 2013).

Учешће ауксина у механизму инкомпатибилности (Aloni et al., 2010) везују за три фактора: 1. анализа ендogene IAA показала је да корен и стабло инкомпатибилних комбинација садрже веће концентрације IAA у односу на иста ткива компатибилних; 2. примена инхибитора транспорта ауксина, 2,3,5-тријодбензоове киселине, на стабло калемљених биљака поништава пропадање корена код инкомпатибилних комбинација, са slabим утицајем на компатибилне; и 3. развој обе компоненте калемљења код инкомпатибилних спојева је нормална после блокирања базипеталног транспорта IAA (делимичним прстеновањем стабла).

Пектинске супстанце чине део важних хемијских састојака ћелијских зидова (посебно неестерификовани и метил-естерификовани пектини). Како ћелијски зидови камбијума садрже велике количине целулозе и пектинских полисахарида, током раста и диференцирања васкуларног камбијума, зидови ћелија камбијума које се активно деле изложени су променама. Savidge et al. (2000) бележе код хибридне тополе висок садржај пектина у активно растућим ћелијама, при чему је прекид камбијалне активности испраћен смањењем количине пектина. У функцији ових резултата пектински полисахаридни одговор може се сматрати маркером ране камбијалне диференцијације током развоја калема. Мада је потребно извршити опширнија истраживања сва ова запажања указују на строгу контролу пектинских ензима током диференцијације ћелије за развој процеса калемљења.

Садржај липида у калусним ћелијама један је од параметара који може

указати на компатибилност калемљења. Количина липида је значајно мања код компатибилних спојева, где су и ћелије у правилном распореду за разлику од инкомпатибилних где су ћелије у неорганизованом распореду. Поред тога, дистрибуција липида је такође другачија. Док су код компатибилних спојева липидне компоненте присутне у цитоплазми, код инкомпатибилних су присутне у везикулама унутар ћелија (Egrea et al., 2001). Улога липида приликом формирања самог споја није у потпуности разјашњена. Она се везује и за сам процес адхезије између ћелија калуса две компоненте спајања. Наиме, цементни, везивни материјал који се појављује на површини ћелијских зидова, поред пектинских полисахарида може садржати и липиде (Juniper & Jeffrey, 1983; Jeffrey et al., 1989) или само масне киселине (Miller & Barnett, 1993).

Santamour et al. (1986) наводе да се изоензимска анализа подлоге и племке може користи да се избегне инкомпатибилност пре самог калемљења код различитих култивара у роду *Acer*, *Quercus* и *Castanea*. Ако фенотипови изоензима пероксидазе подлоге и племке одговарају један другом (ензим одговоран за полимеризацију р-кумарил алкохола у лигнин) резултат је компатибилност споја. У супротном, ако је изоензимски фенотип племке и подлоге различит, калусна формација се нарушава на споју. Gulen et al. (2002) закључују да је присуство или одсуство изозима пероксидазе један од начина да се експериментално испита и предвиди инкомпатибилна реакција. Најскорија истраживања помињу да повећање активности пероксидазе и каталазе могу бити укључени у развој калемова код парадајза (Fernandez-Garcia et al., 2003).

Espen et al. (2005) су објавили да код спојева крушка/дуња постоји веза између апоптозе¹³ и инкомпатибилног одговора споја, што отвара нов приступ истраживања у овој области. Утицај ћелијске смрти на компатибилност, неколико

¹³ Апоптоза (грч. *απόπτωση* означава опадање) је облик програмиране ћелијске смрти који се јавља у физиолошким и патолошким процесима у организму. Ограничена је на појединачне ћелије, када сама ћелија спроводи програмирану смрт (самоуништење) а не јавља се запаљинска реакција. Код некрозе (за разлику од апоптозе) долази до запаљења и смрти великог броја ћелија више различитих ткива. Апоптоза је један вид одбрамбене реакције да би се спречио настанак дефектних ћелија. То је активан процес за који је потребна синтеза ензима и протеина који учествују у њему. Програмирана ћелијска смрт је записана у ћелијском геному и може се активирати: дејством активних супстанци (које се везују за рецепторе ћелијске мембране или једра), одсуством фактора раста, цитокина, хормона који су неопходни за преживљавање ћелија и дејством фактора који изазивају оштећење ћелија.

дана после калемљења, оцењивана је и исказана као ћелијска вијабилност и може се посматрати применом флуоресцентне нуклеинске киселине и мембрански импермеабилне боје – пропидијум јодида (Pina et al., 2009). Инкомпатибилна реакција умањује ћелијску вијабилност повећањем броја пропидијум јодидом означених ћелија и ово смањење вијабилности је значајно од треће недеље и код племке, и код подлоге компатибилног и инкомпатибилног споја. Ефекти умирања ћелија су много израженији у племци инкомпатибилних него компатибилних спојева, са смањењем вијабилности просечно око 50% до 30-тог дана после калемљења. Најупечатљивије изумирање ћелија дешава се током треће и четврте недеље у племци код инкомпатибилног споја. Код подлоге инкомпатибилних спојева редукција вијабилности је мања до 30-тог дана. У првој недељи после калемљења, пропидијум јодид је повезан са ћелијама које су озлеђене када су повезани делови калема. У исто време ствара се велики број живих пролиферованих калусних ћелија које се стварају константно као одговор на повреду ткива. Током друге недеље, разлике које се односе на развој споја могу се уочити између компатибилних и некомпатибилних комбинација. Код компатибилног споја калусне ћелије су већином формиране у уредном и хомогеном распореду, док код инкомпатибилних спојева нема правилне организације ћелија, калусне ћелије остају у почетном стадијуму развоја током друге недеље после калемљења и неке од ових ћелија губе мембранску целовитост. Од друге недеље после калемљења прогресивно бојење калкуфлуором у ћелијским зидовима поклапа се са изолованим зонама где има више изумрлих ћелија. Поред тога, ћелије настале од нових ћелија камбијума код инкомпатибилних комбинација имају јаче изражену апоптозу током треће и четврте недеље (Pina et al., 2009). Због појаве значајних разлика у броју виталних ћелија, могуће је да се на овај начин открију први инкомпатибилни одговори што ће допринети бољем разумевању раних фаза развоја калема и на тај начин олакшати утврђивање компатибилности током првог месеца после калемљења.

Улога фенола у формирању компатибилних спојева калемљења

Једињења за које се у досадашњим истраживањима проблематике инкомпатибилности у калемљењу може рећи да имају несумњиво важну улогу су

фенолна једињења. Фенолна једињења се налазе у великом броју у биљкама као продукти секундарног метаболизма и обухватају веома велику и разнолику групу молекула, са преко 8.000 до сада окарактерисаних структура које се крећу од простих молекула као што су фенолне киселине, па све до високо полимеризованих једињења као што су танини. С обзиром на велику разноврсност биљних фенола, њихова класификација је веома комплексна. Под називом прости феноли подразумевају се углавном супституисани феноли који се ретко налазе у биљним ткивима и то у веома малим концентрацијама. Од осталих фенолних једињења у биљкама су најзаступљеније групе фенолних киселина и флавоноида. Код фенолних киселина разликују се две групе: деривати хидроксибензојеве киселине (ванилинска, сиригична, гална, m-хидроксибензојева, p-хидроксибензојева и гентизинска киселина) и деривати хидроксициметне киселине (o-кумаринска, p-кумаринска, ферулична, кафена и лорогенска киселина). Само мала фракција фенолних киселина постоји као слободна, док су остале често везане естарским везама за разна једињења (глукозу, органске киселине, терпене, флавоноиде) као и структурне компоненте ћелије - целулозу, лигнин, итд. (Stanisavljević, 2015) . Иако нема много података о физиолошкој функцији фенолних киселина код биљака, зна се да су повезане са разним процесима као што су: усвајање нутријената, синтеза протеина, фотосинтеза, одбрана од патогена и др. (Manach et al., 2004; Robbins 2003). Већина фенолних киселина су деривати транс-циметне киселине формиране деаминацијом L-фенилаланина уз помоћ фенилаланин амонијум лијазе (PAL). Ензим PAL повезује примарни (биосинтетски пут шикиминске киселине) са секундарним метаболизмом и има кључну улогу у регулацији синтезе фенолних секундарних метаболита (Boudet, 2007). Осим PAL ензима, фенолна једињења оксидаза (PPO) и пероксидаза (POD), два су ензима важна за регулацију нивоа фенолних једињења у биљци због улоге у оксидативној деградацији фенолних компонената. PPO је локализована у пластидима виших биљака и уз присутност кисеоника катализује хидроксилацију монофенола у o-дифеноле и оксидацију o-дифенола у o-киноне који затим спонтано без деловања ензима, полимеризују у хетерогене црне, смеђе или црвене пигменте познате под називом меланини. Такви процеси су битни код озледе биљног ткива где долази до активације PPO која стварајући поменуте

полимеризоване пигменте затвара место озледе и на тај начин спречава даље оштећење ткива или улазак инсеката (Stevenson & Hurst, 2007). Активност PAL, PPO и POD зависи од различитих спољашњих услова који утичу на ниво полифенолних компонената у биљци.

Фенолне компоненте су локализоване у готово свим биљним органима: у листу, корену, стаблу и семену, а њихов садржај у биљним ткивима може много да варира у зависности од абиотичких и биотичких фактора којима је биљка изложена. Ако се разматра заступљеност фенолних киселина у природи, кофеинска, р-кумаринска, ванилинска и протокатехинска киселина су заступљене у готово свим биљкама, док је појединачно најзаступљенија хлорогена киселина која представља естар кофеинске и кининске киселине.

Флавоноиди су једињења који се налазе у многим биљкама, у семену, pokožици воћа, кори дрвећа, лишћу и цвећу. Велики број лековитих биљака садржи флавоноиде који имају изражено антиоксидативну и антирадикална активност (Rice-Evans et al., 1995). До данас је идентификовано више од 6.400 флавоноида. Када се разматра присуство фенолних компонената у храни биљног порекла, флавоноиди представљају убедљиво најзаступљенију класу са учешћем од приближно 2/3 свих фенолних једињења која се могу наћи у храни, где фенолне киселине чине највећи део од преостале трећине, док су остале класе једињења далеко мање заступљене (Stanisavljević, 2015).

Како фенолна једињења учествују у комуникацији биљке са околином и њихова количина зависи од услова спољашње средине, у биљкама се повећава удео полифенолних компонената услед стресних услова. Тако, квантитативна и квалитативна разлика у фенолном путу између подлоге и племке може навестити метаболичку дисфункционалност на споју (Egrea, 1998), пошто се процес калемљења, односно озлеђивања ткива подлоге и племке сматра стресним утицајем на биљно ткиво.

1.4. КУЛТУРА КАЛУСНИХ ТКИВА И ПРОУЧАВАЊЕ ИНКОМПАТИБИЛНОСТИ

In vitro култура биљних ћелија, ткива и органа је посебна грана биотехнологије која представља скуп техника за асептично (стерилно) гајење и вегетативно размножавање биљака, биљних органа, ткива и ћелија, у хранљивом медијуму дефинисаног састава и под контролисаним условима средине (Грбић, 2004). Сам назив култура *in vitro* означава гајење култура у стаклу или прозирним посудама. Овај начин размножавања биљака често се назива микроразмножавање, јер су биљни органи или целе биљке минијатурних димензијама. Сам поступак представља врло брз процес добијања великог броја серија биљака, које су истоветне по развоју, расту и генетичком потенцијалу.

Мада су Schwann и Schleiden још 1838. године поставили теорију о тотипотентности ћелије, на прве покушаје гајења културе *in vitro* чекало се више од педесет година. Heberlandt је покушавао 1902. да узгаја коренове парадајза на медијуму од квасца применивши откриће да су изоловане биљне ћелије које се гаје на хранљивим подлогама тотипотентне, тј. могу да се деле, расту и диференцирају. Открићем биљних хормона (ауксина и цитокинина – у првој половини XX века) као и синтетичких регулатора растења, технике културе *in vitro* почињу интензивно да се примењују у различитим научним областима: молекуларна биологија, фармакологија, фитопатологија, итд. Went 1928. године открива ауксин, а Gauthier-ова успешна култура камбијалних ткива шаргарепе и дувана 1934. године сматра се првом правом културом ткива. После открића да се калуси могу вештачки генерисати *in vitro* (Gauthier, 1939; Nobecourt 1939) и да равнотежа између два биљна хормона – ауксина и цитокинина, одређује стање диференцијације и дедиференцијације (Skoog & Miller, 1957), калус је широко коришћен у базичним истраживањима а нашао је примену и у индустрији (George & Sherrington, 1988; Bourgaud et al., 2001), хортикултури, као и у пољопривредним истраживањима.

Култура калуса је дуго била основни правац развоја целе области *in vitro* размножавања, па је и данас често употребљавани синоним за *in vitro* размножавање–култура ткива, потиче од културе калуса. Монографија издата

средином седамдесетих година прошлог века, коју је приредио Street (1973) имала је наслов „Култура ткива и ћелија биљака“. Поред тога, треба имати у виду да ако се крене од дефиниције културе *in vitro*, као заједничког назива за манипулацију биљним узорком у стерилним условима, у ужем смислу се односи само на културу неорганизованих ћелија, тј. калуса. И мада је првенствени циљ методе био добијање и неограничено дуго одржавање ткива у недиференцираном стању (калусно ткиво), истраживања у којима се добијени калус диференцира, су променила правац развоја културе *in vitro*. Истраживања на калусним ткивима су се разгранала, тако да је наставак основне технике био култура ћелија односно гајење појединачних ћелија и агрегата ћелија у течним хранљивим подлогама (такав тип културе се назива суспензија ћелија). Култура биљних ћелија (било као култура калуса или као течна суспензија), постаје важна техника у регенерацији целе биљке. Пошто се потенцијална генетичка варијабилност при примени овог метода често испољава, култура ћелија и ткива има значајнију улогу у областима oplemeњивања и генетичком инжењерингу него у клонском размножавању.

Реч „калус“ потиче од латинске речи *callum*, што значи тврд, чврст, и у медицини, овај термин се користи за опис задебљања кожных ткива. Данас се реч калус користи у ширем смислу и односи се на неорганизоване масе ћелија које се колективно називају калус. У природним условима, калус се као неорганизовано и нехомогено ткиво формира као реакција на озледу биљног ткива, када долази до измене у унутрашњем односу хормона. Као резултат ове измене, ћелије на површини озледе почињу да се деле (Hussey, 1983). Гледано споља, калусно ткиво се чини униформним али његова структура је релативно комплексна са знатним морфолошким, физиолошким и генетским варијабилностима. Иако се за калусне културе сматра да су недиференциране, калуси ипак имају специфичну морфологију и анатомију. Пре свега, разликују се растресити од компактних калуса на чију појаву утиче порекло експланта и/или састав подлоге. Калуси такође имају и своју унутрашњу структуру. У њима различито изгледају слојеви ћелија које належу на хранљиву подлогу и они који се налазе на површини (Nešković et al., 2010). На основу макроскопских карактеристика калусно ткиво је веома разноврсно и може се сврстати у подгрупе (фото табела 1): калус без очигледне регенерације органа (слика 3а и 3б), они типови калуса који показују

одређене степене регенерације органа па се, у зависности од органа који се генеришу, називају: калус изданака (Зд), калус корена (Зђ), или компактни калус (Зв и 1г) (Zimmerman, 1993; Frank et al., 2000).

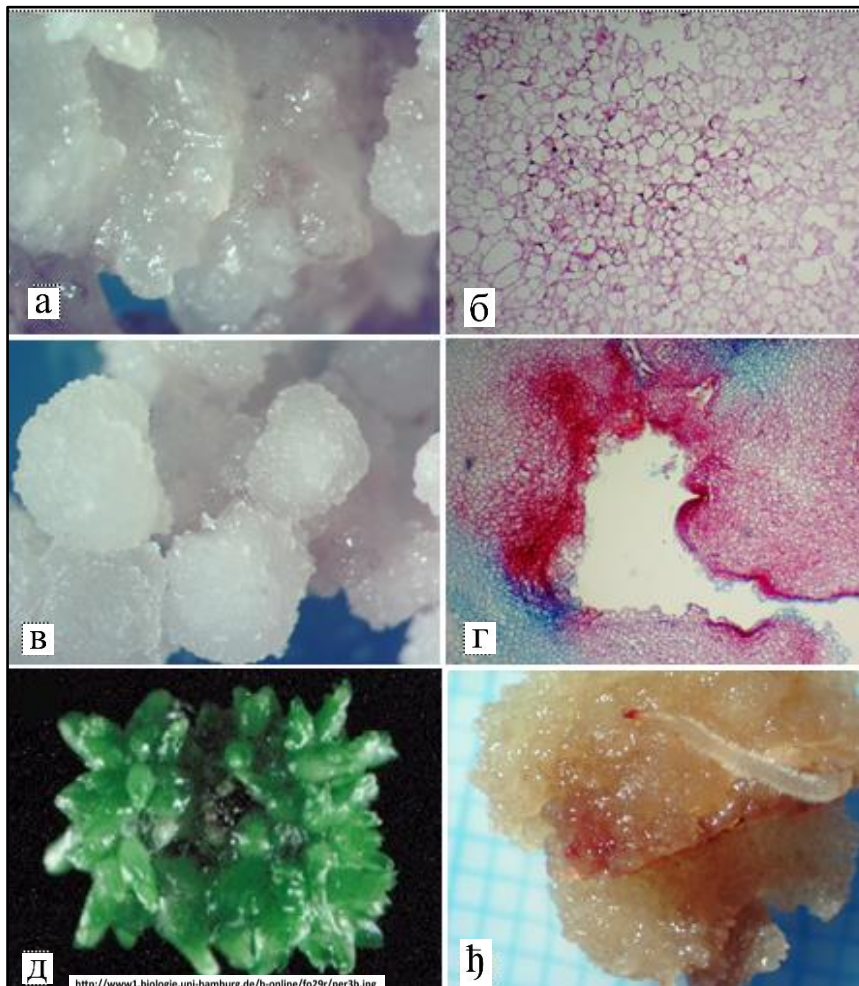
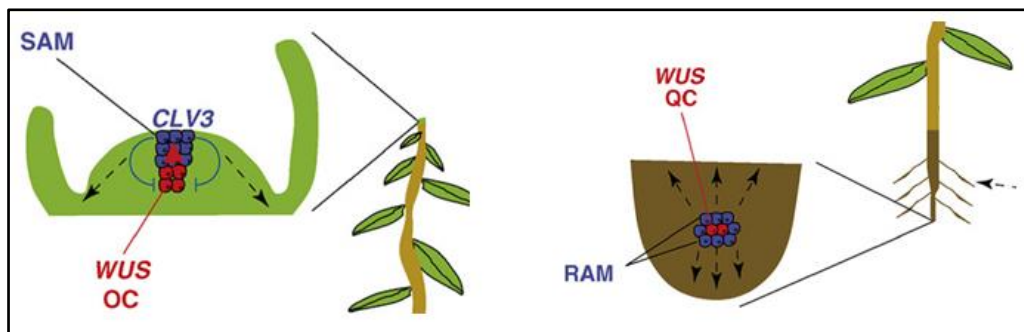


Фото табела 1. Различити типови калуса а) растресит и б) анатомски пресек растреситог калуса; в) компактан, нодуларан тип калуса и г) анатомски пресек компактног калуса д) индукција избојка и ж) индукција корена из калуса

Термин калус обухвата ћелије са различитим степенима диференцијације које су тотипотентне, односно у стању су да се из њих регенерише цела биљка (Steward et al., 1958). Раст калуса, према Hartmann (1997), пролази кроз 4 фазе: иницијација калуса праћена спором деобом ћелија за коју је потребан ауксин; брза фаза деобе ћелија која укључује активну синтезу DNA, RNA и протеина; фаза постепеног престанка деобе ћелија; и диференцијација.

Експланати за индукцију калуса могу потицати од свих биљних делова: стабла, корена, листа, органа за складиштење хранљивих материја, плода, семена,

али потенцијал ових ћелија које ће дати калус је различит.¹⁴ Фокус истраживања матичних ћелија је на плурипотентним матичним ћелијама које се налазе у врху корена или изданка, што одговара класичном концепту матичних ћелија (Verdeil et al. 2007, Singh & Bhalla, 2006). Ове плурипотентне матичне ћелије воде порекло од ћелија и ткива који се налазе у корену и изданку, и немају способност да формирају ембрион (слика 3).



Слика 3. Класичан концепт биљних матичних ћелија из апикалног меристема: Током зиготске ембриогенезе, биљке стварају апикални меристем изданка (SAM) и апикални меристем корена (RAM), којима је функција да кроз живот биљке обезбеде извор нових ћелија за органогенезу. Ове ћелије су плурипотентне меристемске матичне ћелије.

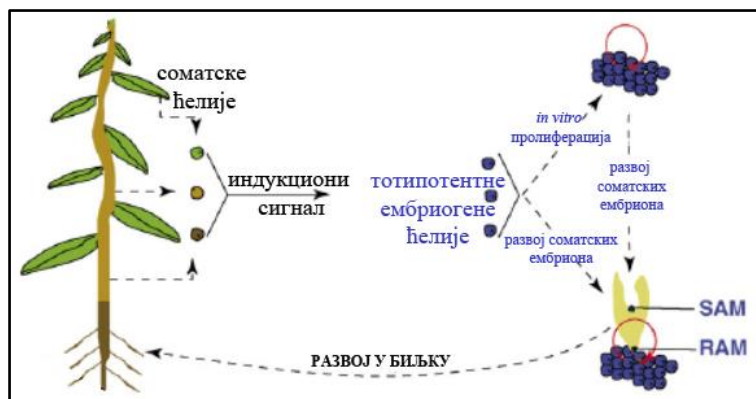
Код апикалног меристема изданка и корена, одржавање матичних ћелија зависи од микроокружења ових ткива, познатијег као ниша, која обезбеђује међућелијске сигнале за њихову регулацију. Код апикалног меристема изданка (SAM), матичне ћелије (означене плавом бојом) се налазе изнад секвенце транскрипционог фактора (WUS) који је у организационом центру нише OC (означен црвеном), окружен диференцираним ћелијама (означене зеленом). Сигнал из организационог центра OC (црвене стрелице) задржава матичне ћелије у горњој зони, што има за последицу смањивање величине OC преко CLV сигнала (плаве линије). У RAM-у матичне ћелије (означене плаво) се одржавају сигнаlima из центра (црвена боја).

(Модификовано према Verdeil et al., 2007)

Обично имају танак примарни ћелијски зид, повезане су плазмодезмама и имају јаке интеракције са околним ћелијама које стварају окружење (нишу), што одржава идентитет матичних ћелија (Singh & Bhalla, 2006);

Насупрот томе, под различитим условима, соматске ћелије (слика 4) могу се дедиференцирати до тотипотентне ембриогене ћелије која има способност пролиферације и /или регенерације ембриона.

¹⁴ Ћелија биљног ткива која се може размножити а затим диференцирати у било који тип ћелије или ткива се назива матична ћелија. Развојни потенцијал матичних ћелија је различит: унипотентне матичне ћелије су у стању да се развију у само једну ћелију или једну врсту ткива; мултипотентне: способне да се развију у више од једног типа биљних ћелија; плурипотентне: способне матичне ћелије да се диференцирају у многе типове, али не и све ћелије и тотипотентне, могу дати све типове биљних ћелија. Тотипотентност је карактеристика ћелија да задржи потенцијал да се развија у комплетан одрасли организам, односно способност ћелије да настави све фазе развоја и на тај начин произведе цео одрасли организам.



Слика 4. Соматске ћелије различитих делова биљке могу бити индуковане различитим сигналимa да формирају ембриогене матичне ћелије као одговор на стрес. Појединачне ембриогене ћелије могу пролиферирати (самообновити се) *in vitro* и могу изазвати рану организацију биљних делова који укључују меристеме вегетационе купе изданка и вегетационе купе корена и све друге типове ћелија и ткива. Ове ембриогене ћелије су тотипотентне матичне ћелије. (Модификовано према Verdeil et al., 2007).

Регенерација комплетног ембриона из једне соматске ћелије путем соматске ембриогенезе је изузетан пример тотипотентности биљака, која је позната већ више од 40 година (Steward et al., 1958). У многим случајевима, појава соматских ембриона потиче директно из појединачних соматских ћелија чија је пролиферација изазвана било високим дозама ауксина или стрес третманима. За многе врсте, висок ниво синтетичког ауксина 2,4-D (2,4 дихлорофенокси сирћетна киселина) се користи за индуковање формирања ембриогених ћелија, мада је могуће користити и друге актере индукције-тешке метале, високу концентрацију минерала, шећера и осмотски стрес (Verdeil et al., 2007).

Мада калус може да се добије код већине врста, он не испољава тотипотентност неограничено и могуће је смањење регенерације нових биљака кроз непрекидно пасажирање. Продужавањем супкултурања смањује се потенцијал формирања младих изданака што је недостатак методе културе калуса (Nešković, 2010). Ово смањење потенцијала праћено је акумулацијом генетски аберантних ћелија које могу произвести биљке које се у важним карактеристикама разликују од родитељских. Генетска нестабилност у калусу може бити корисна у добијању нових веријетета, али је непожељна код клонског размножавања (Hussey, 1983). Поред тога, током дуготрајне културе, може се изгубити потреба за ауксином и/или цитокинином а ова појава је позната као хабитуација (навикавање) и уобичајена је код калусних култура неких биљних врста.

Упоређивањем калуса добијеног утицајем медијума са ауксином и цитокинином и калуса индукованог озледом, уочено је да се одређени маркери коренских меристема и перицикла корена појављују само у калусу индукованим егзогеним хормонима (Sugimoto et al., 2010), а да се ниједан не јавља код озледама изазваног калуса (Iwase et al., 2011). Ова запажања снажно сугеришу да су ове две врсте калуса различите у својим молекуларним и физиолошким особинама.

1.4.1. Калус формиран под утицајем хормона из хранљивог медијума

Од када су откривени, показано је да цитокинини и ауксини интерагују током неколико физиолошких и развојних процеса биљака укључујући апикалну доминацију, регулацију ћелијског циклуса, гранање корена, регулацију сенесценције и развиће васкуларних елемената (Coenen & Lomax, 1997). Интеракција цитокинина и ауксина може бити синергистичка, као што је у случају регулације ћелијског циклуса, или антагонистичка, као што је у случају регулације развића меристема аксиларних пупољака и гранања корена. Испитивање интеракције цитокинина и ауксина врши се већ дуги низ година. Од првих, засниваних на одстрањивању дела биљног органа у ком се одређени биљни хормон синтетисао и праћењу даљих развојних процеса у биљци, до напреднијих која су омогућила добијање трансгених биљака са хиперпродукцијом цитокина и ауксина (Klee & Estelle, 1991). Може се рећи да је однос цитокинина и ауксина међусобно прилично зависан и сложен. Ипак, потврђено је да је регулација биосинтезе цитокинина посредством ауксина брза и директна, док је регулација количине ауксина (нпр. IAA) посредством цитокинина спора и индиректна (Nordström et al., 2004).

Егзогено додавање ауксина и цитокинина може индуковати калус код различитих биљних врста. Уопштено говорећи, приближно исти однос ауксина и цитокинина индукује калус, док комбинације у којима доминира један од регулатора растења доводе до индукције корена (доминантан је ауксин), односно регенерације изданака, када је присутна веће количина цитокинина (Skoog & Miller, 1957). Други хормони, као што су брасиностероиди или абсцисинска киселина, такође индукују калус и код неких врста могу да замене ауксин или цитокинин у формирању калуса (Hu et al., 2000). Међутим, ауксин и цитокинин су

далеко најинтензивније коришћени и проучавани хормони у контексту формирања калуса и касније регенерације органа. Код *Arabidopsis* врста, избојци или корен који су индуковани на медијуму за индукцију калуса, формирају калус из ћелија перицикла у близини ксилема (Atta et al., 2009). Детаљнијим хистолошким истраживањима је показано да ови калуси нису маса неорганизованих ћелија, већ да постоје организоване структуре налик примордијама бочних коренова (Atta et al., 2009). Каснијим анализама потврђено да овај калус има експресију гена веома сличну оној код меристема корена. Чак и калус који се добија из котиледона или латица, поседује организоване структуре сличне примордијама бочних коренова (Sugimoto et al., 2010). Ови подаци указују на то да калус индукован додавањем ендогених хормона, генетским путем поседује иницијацију латералних коренова и да на овај начин индукован калус, барем код *Arabidopsis*, није дедиференциран како се претходно мислило (Ikeuchi et al., 2013). Истраживања Verckmans et al. (2011) показују да различити регулатори растења бочних коренова имају удела и у формирању калуса на медијумима за индукцију калуса. Ауксин је добро познат регулатор који индукује формирање латералних коренова *Arabidopsis*-а.

1.4.2. Калус индукован озледама

Калусне формације индуковане озледама ткива су установљене као појава одавно и користе се у различитим контекстима, од уклањања коре код дрвећа (Stobbe et al., 2002) до коришћења у размножавању у хортикултури (Cline & Neeli, 1983). Овај калус често акумулира фитоалексине и патогеном повезане протеине (Bostock & Stermer, 1989) и на тај начин се спречава инфекција као и губитак воде. У многим случајевима, озледама индукован калус може да регенерише нове органе или нова ткива, што сугерише да је веома плурипотентан (Stobbe et al., 2002).

Механичко озлеђивање је дуго времена препознавано као познат стимулус за калусну индукцију иако су молекуларни механизми слабо објашњени. Потпуним засецањем хипокотила код *Arabidopsis* Iwase et al. (2011) су утврдили да се на месту озледе индукује експресија гена која је даље контролисана преко цитокининског сигналног одговора за промоцију калуса. Озлеђивање индукује

регенерацију ткива и органа и мада овај процес није укључен у процес пролиферације укључен је у дедиференцијацију соматских ћелија а молекуларни механизми су разјашњени код *Arabidopsis*. Како се калус формира као последица озледе (намерне или случајне) или као последица инфестације патогенима, требало би напоменути да проучавање калуса има бројне важне примене у другим областима биологије, јер се бави питањима како вишећелијски организам види и трансдукује ендogene и еколошке сигнале и како они изазивају или одржавају диференцијацију/дедиференцијацију ћелија.

1.5. ДОСАДАШЊА ИСТРАЖИВАЊА НА ПОЉУ ОПШТЕ ИНКОМПАТИБИЛНОСТИ ВРСТА РОДА *PRUNUS* И КОРИШЋЕЊЕ *IN VITRO* ТЕХНИКА

Док се истраживања о побољшању агрономских својстава интензивно спроводе код врста рода *Prunus* које се масовно користе као утилитарне (конзумне) врсте, украсних представника овог рода је у много мањем броју због мање економске добити. Коштичаве врсте воћака су се показале као веома захвалан материјал за примену неких *in vitro* метода. Тако су у воћарству технике клонског *in vitro* размножавања (микропропагација аксиларних пупољака, регенерација изданака из калуса, листова и соматска ембриогенеза) нашле широку примену у производњи вегетативних подлога за калемљење (Ružić & Cerović, 2003). У многим расадницима ово је постао стандардан начин за добијање једне од најшире коришћених подлога за трешњу–вегетативних подлога Gisela 5. Примена техника културе ткива као алтернативне методе размножавања је отпочела још 60-тих година прошлог века (Martinez et al., 2005). Традиционалне методе размножавања и код родних и украсних врста рода *Prunus* се базирају на вегетативној репродукцији (калемљење или резнице) због одржавања жељених особина. Један од разлога почетка коришћења техника култура *in vitro*, које се користе за масовну производњу, је да се превазиђу проблеми који настају применом техника конвенционалних, класичних метода вегетативног размножавања.

За врсте рода *Prunus* које се масовно користе као конзумне, истраживања у

in vitro условима континуирано се изводе од почетака развоја ове технике размножавања: Quoirin & Le Poivre (1977) користе меристеме више врста рода *Prunus*, а Ranjit et al. (1988) успешно изводе културу меристема *Prunus avium*, *P. 'Colt'* и *P. mahaleb*. Dradi et al. (1996) објављују рад са 11 екотипова *P. mahaleb*, а Pruski et al. (2005) се баве микропропагацијом *Prunus fruticosa* и *P. tomentosa*. Истраживања се уз модификоване технике настављају до данас (Mahdavian et al., 2011; Druart, 2013).

Код нас, са *in vitro* истраживањима у роду *Prunus* започињу Ružić (1982), Vinterhalter et al. (1982), и Nešković (1985), а на микропропагацији 'Colt' и вишње cv. Šumadinka успешно раде Cerović & Ružić (1987). Како наводи Ružić (2003) поред проучавања утицаја различитих биљних регулатора растења на мултипликацију и ожиљавање, доста је проучаван утицај минералних елемената у подлози (три подлоге за трешњу су послужиле као модел биљке). Добијен је различит одговор на састав медијума и приказане су специфичности минералне исхране у *in vitro* условима (Ružić et al., 2000, 2001). Ružić & Cerović (1991) су проучавали упоредо у пољским условима понашање вишње сорте Šumadinka добијене микропропагацијом и исте сорте окалемљене на дивљу трешњу. Miletić et al. (2008) су применили методу микропропагације на облачинској вишњи, Vujović et al. (2009) и Ružić et al. (2010) на подлози за трешњу Gisela 6, а на подлогама за вишњу и трешњу Dorić et al. (2014).

Што се тиче украсних представника овог рода истраживања су мањег обима вероватно због мање економске добити. Према досадашњим искуствима тачан протокол за успостављање *in vitro* култура украсних врста рода *Prunus* утврђен је за само њих неколико (Pruski et al., 2000, 2005; Hokanson & Pooler, 2000; Cheong & Kim, 2000; Kalinina & Brown, 2007). *Prunus yedoensis* Matsum. је уведен у културу *in vitro* уз помоћ различитих експлантата, укључујући вршне изданке (Katano & Irie, 1991; Akita et al., 2006) и бочне пупољке (Kim et al., 1993, Koh et al., 1997; Cheong, 2000; Cheong & Kim, 2000). Од скоријих истраживања Duta et al. (2009) су вршили размножавање *Prunus serrulata* 'Kanzan' из меристема уз употребу различитих концентрација фитохормона. Увидом у литературу установљено је да нема радова наших аутора који су се бавили методама микропропагације украсних таксона цветајућих трешања.

Масовно размножавање културом ткива може се постићи и методама органогенезе или соматске ембриогенезе из неорганизованог ткива - калуса који се индукује из листа, петелке листа, делова корена или котиледона. Поред тога, органогенезом и ембриогенезом су олакшане технике трансфера гена и производња секундарних метаболита. Калусна култура се такође може користити за покретање суспензије ћелија. Поред тога, различити протоколи за генетски инжењеринг користе иницирање калуса после што се ДНК убаца у ћелије а трансгене биљке затим регенеришу из трансформисаног калуса. Ране радове на ризогенези калуса на *Prunus avium* отпочели су Jordan (1980) и Ochatt et al. (1987) на добијању калуса из филамената и унутрашњости антера код *Prunus persica* (L.) Batsch. (Ognjanov, 1989). На индукцији калуса из листа *P. avium*, *P. padus*, *P. 'Colt'* интезивно су радили Janečkova' et al. (1995), Hammatt & Grant (1998) и Takashina et al. (2003). Hokanson & Pooler (2000) користећи котиледоне зрелих ембриона неколико украсних *Prunus* врста (*P. virginiana* L., *P. serrula*, *P. maackii* Rupr., *P. campanulata*, *P. sargentii* Rehder, *P. serrulata*, *P. subhirtella* Miq. и *P. yedoensis*) за регенерацију *in vitro*, успешно су иницирали изданке код само три врсте: *P. virginiana*, *P. serrula* и *P. maackii*. На зиготским ембрионима *P. yedoensis* успешни су радови Koh et al., (1997, 1998). Оптимални састав медијума за *in vitro* размножавање девет украсних *Prunus* врста (*P. americana* Marsh., *P. cistena*, *P. glandulosa* (Thunb.) M.Roem., *P. serrulata* 'Kwanzan', *P. laurocerasus* L., *P. sargentii*, *P. tomentosa* Thunb., *P. triloba* Lindl., и *P. virginiana* 'Schubert') истраживали су Kalinina & Brown (2007).

Индукција адвентивних изданака и калусна култура су примењени на различитим врстама из рода *Prunus* и користе се за трансформацију гена. Сомаклоналне варијације су изазване самостално из калуса или у комбинацији с хемијским једињењима или светлосним третманима. Код украсних трешања само на неким је примењена успешна трансформација—код *P. subhirtella* 'Autumn Rosa' (Camara Machado et al., 1995) и *P. incisa* Thunb. (Cheong & Pooler, 2004). Успостављање калусних култура за производњу секундарних метаболита које се користе у медицинске сврхе, истраживана су на *P. cerasus* (Blando et al., 2005), а на *P. yedoensis* Ishikura (1994).

Микрокалемљење *in vitro* ради утврђивања ране инкомпатибилности између сорте и подлоге, спада у веома значајне методе (Jordan et al., 1983; Jonard et al., 1990). Метода се веома добро показала за калемљење веома малих делова вршног меристема на одговарајућу подлогу чиме се иницијално развијају биљке које су безвирусне (величина меристема који се калеми обезбеђује ткиво ослобођено вируса). Методу је на цитрусима започео да развија Navarro et al., (1975) и успешно је унапређују (Navarro et al. 2002). За вирусе PDV, АрMV и ACLSV метод је показао боље резултате од метода конвенционалне термотерапије (Navarro et al., 1982; Juárez et al., 1988, 1992).

Коришћење *in vitro* техника показало се значајним у истраживањима феномена компатибилности калемљења и обезбеђивању добре корелације између *in vivo* и *in vitro* добијених резултата. Досадашња истраживања која се баве проблематиком компатибилности калемљења односе се већином на саднице воћака из родова *Prunus*, *Pyrus*, *Malus* и *Vitis* (Usenik et al., 2006; Pina & Errea, 2005; Ermel et al., 1997; Moore, 1991). Велики економски значај који ови родови имају, усмерила је оправдано истраживања ка представницима ових родова. Области истраживања инкомпатибилности иду у више праваца: на истраживања која се базирају на анализама самих спојева, кроз биохемијску анализу самог састава калема и околног ткива непосредно изнад споја, или кроз анализе морфолошких и анатомских пресека спојева. Анатомске студије на пресецима спојева указивале су да су процеси који су укључени у формирање самог споја врло слични код многих врста фамилије ружа: кајсија, дуња, шљива и јабука (Errea et al., 1994a; Soumelidou et al., 1994; Ermel et al., 1997). Ови процеси подразумевају спајање паренхимских ткива као ране фазе у формирању споја и истраживања на овом нивоу у прошлости су замењивана анализама процеса који се дешавају касније на самом споју, по успостављању континуитета спроводних судова (Moore et al., 1986). Treutter et al. (1986) су пронашли да се код инкомпатибилних спојева *Prunus avium* калемљене на *Prunus cerasus* изнад споја акумулира прунин који се под стресним условима (приликом озлеђивања ткива, нпр.) синтетише из р-кумаринске киселине. Компатибилност калема упућује да ће калем бити инкомпатибилан ако су природни сигнали који промовишу стварање успешног споја (нпр. ауксин) замењени токсинима, на пример цијановодоничном

киселином или бензилалдехидом (Heuser, 1987) који изазивају некомпатибилност калема (Moore, 1982). Код калемљења бресква/шљива, Moreno et al. (1994) указују да се количина слободних аминокиселина смањује у подлогама инкомпатибилних спојева, а стабилизују се у компатибилним између 79–89 дана после калемљења. Истраживања којама су се бавили Errea et al. (1994a) су показала да се при калемљењу кајсије на подлогу шљиве, транспортом дисодијум флуоресцеина кроз спој калема потврђује комуникација и функционалност ове везе и код компатибилних и инкомпатибилних комбинација.

Типични симптоми инкомпатибилности калемљења крушке су неповезаност коре, камбијална нефункционалност и акумулација скроба у племци. Дисконтинуитет и дегенерација флоема на површини споја, резултује поремећајем трансфера воде, у једном и фотосинтетичких асимилата у флоему, у другом смеру, што се може детектовати анатомским истраживањима неколико недеља после калемљења (Errea, 2005; Pina et al., 2009). Код инкомпатибилних калемова у роду *Prunus*, број добро диференцираних ситастих цеви је много мањи испод него изнад споја. Јавља се велика аутолиза ћелија, и низак степен диференцијације флоема. Слаба диференцијација флоема испод споја може бити проузрокована недостатком хормона, угљених хидрата или другим факторима (Schmid & Feucht, 1981). Како наводе (Errea et al., 1994a) калусна диференцијација камбијума и спроводних судова се одвија, али, велики делови калуса никада се не издиференцирају. У радовима са кајсијом, акумулација фенолних једињења може послужити као индикатор ране инкомпатибилности већ у првој недељи после калемљења. Акумулација неких фенолних једињења је у вези са проблемима у диференцијацији калуса која није комплетна и у дезорганизацији на субћелијском нивоу (Errea et al., 2001). Schmid & Feucht (1982) су испитивали протеине пероксидазе у флоему и киселе фосфатазе код *Prunus avium/Prunus cerasus* калемова, закључивши да је могуће дефинисати добар спој не само морфолошким, већ и биохемијским методама. Gulen et al. (2002) су закључили да је присуство или одсуство изозима пероксидазе један од начина да се експериментално испита и предвиди инкомпатибилна реакција. Поред тога, студије на *Prunus persica/Prunus* spp. калемовима указују на значајно повећање у активности пероксидазе уочене код инкомпатибилних спојева (Zargouk et al., 2010). Одсуство

А пероксидазе код споја крушка/дуња може се такође повезати са инкомпатибилношћу (Hossein et al., 2008).

Релативно поуздану рану детекцију инкомпатибилности може да пружи и гајење сраслих калусних ткива подлоге и племке *in vitro*. У овим условима прати се адхезивност калуса подлоге и племке, развој ћелија на споју (распоред и обојеност ћелијских зидова) и присуство липида и фенолних компоненти. Већина особина испољава се друге и треће недеље (Errea et al., 2001; Todić et al., 2005). Висока концентрација фенола катехина и епикатехина пронађена је у инкомпатибилним спојевима култивара дуње и пре појаве видљивих знакова инкомпатибилности (Musacchi et al., 2000), а висок ниво флаванола, катехина и епикатехина карактеристичан је и за мање компатибилне сорте кајсије (Errea et al., 1992, 2000). Потврду могућности коришћења ове методе дала су истраживања и на врстама из рода *Citrus*, *Uapaca* и *Prunus* (Nito et al., 2005, Mng'omba, 2007; Feeneu et al., 2007, по редоследу). Први симптоми добрих спојева испитивани су преко чврстине споја самих калуса две компоненте спајања: хомогеним, успешним спојевима, сматрају се они који се тешко одвајају, док у случајевима када су две компоненте лако раздвојиве, спој се сматра негативним (Errea & Pina, 2001; Nito et al., 2005). Даља анализа се своди на праћење промена у величини структура и присуства развијених калусних ћелија на површини споја (методама бојења ћелија). Присуство липидних и фенолних компонената у ћелијама калуса на контактної површини указује да се код компатибилних спојева, липидне компоненте не уочавају на препаратима ни две недеље после развоја калуса, за разлику од инкомпатибилних фузија где су липиди присутни, посебно на површинама где су ћелије дезорганизоване. Фенолне компоненте код инкомпатибилних и компатибилних спојева показују значајну разлику у количини већ после прве недеље по спајању. Мање количине фенола (покривају мање од 10% површине споја) указује на компатибилан спој. У супротном, појава обојености и присуство велике количине фенола и у вакуолама калусних ћелија, указује на неуспели спој калема (Pina et al., 2009; Mng'omba, 2007; Errea et al., 1992).

2. ЦИЉ РАДА

Циљ рада је да се у лабораторијским условима, употребом калусне културе утврди брз и оптималан протокол за рано утврђивање компатибилности украсних култивара цветајућих трешања и домаћих подлога трешања чиме би се избегло коришћење спојева који могу изазвати тренутну или одложену инкомпатибилност испољену непосредно после калемљења, или тек по пласирању садница.

За све врсте и култиваре утврдиће се најпогоднији садржај хранљивог медијума за индуковање калуса, степен индукције калуса, као и разлика у брзини индуковања калуса на различитим хранљивим подлогама. Спајањем недиференцираног калусног ткива добијеног *in vitro* са различитих племки и подлога и квантификацијом јачине споја (преко степена јачине срастања калуса, евиденцијом појаве некрозе ћелија на споју калуса и потамњивања калуса, као и променама на структури калуса подлоге или племке) указало би се на потенцијално постојање неподударности између компоненти калемљења у раним фазама спајања два ткива. Хемијским и анатомским анализама калуса утврдиће се појава, количина и локализација фенола, липида и пектина у ћелијама, ћелијским зидовима и у међућелијском простору што ће имати за циљ да се потврди компатибилност и на ћелијском нивоу.

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

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

- Различите хранљиве подлоге и комбинације регулатора растења у њима утицаће на степен индукције калуса, масу индукованог калуса, потамњивање калуса и брзину индукције код испитиваних таксона.
- Почетни експланте (пупољци, дршке листа, делови ламине) даће различиту продукцију и квалитет калуса па ће се истраживања

усмерити и на избор најподеснијих за добијање брзог протокола индукције калуса за успостављање технике фузије калуса.

- Коришћењем технике спајања калуса подлоге и племке *in vitro*, могуће је у лабораториским условима пратити промене и евентуалне абнормалности у развоју спојених ткива.
- Анализом и упоређивањем јачине споја калуса подлоге и племке и праћењем развоја калуса на споју, успоставиће се погодан метод за рано утврђивање компатибилности код поменутих украсних врста рода *Prunus*.
- Хистохемијским студијама споја калуса и анализом липида и фенола потврдиће се оптимална комбинација калемљења подлога домаћих трешања и племки из групе *Sato-zakura* трешања.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА

У процесу хетеровегетативног размножавања, спајањем ткива подлоге и племке процес се одвија са ткивима која су различите физиолошке старости. Подлога је млад, јувенилни материјала (сејанци или вегетативно размножене саднице) најчешће до 2 године старости, на који се калема. Племка је у већини случајева адултно ткиво, јер потиче са матичних биљака које по правилу треба да испоље декоративне особине најчешће везане за цветање и/или плодношење. Ова чињеница је била један од разлога да су се за успостављање калусних култура племки користила оба типа ткива, јувенилни и адултни.

Адултни полазни материјал који је служио за иницирање калуса јапанских трешања *Prunus serrulata*, *P. serrulata* 'Аманогава', *P. serrulata* 'Канзан' и *P. serrulata* 'Кіку-шидаре-закүра', узиман је са матичних садница из расадника „Манојловић“ у Почковини код Трстеника и расадника „Лепо поље“ у Липљу код Љига. Јувенилни материјал истих култивара узиман је са калемљених садница *Prunus serrulata* 'Аманогава' и *P. serrulata* 'Канзан' пореклом из расадника „Оморика“ у Сремчици (саднице су потом пресађене у Арборетум Шумарског факултета), односно *P. serrulata* 'Кіку-шидаре-закүра' из расадника Аца и Милан Топаловић.

Полазни материјал врста подлога: *Prunus avium*, *Prunus* 'Colt' и *Prunus mahaleb*, добијен је из расадника за производњу садног материјала воћа, винове лозе, старих сорти воћа и украсног биља „MIND“ из Љубића код Чачка.

Материјал из ког је индукован калус који је коришћен за успостављање инкомпатибилних спојева (негативна контрола) чинили су летораста са адултних индивидуа врсте *Prunus serotina* из Арборетума Шумарског факултета и биљчице крушке, клон 'Pyrodwarf' (BU 5-18, Old Home x Bonne Louise d'Avranches) добијене као *in vitro* култура из Лабораторије за културу ткива, Одељења за физиологију воћака Института за воћарство у Чачку.

3.1. ПРИПРЕМАЊЕ УЗОРАКА ЗА ПОВРШИНСКУ СТЕРИЛИЗАЦИЈУ

За два таксона, *Prunus avium* и *Prunus 'Colt'*, исте старости (трогодишње саднице) постављено је по 8 пупољка у 5 посуда и вршено упоређење две методе стерилизације експаната. Код прве групе, зимске гранчице са пупољцима су узимане пре самог кретања вегетације (март, април) и одмах по доношењу у лабораторију се отпочињало са њиховом стерилизацијом. Летораста су испирани у благом ратвору детерџента и текућој води а затим 1'30'' у 70 % етанолу. Потом су одсецани сегменти изданака са пупољком и вршена је површинска стерилизација у 10 % раствору NaOCl (натријум-хипохлорит, комерцијални препарат „Белла“, „Бисер“-Кумане, са 4 % активног хлора), на магнетној мешалици 12 минута, уз додатак 2–3 капи TWEEN 20. Материјал је испиран дестилованом стерилисаном водом 3 пута по 10 минута у ламинарној комори чиме је процедура припреме експаната за прву групу била завршена.

Код друге групе, по модификованом протоколу (Ružić et al., 2010), стандардне процедуре површинске стерилизације, гранчице су са истих матичних стабала сакупљане у периоду дубоког мировања током јануара месеца и постављане у посуду са водом у лабораторијским условима са просечном температуром око 20 °C основом у посуди са водом. Током наредног периода (између 10 и 15 дана) долазило је до размицања спољних љуспи пупољака, односно до отварања пупољака. У овој фази одсецани су сегменти летораста са једним бочним пупољком и увођени у процедуру стерилизације.

У случају да су летораста одлагани за каснији рад–умотавани су у влажан филтер папир, полиетиленске кесе и одлагани у фрижидер на температуру од 4 °C. По потреби, гранчице су вађене и припремане за даљи рад по већ описаној процедури.

3.2. ИНДУКЦИЈА КАЛУСА ИЗ МЕРИСТЕМА БОЧНИХ ПУПОЉАКА

По завршетку површинске стерилизације и испирања дестилованом стерилисаном водом 3 пута по 10 минута у ламинарној комори, поклопљене посуде са пупољцима током даљег рада држане су на радној плочи ламинара. Уз помоћ скалпела, пинцете и стерилних игала (претходно стерилисаних у 96%

етанолу и опалених на пламену лампе) под бинокуларом (увеличањем 20x) су отклањане спољне и унутрашње заштитне љуспе пупољака (слика 5).



Слика 5. Процес уклањања заштитних љуспи пупољака трешње

Експлант величине 0,2–0,5 cm који је постављан на медијум је имао део вегетационе купе пупољака и неколико лисних примордија и лисних залистака. У циљу поспешивања индукције калуса повредом ткива, лисни зачеци су танком иглом озлеђивани са 5 до 6 кратких резова. Посуде у којима су постављани експланти (стаклене флашице Ø5 cm, висине 5,5 cm) су садржале 25 ml одговарајућег медијума, и постављане су у аклиматизованој просторији за раст на температури од 23 ± 2 °C у услове мрака.

За индукцију калуса из пупољака, у експериментима су коришћени MS (Murashige & Skoog, 1962), WP (Woody Plant Medium; Lloyd & Mc-Cown, 1980) и SH (Schenk & Hildebrandt, 1972) медијуми уз додатак 30 gL^{-1} сахарозе, $6,5 \text{ gL}^{-1}$ агара, 100 mg/L иносола за MS и WP медијум и 200 mg/L иносола за SH (табела 1).

Табела 1. Компоненте медијума за успостављање култура

MS Murashige & Skoog (1962)		WP Lloyd & McCrown (1980)		SH Schenk & Hildebrandt (1972)	
макроелементи					
супстанца	конц. (mgL ⁻¹)	супстанца	конц. (mgL ⁻¹)	супстанца	конц. (mgL ⁻¹)
KNO ₃	1 900	NH ₄ NO ₃	400	KNO ₃	2500
NH ₄ NO ₃	1 650	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	556	NH ₄ H ₂ PO ₄	300
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370	MgSO ₄ · 7H ₂ O	370	MgSO ₄ · 7H ₂ O	400
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440	CaCl ₂ · 2H ₂ O	96	CaCl ₂ · 2H ₂ O	200
KH ₂ PO ₄	170	KH ₂ PO ₄	170		
микроелементи					
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22,3	MnSO ₄ · 4H ₂ O	22,3	MnSO ₄ · 4H ₂ O	10
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8,6	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8,6	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1
H ₃ BO ₃	6,2	H ₃ BO ₃	6,2	H ₃ BO ₃	5
KJ	0,83			KJ	1
NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0,25	NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0,25	NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0,1
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,025	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,25	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,2
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,025			CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,1
FeSO ₄ · 6H ₂ O	27,8	FeSO ₄ · 6H ₂ O	27,8	FeSO ₄ · 6H ₂ O	15
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	37,2	Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	37,2	Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	20
органске супстанце					
Myo-inositol	100	Myo-inositol	100	Myo-inositol	200
tiamin HCl	0,1	tiamin HCl	0,1	tiamin HCl	0,5
никотинска кис.	0,5	никотинска кис.	0,5	никотинска кис.	5
глицин	1	глицин	1	глицин	2

Концентрације (у mg/L) и садржаји хормона, ауксина: 2,4-D (2,4-dihlor fenoksi sirćetna kiselina); NAA (α naftil sirćetna kiselina), IBA (indol 3 buterna kiselina) и цитокинин BAP (6-benzil aminopurin) у различитим медијумима приказани су у табели 2.

Табела 2. Концентрације (у mg/L) и садржаји хормона

	MS1	MS2	MS3	MS4	MS5	WP1	WP2	WP3	WP4	WP5	SH1	SH2	SH3	SH4	SH5
BAP	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
2,4-D	2				2	2				2	2				2
NAA		2		2			2		2			2		2	
IBA			2	0,5	0,5			2	0,5	0,5			2	0,5	0,5

Применом различитих комбинација фитохормона покушало се доћи до медијума који ће дати најинтензивнију индукцију калуса. Подешавање рН вредности медијума на 5,8 пре аутоклавирања вршено је додавањем 0,1 N HCl и 0,1N NaOH. Медијум је разливан у стаклене флашице које су затворене затварачима од газе, вате и алуминијумске фолије. Аутоклавирање припремљених медијума вршено је по стандардној процедури на 1,5 atm и температури од 120 °C у року од 20 минута.

За сваки култивар и третман постављено је 3 понављања по 6–8 експланата у флашицу. Током експеримента на експлантима је бележен проценат контаминираних, некротираних и проценат пупољака на којима је инициран калус, дан почетка индукције калуса и маса индукованог калуса после 35 дана (фото табела 2).



Фото табела 2. Промене на експлантима - пупољцима, током културе

Индуковани калус је дељен на сегменте величине 0,5 cm у пречнику и супкултуриран на медијуме за које је утврђено да су најпогоднија подлога за

развој калуса одређеног таксона. Даља супкултура масе калуса вршена је на сваких 30 дана.

3.3. ИНДУКЦИЈА КАЛУСА ИЗ ВЕГЕТАТИВНИХ ДЕЛОВА МАТИЧНИХ БИЉАКА

У циљу брже индукције калуса и испитивања могућности коришћења вегетативних делова ткива са матичних стабала гајених на отвореном, за добијање калуса за даља истраживања (хистолошке анализе), експланте за индукцију калуса су били и вегетативни делови пролећних, неодрвењених летораста. Са матичних стабала култивара *Prunus serrulata* ‘Amanogawa’, *P. serrulata* ‘Kanzan’ и *Prunus serrulata* ‘Kiku-shidare-zakura’, *Prunus avium* и *Prunus* ‘Colt’ одсецане су младе тек издужене гранчице развијене у пролеће, после завршене фазе цветања (у периоду од 4–5 недеља после почетка цветања).

Одсечени делови гранчица су испирани сат времена у благом раствору детерџента и млаке воде после чега су површински стерилисани у 2 % раствору натријум хипохлорита, на магнетној мешалици уз додатак 2–3 капи TWEEN 20 у трајању од 2h (Pérez-Jiménez et al. 2013). После 3 испирања по 10 минута у стерилисаној дестилованој води, у стерилној струји ваздуха ламинара, склапелом су одвајани делови ткива који су служили за индукцију калуса (слика 6): 1. петелјка листа, 2. основа листа са делом петелјке, 3. делови лисне плоче 0,5 x 0,5 cm са централним нервом, 4. део летораста младог изданка (дужине око 0,5 cm) са пупољком. Лисна петелјка, нерв листа и стабљика изданка су озлеђивани уздужним резом на абаксијалној страни стерилном иглом и супротном, неозлеђеном страном постављани на хранљиви медијум.



Слика 6. Типови експланта узиманих са младих изданака

Експлантаци су, по 3 x 10 постављени у стаклене флашице Ø 5,5 x 5,5 cm са 25 ml одговарајућег медијума у климатизовану просторију за растење на температуру 23±2 °C. У циљу индукције белог растреситог, фибрилног калуса, експеримент је постављен, као и претходни у услове мрака.

Код успостављања индукције калуса за клон крушке *Pyrus communis* ‘Pyrodwarf’ који је коришћен као негативна контрола (у споју са калусом украсних трешања), коришћене су младе биљке које су гајене и произведене у култури *in vitro* (у лабораторији за културу ткива Института за воћарство у Чачку). Са стерилног медијума на ком су расле, биљке су вађене и, због мањих димензија (око 10 cm висине и ситнијих листова), дељене на следеће делове: део изданка, лисна дршка и цео лист. Индукција калуса је извођена на медијумима MS2, MS4 и SH2. За даљу супкултуру индукованог калуса коришћени су медијуми MS2, MS4, WP1, WP3, WP4, SH1, SH3 и SH4 (табела 2).

После 35 дана од постављања на индукциони медијум, за анализу успешности индукције калуса са различитих вегетативних делова оцењивани су следећи параметри:

- проценат експланата на којима је индукован калус;
- дан почетка индукције калуса и
- степен покривености експланта калусом (СПК) који је мерен после 30. дана, који је изражен оценом од 0–3. Оцена 0: није дошло до индукције калуса; 1: степен покривености калусом до 33 % (1/3) површине експланта; 2: покривеност између 33–66 % (2/3 површине експланта); 3: покривеност преко 66 % површине експланта (фото табела 3).

Са свих вегетативних делова на којима се формирао, калус је одвајан и постављан на нову хранљиву подлогу при чему је утврђен најпогоднији медијум за даљи развој калуса за сваки таксон. Супкултура калуса је вршена на сваких 20 до 30 дана.


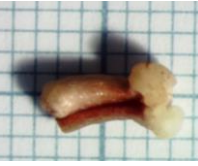
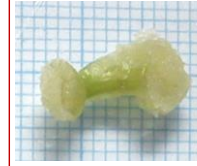
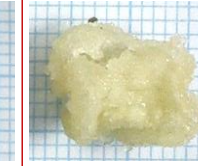









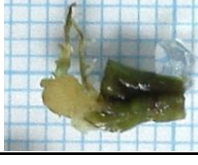
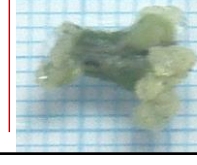
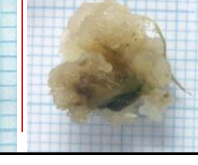
ОЦЕНА	0	1 (< 33%)	2 (33% - 66%)	3 (> 66%)
ЛИСНА ДРШКА				
ОСНОВА ЛИСТА				
ЛИСНА ПЛОЧА				
ДЕО ИЗДАНКА СА ПУПОЉКОМ				

Фото табела 3. Типови експланата и степен покривености калусом (СПК)

Хранљиве подлоге, инструменти за рад и лабораторијско посуђе који су коришћени у свим експериментима стерилисани су према стандардним процедурама културе биљних ћелија, ткива и органа *in vitro* (посуде и прибор који је коришћен током припремања медијума и постављања експланата је стерилисан у аутоклаву на температури од 120° С и притиску од 1.5 атмосфера у трајању од 25 минута, а рад са биљним материјалом обављан је у асептичним условима, у ламинару. Инструменти, као и петри кутије и остало посуђе и прибор су стерилисани сувом стерилизацијом у трајању од 1–2 сата на температури од 160–180 °С. Радна површина третирана је 96 % етил-алкохолем, пинцете и скапели су стерилисани искувавањем у дестилованој води 25 минута, а затим урањани у 96 % алкохол и опаљивани на пламену. Прибор је у току рада често мењан, односно враћан у алкохол и стерилисан на пламену.

3.4. УТВРЂИВАЊЕ ЈАЧИНЕ СПОЈА КАЛУСА ПОДЛОГЕ И ПЛЕМКЕ

За утврђивање јачине спојева између калуса хетеро и хомеопластичних комбинација подлоге и племке калус три култивара јапанских трешања *Prunus*

serrulata ‘Amanogawa’, *P. serrulata* ‘Kanzan’ и *P. serrulata* ‘Kiku-shidare-zakura’ су спајани са шест подлога:

- хетеропластични спојеве са калусима 4 компатибилне подлоге: *Prunus avium*, *Prunus* ‘Colt’, *P. mahaleb* и *P. serrulata*
- хетеропластични спојеве са калусом 2 инкомпатибилне подлоге: *Prunus serotina* и *Pyrus communis* ‘Pyrodwarf’.
- хомеопластични спојеве (спојеве калуса исте врсте) врста и култивара су представљали позитивну контролу
- у циљу испитивања могућности да се врста *Prunus serrulata* користи као посредник калемљења, спајани су и калуси ове врсте са калусом *Prunus avium*, *Prunus* ‘Colt’.

Припрема хомео и хетеропластичних спојева две гомилице калуса величине око 0,5 cm је вршена према модификованој методологији (Errea et al., 2001; Pina, 2006; Mng’omba et al., 2007):

3.4.1. Припрема узорака за утврђивање јачине споја визуелном оценом

На деловима калуса (величине око 0,5 cm), скалпелом су резом формиране равне површине. Гомилица калуса једне врсте је постављена на медијум, а на њу је лагано спуштана гомилица калуса (заравњеном страном) друге или исте врсте (слика 7).



Слика 7. Припрема калуса за утврђивање јачине споја визуелном оценом

Комбинације спојева означене су са два броја од којих први представља ознаку за врсту подлоге а други ознаку за врсту племке. Ознаке коришћене за обележавање калуса врста племки и подлога при утврђивању успешности спојева калуса су дате у табели 3.

Табела 3. Ознаке бројева којима су означене врсте и култивари

ознака	таксон	ознака	таксон
1.	<i>Prunus avium</i>	7.	<i>Prunus serrulata</i> 'Amanogawa'
2.	<i>Prunus</i> 'Colt'	8.	<i>Prunus serrulata</i> 'Kanzan'
3.	<i>Prunus mahaleb</i>	9.	<i>Prunus serrulata</i> 'Kiku-shidare-zakura'
4.	<i>Prunus serrulata</i>	Комбинација два броја (у даљем тексту) означава спој између калуса две врсте/култивара	
5.	<i>Prunus serotina</i>		
6.	<i>Pyrus communis</i> 'Pyrodwarf'		

После предвиђеног времена (14 и 21 дан) лаганим притиском и одвањем гомилица испитивала се јачина споја оценама од 0 до 2: 0 = спој није остварен; 1 = спој који се на јачи притисак иглом, одваја; 2 = спој који је остао чврст после манипулације. Уједно је и забележена појава тамне линије између споја калуса или потамњивање неке од гомилца калуса које су у споју. Оглед је поновљен 3 пута у 3 понављања са по 5 спојева. Културе калуса су гајене у климатизованој просторији са контролисаном температуром (23 ± 1 °C) у мраку.

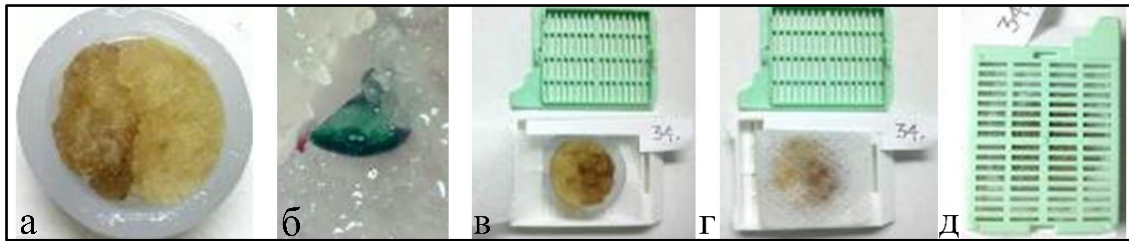
У периодима када је вршена анализа споја калуса праћена је промена боје калуса како на целој површини калуса тако и на споју.

3.4.2. Припрема спојева калуса за цитолошку анализу

За успешну припрему калусних спојева за цитолошке препарате, гомилице калуса поменути величине постављане су једна до друге, тако да су се једном ивицом додиривале. Да би се спречио раст калуса у супротну страну од споја, овако спојени калуси су уметнути у полиетиленски прстен пречника 9 mm (Mng'omba et al., 2007).

3.4.2.1. Припрема трајних препарата

За припрему трајних хистолошких препарата, спојеви калуса у прстеновима стављани су у пластичне калупе. Да би се избегла грешка у идентификацији калусног ткива подлоге и племке, у калус једне је уметан део четине (на препарату добро уочљиво ткиво, које је послужило за правилну оријентацију) усправно постављено у ткиво калуса. Поред тога, са обе отворене стране прстена је постављана трака филтер папира да би се онемогућило расипање калуса из прстена и пролазак кроз перфорације калупа (слика 8).



Слика 8. Припрема спојева калуса за цитолошку анализу; а) спој два калуса у полиетиленском прстену; б) део четине уметнут у калус; в) прстен на филтер папиру у калупу; г) прекривање споја у прстену филтер папиром; д) припремљен узорак у калупу за фиксацију

Тако припремљени прстенови са калусом у калупима фиксирани су у FAA фиксативу. FAA фиксатив (Formalin–Acetic acid–Alcohol) по саставу је: 40 % продајни формалин – 5 ml, глацијална сирћетна киселина – 5 mL и 70 % етил алкохола 90 ml. Фиксирање материјала (калуса) вршено је у одговарајућим стакленим посудама а запремина фиксатива је била двоструко већа од запремине материјала. У овом фиксативу материјал је стајао 24 часа а затим је испиран у 70 % алкохолу. Раствор алкохола је мењан на сваких 24h до потпуног испирања глацијане сирћетне киселине (до потпуног нестанка карактеристичног мириса). После испирања, материјал је конзервиран у 70% раствору етанола до поступка прављења парафинских препарата. Читав процес припреме и прављење препарата за хистолошку анализу рађен је у хистолошкој лабораторији Пољопривредног Факултета у Београду, на Катерди за Агроботанику.

Поступак припремања парафинских блокова за сечење микротомом састојао се у дехидратацији и просветљавању узорака пре инфилтрације парафином. Дехидратација је рађена провођењем материјала кроз серију алкохола све веће до апсолутног алкохола у аутоматском ткивном процесору LEICA TP1020. Да би се омогућило прожимање узорака парафином, етанол је замењен агенсом који не садржи воду, а у коме се парафин раствара и при овом процесу коришћен је ксилол (Ху). У ксилол-парафину материјал је стајао 24 сата, после чега је ксилол-парафин замењен чистим растопљеним парафином (тачке топљења од 52–57 °C). Материјал је после тога вађен из привремених пластичних калупа, полиетиленски прстенови су пажљиво уклањани са препарата (да не дође до одвајања различитих делова калуса) а калусно ткиво је постављано у метални калуп. Растопљени парафин (тачке топљења 56–58 °C) је наливан у калупе из парафинског диспензера са интегрисаном топлом плочом тип Leica EG1130.

Етикета са обележјем препарата уметана је у топао парафин после чега је калуп премештан на хладну плочу. На овај начин припремљени парафински калупи су коришћени за прављење трајних микроскопских препарата (слика 9).



Слика 9. а) парафински диспензер са интегрисаном топлом плочом;
б) хладна плоча; в) парафински калуп са узорком

Сечење калупа је вршено клизним микротомом на пресеке дебљине 10 μm . На предметна стакла је, пре постављања пресека, равномерно у танком слоју размазиван Мајеров лепак. Исечени пресеци су пажљиво, четкицом пребацивани у водено купатило Leica HI 1210 у коме је температура воде била за неколико степени нижа од тачке топљења парафина, а затим су пребацивани на предметна стакла. На једно предметно стакло је постављано 3 пресека. Предметна стакла са пресецима су остављана да се осуше на собној температури (заштићени од прашине), а затим су сушена у термостату на 60 $^{\circ}\text{C}$ у трајању од неколико дана.

Бојењу препарата у центру за бојење Leica ST 4040 претходио је процес депарафинирања и рехидратације. Уклањање ксилола је вршено потапањем плочица у ксилол (5 до 10 минута), апсолутни етил алкохол (5 до 10 минута), а затим су пресеци провлачени кроз растворе етанола све ниже концентрације до 50% етанола или до воде, што је зависило од следеће фазе, односно од растварача у коме је растворена боја. У сваком алкохолу препарати су остајали по 5 минута.

Хистолошке боје коришћене за препарате:

- Ради локализације пектина пресеци су двојно бојени сафранином (1 % раствором у 50 % етанолу) и алцијан плавим (1% раствор у дестилованој води) Депарафинисани и рехидратисани пресеци су бојени у сафранину 5 минута и у алцијан плавој 2 минута, а затим дехидратисани провођењем кроз серију алкохола растуће концентрације до апсолутног етанола. После тога су кратко потапани у ксилол, а на пресек је постављана покривна

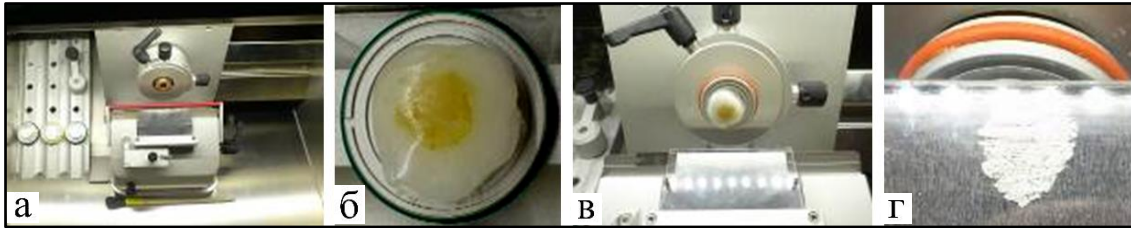
плочица залепљена Канада балзамом. После сушења у термостату добијени су трајни микроскопски препарати на којима су пектини и целулозни ћелијски зидови обојени плавом бојом, а лигнификовани или оплутали ћелијски зидови црвеном бојом.

- Локализација пектина је потврђена и бојењем рутенијум црвеном (0,02% раствор у 10 % воденом раствору натријум ацетата). Депарафинисани и рехидратисани пресеци су бојени 5–10 минута, кратко испирани у дестилованој води и осушени на ваздуху, после чега су прекривани канада балзамом и покровним стаклом чиме су добијени трајни микроскопски препарати. На овај начин пектини се боје тамно розе.
- Фенолна једињења су на пресецима бојена толуидин плавом (0,02 % водени раствор). Пресеци су 1 минут бојени у раствору боје, а затим испирани у води и дехидратисани провођењем кроз серију алкохола растуће концентрације све до апсолутног етанола. На пресек је постављена покривна плочица залепљена Еупаралом. На овај начин добијени су трајни микроскопски препарати на којима су фенолна једињења обојена плавом бојом, а целулозни ћелијски зидови љубичасто.

Ради локализације липида пресеци су бојени судан црном (0,07 % раствор Sudan Black B у 70 % етанолу). Депарафинисани и рехидратисани пресеци стављени су у раствор боје око 45 минута кратко испрани у 70 % етанолу и поклопљени воденим медијумом. На овај начин добијени су привремени микроскопски препарати на којима су липиди обојени црном бојом.

3.4.2.2. Припрема привремених препарата

Како фенолна једињења имају способност аутофлуоресценције, њихова идентификација и локализација је вршена на епифлуоресцентном микроскопу (микроскоп LEICA DMSL са UV филтером А, excitation Filter BP 340–380 nm /Suppression Filter LP 425). Привремени препарати који су припремани за флуоресцентну микроскопију сечени су криотомом (Kryostat mikrotom / drehbares / halbautomatisch / Stehend Slee MEV) после замрзавања узорака. На овај начин добијени су пресеци дебљине 30 μm (слика 10).



Слика 10. Процес припреме узорака на криотому: а) радни простор криотома; б) узорак калуса замрзнут на носачу в) процес сечења и г) изглед пресека пре стављања на плочицу

Пресеци су стављани на плочицу и уз додавање капи воде прекривани покровним стаклом. Било је могуће припремљене пресеке чувати краће време у замрзивачу. Основни принцип рада епифлуоресцентног микроскопа је да објекат осветљен зрацима једне таласне дужине, апсорбује ове зраке, а у исто време реемитује светлост веће таласне дужине и мање енергије. Реемисија даје утисак да је светлост дошла од самог објекта па се чини да он светли наспрам тамног видног поља. Ако се узорак осветли ултравиолетним зрацима (пореклом од живине лампе), уз примену одговарајућих филтера, фенолна једињења ће емитовати светлоплаву светлост.

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

За хемијске анализе, калус који је спајан као хомео или хетеропластична комбинација, постављан је на хранљиви медијум по делом измењеној процедури. Да би се онемогућило евентуално слепљивање дела агара за хранљиве подлоге за узорак калуса на ком се вршила хемијска анализа, на хранљиву подлогу је постављан филтер папир на који је потом постављан спој калуса (слика 11).



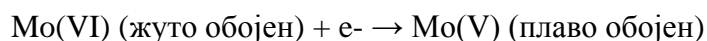
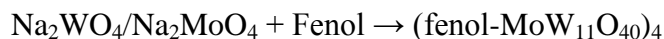
Слика 11. Припрема спојева калуса: а) припремљено место за калус на агару; б) постављање филтер папира; в) спој калуса пре узимања на анализу

По истеку 21. дана одмерено је 5 g свежег узорка хомогенизованог калуса и премештено у ерленмајер посуде са додатком 25 ml екстракционог средства (0,1% раствор HCl у метанолу). Ерленмајер је постављен на магнетну мешалицу, где је узорак мешан 60 мин, после чега је профильтриран кроз газу, како би се уклонио чврст остатак, који је потом подвргнут још двома реекстракцијама са 25 ml наведеног растварача и мешан на магнетној мешалици по 60 мин. Сви екстракциони делови су сакупљени у један тотални екстракт и пренети у фрижидер да стоје 24 часа или преко ноћи. Тотални екстракт је затим упараван на вакуум упаривачу (40 °C). Добијени раствор је квантитативно пренет у нормални суд од 25 ml и допуњен до црте смешом метанол/вода (70/30 v/v). Поступак је поновљен за сваки узорак појединачно. Тако припремљени раствори су коришћени за даљи рад.

За анализу шећера одмеравана је маса од 1 g сваке од комбинација испитиваних спојева. Узорак је растваран у 50 ml дестиловане воде и 3 пута по 30 минута растваран у ултразвучном купатилу, после чега је одвојен водени раствор. Тако припремљен узорак је центрифугиран у трајању од 15 min на 9.000 обртаја у минути, филтриран и чуван у замрзивачу за даљу анализу.

3.4.3.1. Одређивање укупних полифенолних једињења

За одређивање садржаја укупних полифенола у припремљеним узорцима коришћена је спектрофотометријска метода по Folin-Ciocalteu. Метода је заснована на оксидацији полифенолних једињења помоћу реагенса, раствора Folin-Ciocalteu, који садржи смешу фосфомолибденске и фосфоволфрамове киселине. Оксидујући фенолна једињења реагенс се сам редукује у смешу молибден-оксида и волфрамоксида.



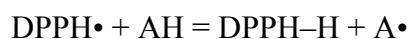
Интензитет новонасталог раствора плаве боје је пропорционалан концентрацији фенола. Интензитет се мери на UV/VIS спектрофотометру, на таласној дужини $\lambda = 760 \text{ nm}$.

Калибрациона крива се конструише као зависност апсорбанције стандарда галне киселине од концентрације употребљених стандардних раствора. На основу измерених апсорбанци, са калибрационе криве се одређује масена концентрација (mg/mL) полифенолних једињења коришћењем једначине праве, односно садржај укупних фенола, ТРС (Total Phenol Content) изражава се као mg GAE/g сувог екстракта (Gašić et al., 2014).

За одређивање садржаја укупних полифенола направљени су раствори: 10 % раствор Folin-Ciocaltey, 7,5 % раствор Na₂CO₃ и стандардни раствори галне киселине (GA) у концентрацијама од 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm и 100 ppm. У све епрувете је додато по 0,5 ml дејонизоване воде помоћу микро пипете. У прву епрувету додато је 0,5 ml ултра чисте воде, а у наредних пет епрувета редом су додавани стандардни раствори галне киселине од 20–100 ppm. После тога у остале епрувете додато је по 0,5 ml претходно припремљених раствора узорака. У све епрувете је потом додат најпре 10% раствор Folin-Ciocaltey, па су епрувете остављене да стоје 5 минута, а затим 7,5 % раствор Na₂CO₃. Тако припремљени узорци остављени су у мраку да стоје наредна 2 сата после чега је вршено спектрофотометријско мерење апсорбанције на таласној дужини од 760 nm. Коришћена калибрациона права представља зависност апсорбанције А од концентрације (mg/L), стандардних раствора галне киселине.

3.4.3.2. Одређивање антиоксидативне активности

Антиоксидативна активност узорака је анализирана помоћу DPPH теста. Овај антиоксидативни тест заснива се на праћењу трансформација стабилног љубичасто обојеног DPPH радикала (2,2-дифенил-1-пикрилхидразил) који реагује са дономом протона и прелази у редуковани жуто обојени облик DPPH-H.



Апсорбанце добијених раствора одређују се спектрофотометријски на таласној дужини 515 nm, после стајања узорка на собној температури, у мраку око 30 минута уз метанол као референтни раствор. Као слепа проба служи раствор DPPH и дејонизоване воде. На основу измерених разлика апсорбанси $\Delta A = A$

слепе пробе – A узорка, са калибрационе криве стандардног раствора тролокса одређена је укупна антиоксидативна активност у mmol/mL коришћењем једначине праве а затим је укупна антиоксидативна активност у полазном узорку изражена као еквивалент тролокса (Pavlović, 2013).

$$RSA = (A \text{ слепе пробе} - A \text{ узорка}) / (A \text{ слепе пробе})$$

RSA – Radical Scavenging Activity (Укупна антиоксидативна активност)

A слепе пробе – апсорбансија раствора DPPH и дејонизоване воде

A узорка – апсорбансија раствора DPPH са узорком

Направљени су стандардни раствори тролокса од 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 и 800 $\mu\text{mol/L}$. У епрувете је додато по 0,1 mL MeOH (у 3 кивете које представљају бланк), затим су додати у наредне епрувете стандарди (редом од 100 $\mu\text{mol/L}$ до 800 $\mu\text{mol/L}$) по 0,1 mL, и у остале епрувете је додато по 0,1 mL екстракта претходно разблаженог. За сваки узорак су прављене по две пробе. У сваку епрувету је додато по 4 mL метанолног раствора DPPH (2,8 mg у 100 mL метанола). Епрувете су остављене да стоје 60 минута у мраку, а затим је апсорбансија мерена на 515 nm.

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

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

Приликом припрема стандардних раствора, основни раствор смеше свих полифенолних стандарда направљен је растварањем у метанолу, тако да сваки од њих има концентрацију око 1.000 mg/L у смеси. Разблаживањем основног раствора мобилном фазом добијена је серија радних раствора следећих концентрација: 0,010, 0,050, 0,100, 0,250, 0,500, 0,750, 1,000 и mg/L. Полазни и радни раствори су чувани у мраку на 4 °C. Калибрационе криве су добијене корелисањем површине пикова са концентрацијом стандардних раствора.

Раздвајање и квантификација полифенола у узорцима урађени су на *Dionex Ultimate 3000 HPLC* систему опремљеним са UV диодним детектором (eng. *diode array detector, DAD*) који је повезан на *TSQ Quantum Access Max* масени спектрометар са детектором са три анализатора – троструки квадрупол, скраћеница *QQQ*, engl. *triple quadrupol (UHPLC-DAD MS/MS)*. Елуирање је изведено на 40 °C на Synchronis C18 аналитичкој колони. Мобилна фаза се састојала од воде + 0,1% сирћетна киселина (А) и ацетонитрила (В), који су били у следећем градиенту концентрације: 5% В, 2,0 мин; 5–95 % В, 2.0–12.0 мин; 95 %–5 % В, 12.0–12.2 минута; 5 % В до 15 мин. Проток је био подешен на 0,3 mL/min, а таласне дужине на 254 и 280 nm. Ињекциона запремина је била 5 µL.

TSQ Quantum Access Max масени спектрометар био је опремљен јонским извором у облику електроспреј јонизације (engl. *ElectroSpray Ionization, ESI*) на температури од 200 °C, напон спреја био је 5 kV и температура капиларе 300 °C (Gašić et al., 2015). Масени спектрометар је снимао масе у негативном моду у опсегу од 100 до 1000 *m/z*. У циљу квантификације полифенола за сваки стандард посебно је снимљен молекулски јон и два најинтензивнија фрагмента из MS² спектра.

За контролу инструмента коришћен је *Xcalibur* softver (верзија 2.2). Полифеноли су идентификовани директним поређењем са комерцијалним стандардима, а укупан садржај сваког једињења израчунат је интеграцијом површина пикова и изражен је као mg/kg.

Статистичка анализа података

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

4. РЕЗУЛТАТИ РАДА

4.1. УСПОСТАВЉАЊЕ СТЕРИЛНЕ КУЛТУРЕ НА ПРЕЛИМИНАРНИМ УЗОРЦИМА

Резултати о успостављању стерилних култура при коришћењу две методе за припрему пупољака врста *Prunus avium* и *Prunus 'Colt'*, одлучивали су о избору и коришћењу једне, за сва даља истраживања. Према добијеним резултатима, коришћење пупољака узетих са грана аклиматизованих у лабораторијским условима у трајању од 10 до 15 дана, дали су резултате на основу којих се за сва даља истраживања користио овај метод (табела 4).

Табела 4. Однос процента контаминираних, здравих, калусираних и некротираних пупољака са отворног поља и из лабораторијских услова. Према анализи Mann-Whitney U-test, $p < 0,05$ (вредности означене * указују на постојање статистички значајне разлике у поређењу два узорка, **ns** указује да разлика у средњим вредностима није на значајном нивоу)

SH		тип експланата	контаминирани (%)	здрави (%)	некротирани (%)	% калусираних пупољака од здравих
BAP	2.4D					
mgL ⁻¹	mgL ⁻¹					
0,5	2					
<i>Prunus 'Colt'</i>	пупољци са отвореног поља	33,3	46,7	19	87,5	
	пупољци из лабораторије	20,8*	66,7*	12,5 ^{ns}	100 ^{ns}	
<i>Prunus avium</i>	пупољци са отвореног поља	41	52,3	8,3	87,5	
	пупољци из лабораторије	12,5*	83,3*	5,6 ^{ns}	91,7 ^{ns}	

Статистички значајне разлике у проценту контаминираних узорака нема код експланата са гранчица донетих са отвореног поља (33,3 и 41 %), али је она значајно мања код пупољака обе врсте на узорцима из лабораторије (20,8 и 12,5 %). Индуковање калуса здравих пупољака код обе врсте је било веома високо, око 90 % у просеку, што је указало да се код обе врсте медијум SH са односом ауксин/citoкинин – NAA 2 mg/L/BAP 0,5 mg/L може сматрати добром подлогом за иницирање калуса. Уносом гранчица у лабораторијске услове са смањеном концентрацијом влаге и екстерних контаминација и лаганом адаптацијом пупољака на топлије услове пре увођења у културу може се постићи одређен степен смањења контаминација изазваних екстерним патогенима. С друге стране зараженост биљке патогенима из спољашње средине у влажним условима почетком пролећа има негативан утицај на успостављење стерилне културе, на

шта су указали добијени резултати.

Други део прелиминарних истраживања односио се на избор матичних стабала одређене старости (јувенилних - до 6 година старих, или адултних стабала, око 20 година старости као потенцијалног извора експаната) са којих се користио материјал за успостављање калусних култура за даља истраживања. И јувенилна и адултна стабла са којих су сакупљани пупољци расту на отвореном, као школован садни материјал. Добијени резултати (табела 5), првенствено указују на постојање јасних статистичких разлика у проценту пропадања узорака постављаних на исти хранљиви медијум и узиманих у истом временском периоду (период мировања вегетације – јануар, фебруар) на којима је примењена иста метода стерилизације биљног ткива.

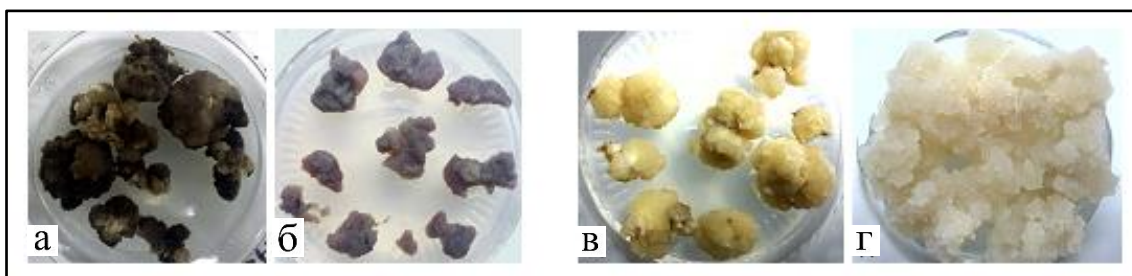
Табела 5. Процентуално пропадање пупољака узетих са адултних и јувенилних стабала. Mann-Whitney U-test, $p < 0,05$ (вредности означене * указују на постојање статистички значајне разлике у поређењу два узорка, ns указује да разлика у средњим вредностима није на значајном нивоу)

Култивар и тип ткива са којих су узимани експланте за културу <i>in vitro</i>		хормони	MS1	MS2	MS3	MS4	MS5
		BAP	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
		2,4D	2				2
		NAA		2		2	
		IBA			2	0,5	0,5
<i>Prunus serrulata</i> 'Amanogawa'	јувенилан	% пропадања	0	8,3	33,3	0	16,7
	адултан		100*	66,7*	91,6*	87,5*	100*
<i>Prunus serrulata</i> 'Kanzan'	јувенилан	% пропадања	33,33	0	25	5,6	20,83
	адултан		62,5*	100*	79,1*	91,6*	62,5*
<i>Prunus serrulata</i> 'Kiku-shidare-zakura'	јувенилан	% пропадања	20,83	25	12,5	20,8	16,7
	адултан		100*	91,6*	91,6*	66,7*	100*

Код сва три култивара, на одређеним медијумима је забележено потпуно пропадање постављених култура: код култивара *Prunus serrulata* 'Amanogawa' пропадање на четири подлоге је преко 85 % (MS1, MS3, MS4 и MS5); код култивара 'Kanzan' на три је преко 80 % (MS2, MS3 и MS4) и код постављених пупољака култивара 'Kiku-shidare-zakura' пропадање од преко 90 % забележено је на свим медијумима осим MS4 (66,7 %). Процент пропадања експаната са јувенилних стабала кретао се између 0 % и 37,5 %.

Резултати који нису статистички обрађени, а који су упућивали на разлике у калусу који је индукован код ова три култивара је и промена боје калуса, односно процес потамњивања.

Код калуса добијеног од пупољака са адултних стабала, промена боје се дешава веома интензивно и уз спорији раст калуса. Ова појава је представљала додатни проблем за даља истраживања. Брже потамњивање подразумевало је и чешћу супкултуру калуса на нове хранљиве медијуме, мада код сва три култивара ова мера није значајно утицала на формирање белог, растреситог калуса потребног за део истраживања компатибилности, метом спајања калуса у култури *in vitro*. За разлику од поменутог, калус добијен са јувенилних матичних стабала, повећава масу знатно брже и у условима климатизоване просторије за растење (мрак, температура 23 ± 2 °C) у периоду од 20-так дана добија се маса фибрилног белог калуса код ког је супкултуру било могуће радити у просеку после 4 недеље (слика 12).



Слика 12. Изглед индукованог калуса а) са адултног матичног стабла; б) после супкултуре; в) са јувенилних стабала; г) после супкултуре

Када се упореде просечне средње вредности процената контаминација које су добијене на јувенилним узорцима раздвојене према медијумима не појављују се статистички значајне разлике, а проценти се крећу између вредности 8,33 до 23,8 % (табела 6).

Табела 6. Средње вредности процента контаминација на пупољцима са јувенилних матичних стабала. Вредности означене истим малим словом нису статистички значајно различите (ANOVA, $p < 0,05$; LSD тест)

подлога	% контаминација	подлога	% контаминација	подлога	% контаминација
MS1	20,83 ^a ± 3,872	WP1	16,67 ^a ± 4,551	SH1	8,33 ^b ± 3,021
MS2	11,11 ^{ab} ± 2,213	WP2	22,22 ^a ± 3,455	SH2	14,3 ^{ab} ± 0,498
MS3	23,8 ^a ± 7,446	WP3	25 ^a ± 7,210	SH3	12,5 ^{ab} ± 0,893
MS4	8,33 ^b ± 1,962	WP4	9,52 ^{ab} ± 0,571	SH4	8,33 ^b ± 1,600
MS5	19,04 ^a ± 4,239	WP5	22,2 ^a ± 3,417	SH5	16,7 ^{ab} ± 1,241
F = 1,42; p = 0.1684* не постоји сигнификантна разлика, p > 0,05					

По извршеној анализи процената контаминација, извршен је избор материјала на ком су спроведена даља истраживања. Сав материјал је узиман са стабала која су била старости до 6 година, а на свим узорцима је примењена описана процедура стерилизације.

4.2. РЕЗУЛТАТИ ИНДУКЦИЈЕ КАЛУСА ИЗ МЕРИСТЕМА БОЧНИХ ПУПОЉАКА И ВЕГЕТАТИВНИХ ДЕЛОВА ЛЕТОРАСТА

После добијених прелиминарних резултата, а у циљу индуковања калуса на свим врстама и култиварима примењене су две групе експаната за које су резултати изнети у даљем тексту. У првом поглављу су изнети резултати добијени индукцијом калуса из меристема бочних пупољака, а у другом индукција калуса из вегетативних делова неодрвењених летораста узиманих са отвореног поља.

Комбинацијом различитих регулатора растења на три хранљиве подлоге (MS, WP и SH) за сваку испитивану врсту и култивар издвојени су најпогоднији медијуми не само за иницирање калуса већ и за успешан даљи раст калуса. Према добијеним резултатима може се рећи да је било неопходно за сваки култивар и врсту испитати утицај различитих комбинација односа ауксина и цитокинина.

4.2.1. Индукција калуса из меристема пупољака три култивара *Prunus serrulata*

Меристеми бочних пупољака култивара *Prunus serrulata* показују различите реакције на комбинације хормона у хранљивим подлогама. Према анализи резултата најпогодније подлоге за култивар 'Amanogawa' су подлоге код којих је NAA главни извор ауксина у подлози (MS4, MS2, WP2 и SH2). На хранљивом медијуму MS4 уз ауксин NAA (од 2 mg/L), додаток IBA са статистичком значајношћу повећава индукцију калуса са 83,33 (MS2) на 100 % пупољака (MS4), док је код подлога са ауксином 2,4-D обрнуто: подлога MS1 изазвала је индукцију калуса на броју пупољака који се значајно разликује од броја индукованих на хранљивој подлози са додатим IBA (79,10 % на MS1 у односу на 54,2 на MS5). Најлошији резултати забележени су на подлози са IBA

као извором ауксина (табела 7).

На подлози WP2, добијен је значајан проценат пупољака са калусом у основи (91,7 %), што се по статистичким параметрима не одваја од максималних вредности индукције калуса ове врсте. Остале комбинације фитохормона на овој подлози, осим оне на WP4, са 62,5 % индукованих пупољака, нису значајно утицале на појаву калуса. Код подлоге SH, при повећању концентрације ауксина уз NAA додавањем ИВА, значајно се смањује проценат индукције (100 % на SH2 према 70,83 % SH4). Исти медијум са комбинацијама хормона без NAA не индукују калус на више од 25% пупољака. Код две групе хранљивих подлога: WP и SH, ауксини 2,4-D и ИВА у међусобним комбинацијама или самостално, у концентрацији од 2 и 0,5 mg/L нису дали већи проценат индукције калуса на пупољцима култивара ‘Amanogawa’ од 35 %.

Табела 7. Средње вредности процента индукције калуса код три култивара јапанских трешања. Вредности означене истим малим словом нису статистички значајно различите (ANOVA, $p < 0,05$ LSD тест)

ХОРМОНИ					% индукције калуса из пупољака племки		
conc. (mgL ⁻¹)							
ВАР	2,4D	NAA	ИВА	ознака подлога	<i>Prunus serrulata</i>	<i>Prunus serrulata</i>	<i>Prunus serrulata</i>
					‘Amanogawa’	‘Kanzan’	‘Kiku shidare zakura’
0,5	2			MS1	79,10 ^b ±7,981	62,50 ^{cd} ±4,175	45,80 ^{cde} ±3,556
0,5		2		MS2	83,33 ^b ±6,797	100,00 ^a ±0,000	38,90 ^{de} ±6,762
0,5			2	MS3	33,30 ^e ±2,946	41,60 ^{de} ±4,820	62,50 ^c ±7,972
0,5		2	0,5	MS4	100,00 ^a ±0,000	79,12 ^{bc} ±4,150	41,60 ^{de} ±5,533
0,5	2		0,5	MS5	54,20 ^d ±4,175	66,67 ^c ±6,797	58,30 ^{cd} ±10,760
0,5	2			WP1	25,00 ^e ±5,533	54,20 ^d ±3,247	54,20 ^{cde} ±4,175
0,5		2		WP2	91,70 ^{ab} ±8,333	50,00 ^d ±6,817	5,60 ^f ±1,699
0,5			2	WP3	16,65 ^f ±2,612	33,33 ^e ±3,247	38,90 ^{de} ±4,175
0,5		2	0,5	WP4	62,50 ^{cd} ±14,498	50,00 ^d ±6,817	5,60 ^f ±2,496
0,5	2		0,5	WP5	33,33 ^e ±2,976	50,00 ^d ±7,980	58,30 ^{cd} ±9,612
0,5	2			SH1	0,00 ^f ±0,000	100,00 ^a ±0,000	66,70 ^c ±6,023
0,5		2		SH2	100,00 ^a ±0,000	91,67 ^b ±8,325	62,50 ^c ±4,151
0,5			2	SH3	25,00 ^e ±4,792	54,20 ^d ±4,820	41,60 ^{de} ±4,792
0,5		2	0,5	SH4	70,83 ^c ±12,497	87,50 ^b ±7,994	100,00 ^a ±0,000
0,5	2		0,5	SH5	12,50 ^{ef} ±6,797	75,00 ^{bc} ±0,000	79,17 ^b ±7,968

Индукција калуса из пупољака култивара ‘Kanzan’ је најинтензивнија и успоставља се у проценту од 79,12 % до 100 % на пет комбинација хормона на

подлогама SH и MS. Најбољи резултати (100% индукција) на MS подлози се добија коришћењем NAA (MS2). Иста подлога са количином додатног ауксина IBA од 0,5 mg/L индукује формирање калуса на 79,17 % пупољака (MS4), што се по статистичкој значајности раздваја у другу хомогену групу али такође спада у висок проценат индукције.

Коришћењем ауксина 2,4-D на MS подлози добијају се статистички значајно нижи проценти индукције (62,5 и 66,67 %), од MS подлога са NAA, али се може рећи да за овај култивар и 2,4-D даје позитивне резултате индукције калуса. На MS подлози коришћењем само IBA снижава се индукција калуса на 41,6 % (MS3). Појава калуса на WP подлози, показује да 2,4-D има утицај на индукцију приближно као и NAA. Ако се 2,4-D користи као једини ауксин у овој хранљивој подлози, проценат индукције је 54,2 % (WP2). По додавању IBA уз 2,4-D смањује се проценат пупољака код којих је забележена калусна реакција на 50 %, али ова вредност није статистички значајна за индукцију калуса на подлози WP. Исти проценат се бележи и при коришћењу NAA у обе комбинације на WP медијуму.

Утицај IBA као јединог ауксина на WP медијуму иницира најмањи проценат пупољака на пролиферацију калуса, само 33,3 %. Ова вредност се и по статистичкој значајности издваја као најлошија. Реакција постављених пупољака на SH подлози не показује значајне разлике у коришћењу 2,4-D и NAA у комбинацији или без, мањег удела IBA (индукује се калус код SH5 75 %, SH4 87,5 %; SH2 91,67 %; и 100 % пупољака на SH1). За овај медијум се може рећи да је најповољнији за индуковање калуса из пупољака култивара 'Kanzan'. То потврђује и најлошији резултат који је забележен код коришћења IBA од 2 mg/L уз константну концентрацију BAP од 0,5 mg/L, када се индуковао калус до 54,2 % пупољака, што јесте најнижа вредност за овај медијум али је вредност која показује да је индукција забележена на више од половине постављених експланата. Уопштено, за овај култивар се може рећи да има широк опсег позитивне реакције на све три коришћене подлоге.

Култивар 'Kiku-shidare-zakura' показује одређене разлике у реакцијама пупољака издвојених на различитим подлогама у односу на претходно поменута два. Осим код подлоге SH, ауксин NAA који је код две претходне врсте имао

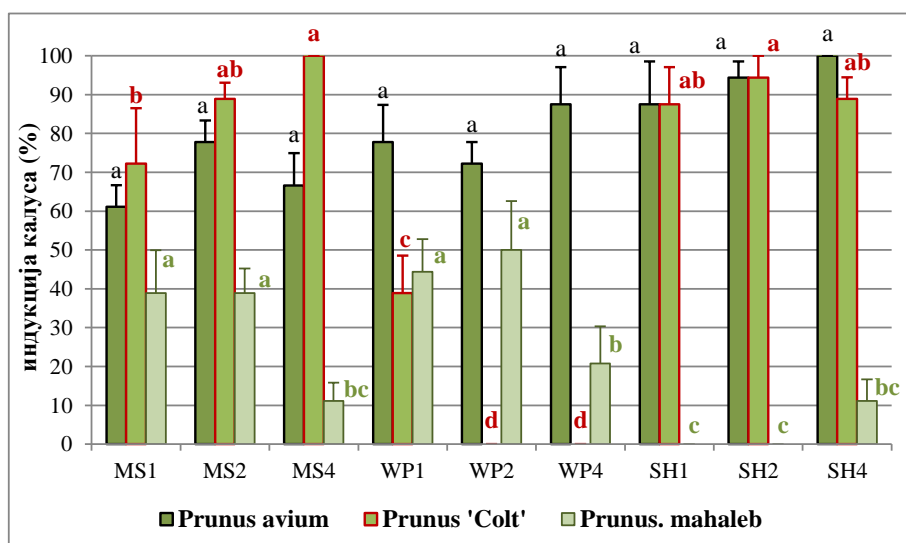
значајан утицај на индуковање калуса, код овог култивара је дао значајно слабије резултате. Око 40 % на медијуму MS2 и MS4 и око 6 % на WP подлози (на MS подлози код претходна два култивара NAA изазива индукцију на око 80 % пупољака, или више). Код обе подлоге ова вредност се и статистички издваја као најлошија.

С друге стране IBA као извор ауксина је дала релативно добар резултат од 62,5 % на медијуму MS и 38,9 % на медијуму WP. И ауксин 2,4-D на подлогама MS и WP индукује калус у вредностима који се крећу између 45,8 % (MS1), 54,2 % (WP1) и 58,3 % на MS5 и WP5. Све вредности не показују међусобом статистички значајну разлику у распореду. Слаба значајност разлика у односу на поменуте вредности (појава преклапања међу групама) јавља се и код SH медијума у ком су коришћени самостално неки од ауксина 2,4-D, NAA и IBA са 66,7 % на подлози SH1, 62,5 % на SH2 и 41,6 % на SH3. Најбољи резултати који су добијени код овог култивара су вредности од 100 % на SH4 и 79,12 % на SH5, распоређене тако да указују да између њих постоји статистички значајна разлика, али и да се сви претходно поменути резултати распоређују по значајности као слабији.

4.2.2. Индукција калуса код врста коришћених као подлоге за калемљење

За обичну трешњу и клон 'Colt' индукција калуса на изабраним медијумима и одговарајућим односом хормона је веома успешна, док за магриву проценат успешности опада уз појаву и потпуно неодговарајућих хранљивих подлога (графикон 1). Средње вредности броја инокулираних пупољака обичне тершње код којих је забележена појава калуса на свих девет хранљивих подлога кретала се од 66,7 % на MS4 до 100 % на SH4. Анализа варијансе и вишеструких опсега не показује статистичку значајност у разликама анализираних вредности што значи да све комбинације регулатора растења на три изабране подлоге дају задовољавајуће резултате. На преко 87,5 % постављених пупољака се индукује калус на подлози SH, без разлике да ли је од ауксина коришћен 2,4-D или NAA. Са коришћењем NAA проценат индукције расте до 100 % када је ово једини извор ауксина, односно 94,4 % са додатком IBA.

Графикон 1. Индукција калуса из пупољака таксона коришћених као подлога: вредности су приказане као средње вредности ± стандардна грешка. Вредности које се односе на једну врсту и различите медијуме и означене су истим малим словом и истом бојом, нису статистички значајно различите, $p < 0,05$ (ANOVA, LSD тест).



За *Prunus* 'Colt' се WP подлога показала неодговарајућом за индукцију калуса. Са NAA у хранљивој подлози, процес индуковања калуса из меристема пупољака изостаје а на WP4 ни додавање IBA од 0,5 mg/L не доводи до индукције. Са применом 2,4-D у WP подлози, процес је забележен на око 40 % пупољака.

На остале две хранљиве подлоге у средњим вредностима индукције показује се одређени степен разлике са статистичком значајности: калус се јавља на преко 72,2 % пупољака при коришћењу 2,4-D у MS1 подлози; коришћењем NAA при додавању IBA индукција расте са 88,9 на MS2 ка 100 % на MS4). Значајност се бележи између вредности за MS1 и MS4. При коришћењу SH хранљивог медијума нема статистички значајних разлика између добијених средњих вредности од 87,5 до 94,4 %.

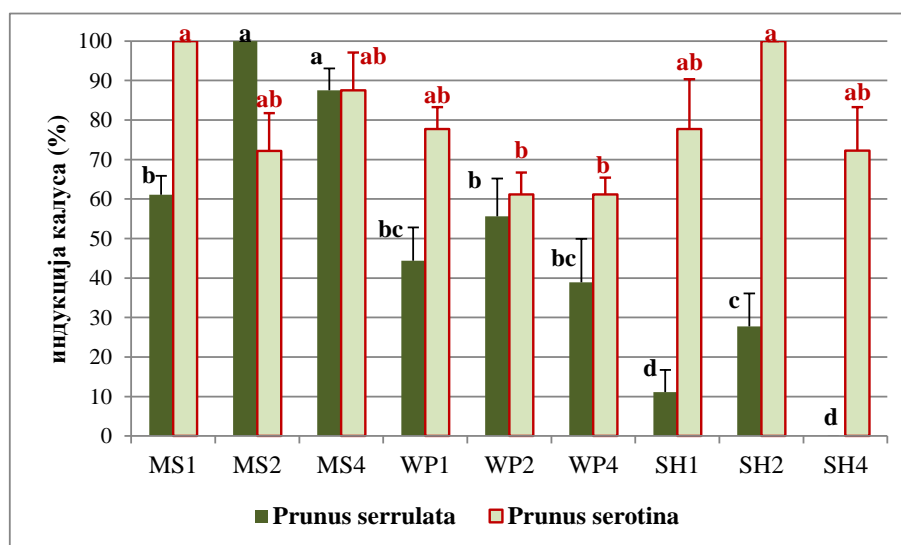
Код магриве, индукција на изабраним хранљивим медијумима је била најслабија и ни у једној комбинацији фитохормона није прелазила 50 %. У опсегу око ове вредности, кретали су се резултати добијени за MS1, MS2, WP1 и WP2. Додавањем додатне количине ауксина IBA у обе ове подлоге, индукција опада на вредности које су статистички значајно лошији резултати (на MS4 вредност је 11,1 % а на WP4 је 20,8 %). Овим вредностима се може придружити и вредност добијена на медијуму SH4. Концентрација NAA и BAP у SH1 и SH2 медијумима и

њихов однос, показао се неодговарајућим за процес индуковања калуса код пупољака магриве (графикон 2). Добијене вредности од 0 до 11,1 % се статистички издвајају као најлошије.

На преостале две врсте *Prunus serrulata* и *Prunus serotina* индукција калуса из пупљака дала је резултате приказане на графикону 2. Код јапанске трешње индукције је било на свим медијумима осим на SH4. Процент је варирао у вредностима од 0 до 100 %. Најбољи одговор је добијен на подлогама MS2 и MS4 и ове вредности се издвајају по статистичкој значајности као најбоље. Око 60 % пупољака индуковало је калус на медијумима MS1 и WP2 а средње вредности индукције добијене на WP1 и WP4 (38,9 и 44,4 %) се не издвајају по значајности као слабије од претходно поменутог резултата. Хранљива подлога SH не може се сматрати погодном за процес индуковања калуса из пупољака *Prunus serrulata*.

Касна сремза, као и обична трешња показала је да јој одговара већи број различитих медијума за успешну индукцију калуса. Ово је једна од врста којој уједно одговара и 2,4-D ауксин додат у сва три основна медијума. На MS1 и SH2 100 % експланата је индуковало калус у основи, а од ове вредности нису се разликовали ни резултати добијени на WP1, SH1, MS2 и MS4. Резултати који се по статистичкој значајности могу издвојити као лошији су добијени на медијумима WP2 и WP4.

Графикон 2. Индукција калуса из пупољака врста *Prunus serrulata* и *Prunus serotina*. Вредности (средња вредност ± стандардна грешка) које се односе на исту врсту и различиту хранљиву подлогу, а означене су истим малим словом не показују значајну разлику за статистички ниво анализе ($p < 0,05$, ANOVA, LSD тест).



У циљу наставка истраживања и издвајања хранљивих подлога које су се показале као најпогодније за индуковање калуса, упоређени су резултати средњих вредности индукције за све таксоне. Добијени резултати анализе варијансе и вишеструких интервала приказани су у табели 8 и графикону 3.

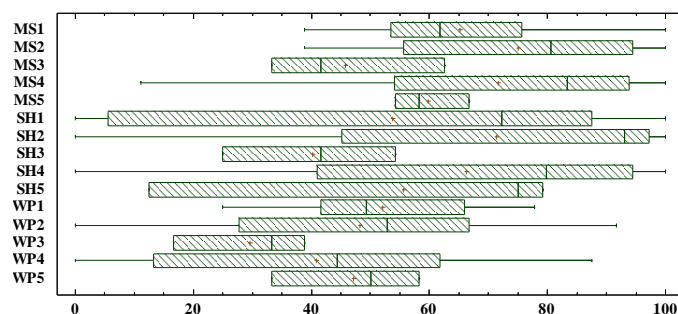
Анализа варијансе средњих вредности индукције калуса из пупољака свих таксона, указује на хетерогеност података и појаву високих вредности за варијациони коефицијент. Средње вредности се крећу од 29,96 за WP3 до 75 % на хранљивој подлози MS2. Анализа Kruskal-Wallis тестом указује да је р-вредност већа од 0,05 и да не постоји значајна статистичка разлика између медијана на нивоу поузданости од 95,0 %.

Хранљиве подлоге на којима долази до индукције калуса у највећем проценту су MS2, MS4 и SH2 подлоге, што издваја ауксин NAA погоднијим за индукцију од 2,4-D и ИВА. Уједно, како се и коефицијент варијације за податке код MS2 креће око 30% (граница хомогености скупа) ова подлога би се могла сматрати најпогоднијом за индукцију калуса из пупољака за већи број испитиваних таксона.

Табела 8. Средње вредности процента индукције калуса на свим хранљивим медијумима на нивоу значајности $p < 0,05$ (ANOVA, Kruskal-Wallis тест).

ознака подлоге	% индукције	медијана	коефицијент варијације
MS1	65,09 ± 9,612	61,82	29,39%
MS2	75,00 ± 13,381	80,57	32,40%
MS3	45,80 ± 8,678	41,60	32,85%
MS4	71,68 ± 10,848	83,31	43,35%
MS5	59,72 ± 3,669	58,30	10,64%
WP1	52,08 ± 4,743	49,30	35,21%
WP2	48,28 ± 13,394	52,80	64,72%
WP3	29,63 ± 6,665	33,33	39,08%
WP4	40,80 ± 17,731	44,45	74,43%
WP5	47,21 ± 7,351	50,00	26,94%
SH1	53,82 ± 9,399	72,22	79,33%
SH2	71,34 ± 11,368	93,04	53,48%
SH3	40,27 ± 8,465	41,60	36,37%
SH4	66,32 ± 8,458	79,87	59,03%
SH5	55,56 ± 19,597	75,00	67,22%
Kruskal Wallis тест, $p = 0,118$			

Графикон 3. Kruskal-Wallis тест указује да је р-вредност већа од 0,05 и да не постоји значајна статистичка разлика између медијана на нивоу поузданости од 95,0 %



Поред процента индукције калуса из пупољака, добијени су и резултати средњег времена дана када је забележен почетак индукције калуса на пупољцима који нису сврстани у групу контаминираних и пропалих. Праћење појаве калуса трајало је укупно 30 дана. Ако до тог дана није забележена појава калуса, бележен је 30. дан као максимални број дана за индукцију. Утицај медијума на процес индукције калуса обрнуто је сразмеран времену почетка индукције – што је краће време потребно за индукцију то је подлога сматрана погоднијом. У табели 9 су приказани резултати анализе теста вишеструких опсега средњих вредности дана појављивања калуса на пупољцима, код свих испитиваних таксона на свим хранљивим подлогама уз бележење првог и последњег дана индукције.

Табела 9. Анализа варијансе и вишеструких опсега за средње време индукције калуса код таксона изражен у данима; (ANOVA, $p < 0,05$, LSD тест)

Таксон	средње време индукције калуса	први дан	последњи дан
<i>Prunus serrulata</i> ‘Amanogawa’	14,86 ^b ± 1,804	7	30
<i>Prunus serrulata</i> ‘Kanzan’	10,27 ^{bcd} ± 2,896	6	16
<i>Prunus serrulata</i> ‘Kiku shidare zakura’	11,67 ^{bcd} ± 0,701	8	16
<i>Prunus avium</i>	9,78 ^{bcd} ± 0,829	6	13
<i>Prunus</i> ‘Colt’	9,00 ^{cd} ± 1,210	5	30
<i>Prunus mahaleb</i>	20,20 ^a ± 3,940	14	30
<i>Prunus serrulata</i>	9,33 ^{cd} ± 0,866	6	14
<i>Prunus serotina</i>	8,67 ^d ± 1,130	6	14
F = 2,47; p = 0,0313			

Посматрано за целокупан експеримент, први дан када је дошло до појаве калуса у основи пупољка забележен је код *Prunus* ‘Colt’ - 5. дан од постављања експланата на медијум. Битно је указати да је код свих култивара осим код пупољака врсте *Prunus mahaleb* индукција калуса започињала веома рано - до 8 дана. Поред тога, код врста *Prunus avium*, *Prunus serotina*, *Prunus serrulata* и

култивара ‘Kanzan’ и ‘Kiku-shidare-zakura’ сви пупољци су индуковали калус до 16. дана и распоред средњих вредности према анализи указује да не постоје значајне разлике између њих. Значајан број пупољака култивара ‘Amanogawa’ и ‘Colt’ код којих је забележен процес индукције веома рано, утицао је да се и без обзира на појаву пупољака код којих није дошло до индукције до 30. дана, кроз статистичку анализу њихове средње вредности статистички не одвајају као лошије (14,86 % и 9 %) од претходно поменуте групе. Просечно најспорија индукција забележена је код магриве и ова вредност се издваја у посебну хомогену групу (20,2 %). Код ове врсте је забележен и највећи број пупољака код којих индукција није забележена до 30. дана.

Исти параметар – средње време индукције калуса – посматран кроз хранљиве подлоге детаљније разврстава оне подлоге на којима није дошло до индукције, без обзира на врсту или култивар (табела 10). Примећује се да и хранљиве подлоге које су се у укупном односу показале као веома повољне за индукцију калуса, за одређене култиваре и врсте нису дале позитиван резултат у данима почетка индукције калуса.

Табела 10. Средње време индукције калуса на различитим подлогама изражен у данима

подлога	средње време индукције калуса	први	последњи	подлога	средње време индукције калуса	први	последњи	подлога	средње време индукције калуса	први	последњи
MS1	11 ^{cde}	7	16	WP1	12 ^{bcde}	7	17	SH1	11,43 ^{cde}	6	30
MS2	8,14 ^e	6	14	WP2	14,57 ^{bcd}	9	30	SH2	9,43 ^{de}	7	13
MS3	18,3 ^{abc}	11	30	WP3	20,67 ^{ab}	16	30	SH3	23,66 ^a	11	30
MS4	7,71 ^e	5	10	WP4	12,71 ^{bcde}	8	17	SH4	11,43 ^{cde}	6	30
MS5	10,7 ^{cde}	10	14	WP5	12 ^{bcde}	10	16	SH5	10,67 ^{cde}	7	17
F = 2,35; p = 0,0105											

По брзини индуковања калуса код испитиваних врста, најбоље су се показале подлоге MS4 и MS2 код којих и максимални број дана када је забележена индукција не прелази 14 дана (код подлоге MS4 то је 10 дана од постављања експланта на подлогу).

Код свих подлога на којима је за извор ауксина коришћена ИВА (MS3, WP3, SH3) код одређеног таксона на одређеном броју пупољака није забележена индукција калуса ни после 30 дана. Ови медијуми се по добијеним вредностима са статистичком значајношћу издвајају у односу на првопоменуте. Појава

вишеструких преклапања међу добијеним вредностима указује да се појава калуса на већини подлога дешавала између деветог и четрнаестог дана, што се у општем резултату може изразити као релативно кратко време за које долази до индукције калуса.

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

Као додатни параметри за издвајање најповољније подлоге за раст калуса анализиран је степен обојености калуса и маса калуса која се развијала од постављања меристема пупољка на хранљиву подлогу до 35. дана раста на истој подлози. Како промена боје индукованог калуса може указати на акумулацију фенола у ћелијама и старење калуса овај параметар се сматрао битним за издвајање погодних хранљивих медијума за сваку врсту. Раст и реакција калуса индукованог на култиварима *Prunus serrulata* приказани су у табели 11.

Табела 11. Упоредње средњих вредности масе калуса из пупољака, мерене после 35 дана. Вредности које се односе на различите медијуме и означене су истим малим словом, нису статистички значајно различите, $p < 0,05$ (анализа ANOVA, LSD тест).

ХРАНЉИВА ПОДЛОГА	<i>P. serrulata</i> 'Amanogawa'		<i>P. serrulata</i> 'Kanzan'		<i>P. serrulata</i> 'Kiku-shidare zakura'		ПОТАМЊИВАЊЕ	
	маса	боја	маса	боја	маса	боја	степен	боја
MS1	0,011 ^e	0/1	0,342 ^{cd}	2	0,041 ^{cd}	4ц	степен 0 - 4	
MS2	0,572 ^{bc}	1/2ц	0,477 ^{bc}	0	0,074 ^c	0/1 ц		
MS3	0,038 ^e	3	0,021 ^e	0/2	0,042 ^{cd}	3 ц		
MS4	0,952 ^a	0/1	0,382 ^{cd}	0	0,349 ^{ab}	1 ц		
MS5	0,022 ^e	0	0,493 ^{bc}	1	0,082 ^c	4		
WP1	0,151 ^{cde}	3	0,244 ^{cde}	1	0,061 ^c	3 ц	степен 0 - 4ц	
WP2	0,535 ^{bc}	2	0,221 ^{cde}	1/0/2	0,372 ^{ab}	0/1,2 ц		
WP3	0,024 ^e	2	0,023 ^e	1	0,033 ^{cd}	4		
WP4	0,395 ^c	0/1	0,017 ^e	1/2,3	0,244 ^b	0		
WP5	0,117 ^{de}	2	0,024 ^e	3	0,327 ^{ab}	0/2 ц		
SH1	0,000 ^e		0,561 ^b	0/1,3	0,402 ^{ab}	0/1,2 ц		
SH2	0,658 ^b	0	0,956 ^a	0	0,468 ^a	0		
SH3	0,186 ^{cd}	2	0,016 ^e	2	0,311 ^{ab}	2 ц		
SH4	0,183 ^{cd}	0/1,3	0,409 ^{bc}	0/1	0,211 ^b	0		
SH5	0,128 ^{de}	2, 3	0,783 ^{ab}	0	0,355 ^{ab}	0/1ц		

Интензитет раста индукованог калуса на различитим хранљивим

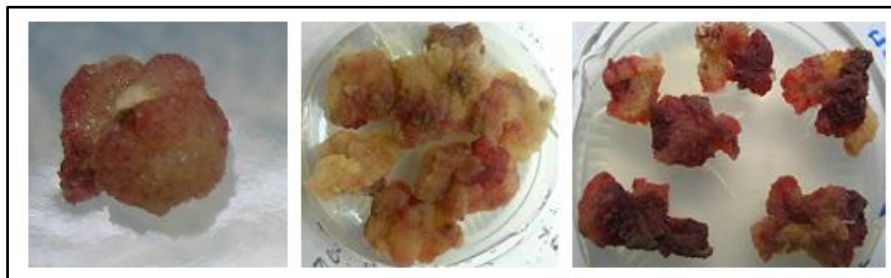
подлогама показује да су варирања у масама већа што се огледа у појави вишеструких преклапања између хомогених група средњих вредности измерених маса. Поред тога, на култивару *P. serrulata* 'Kiku-shidare-zakura' интензивира се појава црвено обојеног калуса, што се показало карактеристиком ове врсте до краја свих огледа.

Калус култивара 'Amanogawa' интензивно расте на подлогама MS4, SH2, MS2 и WP2, што указује да NAA повољно утиче на увећање масе калуса у периоду после индукције из пупољака. Додатни ауксин ИВА у количини од 0,5 mg/L имао је позитиван утицај на раст калуса само на подлози MS (односно маса на MS2 и MS4 се статистички значајно разликује). На остале две подлоге није имао утицај на статистички значајно повећање масе калуса у периоду од 35 дана.

Ауксин 2,4-D имао је утицај на извесно повећање масе калуса само на WP медијуму мада разлика није на значајном нивоу. Промена боје калуса истог култивара која је минимална или уопште није забележена, издваја SH2 и MS4 као најпогодније подлоге (степен обојења вреднован са 0/1 и 0). Уз значајно највећу масу калуса која се индукује на њима, ове подлоге се могу издвојити као најповољније за раст калуса култивара 'Amanogawa'. MS2 и WP2 хранљиви медијуми (на којима је забележено значајно повећање масе калуса) интензивирају боју калуса у нијансама црвене и браон до степена 1/2ц и 2 што указује да је сенесценција калуса, као неповољна појава, присутна на овим медијумима.

Код култивара 'Kanzan' подлога SH2 се и по статистичкој значајности средњих вредности масе калуса и по непромењености боје, може оценити као најповољнија за развој калуса. Добијене вредности се статистички значајно разликују у односу на све остале подлоге осим подлоге SH5 код које ни боја ни маса од 0,783 g нису сигнификантно различите од првопоменуте. Појава двоструких и троструких преклапања вредности добијених на осталим хранљивим подлогама указују на варирање маса мерених узорака. Уједначен раст до приближно пола грама масе калуса и задржавање белог калуса (оцена 0 и 1) на MS2, MS4 и MS5 подлогама, показује да се и MS уз одређен однос ауксина и цитокинина може издвојити као делимично погодан медијум за раст калуса овог култивара. WP подлоге су се издвојиле као најнеповољније (потамњивање калуса је изражено и на подлогама на којима је забележен пораст масе).

Црвена боја калуса која се интензивира са старењем калуса, јавља се код култивара 'Kiku-shidare-zakura' на свим подлогама. Код узорака који пропадају, обојење четвртог степена прелази у тамно мрку (слика 13).







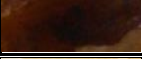
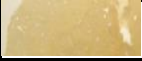




Слика 13. Калус индукован из пупољка *Prunus serrulata* 'Kiku-shidare-zakura' и промена боје калуса током 35 дана

На подлогама SH, маса калуса расте доста уједначено на шта указују преклапања хомогених група између средњих вредности. Раст на свим комбинацијама хормона на SH не показује статистички значајне разлике мада се бољи резултати добијају на подлогама код којих је коришћен само један извор ауксина - као најповољнији се издваја NAA, следи 2,4-D и ИВА. Када се мереним вредностима маса, дода анализа обојења калуса, SH2 се издваја као најпогоднији медијум, јер на подлогама SH1 и SH3 калус временом поприма нијансу црвене, интензитета до другог степена (0/1,2ц и 2ц). Од преостала два медијума, на WP2, WP5 и MS4 се формира маса калуса која се по значајности статистичких разлика не издваја као лошија од горепомнутих (0,37, 0,32 и 0,35), а најслабији раст калуса за овај култивар је на подлози MS. Маса калуса на овој подлози осим код MS4 је статистички значајно мања. Боја калуса има црвену нијансу и на подлогама са NAA има најслабији интензитет, док је код остале три интензитета обојења од 3 до 4.

Калус који је индукован са пупољака врста подлога, није показивао тенденцију промене боје ка црвеној нијанси осим калуса *Prunus avium* и *Prunus* 'Colt' на подлози SH4. У слабом степену обојења код обичне трешње и интензивнијем обојењем калуса култивара 'Colt'. После супкултуре на нов медијум, црвена нијанса је потпуно нестајала. Разлике у средњим вредностима маса развијеног калуса код *Prunus avium* и *Prunus* 'Colt', као и промене у боји калуса ка тамнијој нијанси смеђе или црвене, изражене оценама од 1 до 4 приказане су у табели 12.

Најинтензивнији пораст масе калуса код обичне трешње забележен је на подлогама SH4 и MS4 на којима је дошло до благе промене боје калуса ка црвеној односно жутосмеђој на MS подлози. Скоро двоструко мања маса формирала се на SH1 и MS2 подлози што је статистички значајно нижа вредност, али је боја калуса на овим подлогама потпуно светла, по чему се и ове подлоге могу сматрати повољним за раст калуса код ове врсте. Додатна количина ауксина ИВА, додатог у концентрацији 0,5 mg/L на SH и MS подлози имала је статистички значајан утицај на пораст масе калуса. На осталим врстама хранљивих подлога, пораст калуса није значајан или степен обојења клауса указује да је подлога неодговарајућа.

Табела 12. Анализа средњих вредности масе индукованог калуса за 35 дана (ANOVA, LSD тест, $p < 0,05$) и промене боје калуса. Степени потамњивања калуса приказани су у последњој колони, у којој је словом **Ц** поред броја назначена промена нијансе калуса ка црвеној боји.

ХРАНЉИВА ПОДЛОГА врсте	MS			WP			SH			потамњивање	
	MS1	MS2	MS4	WP1	WP2	WP4	SH1	SH2	SH4		
<i>Prunus avium</i>	0,328 ^b	0,311 ^b	0,697 ^a	0,279 ^{bc}	0,291 ^{bc}	0,21 ^c	0,319 ^b	0,248 ^b	0,731 ^a	0	
<i>Prunus 'Colt'</i>	0,351 ^b	0,505 ^a	0,581 ^a	0,337 ^b	0,000 ^c	0,000 ^c	0,483 ^a	0,518 ^a	0,510 ^a	1	
<i>Prunus mahaleb</i>	0,159 ^{bc}	0,152 ^{bc}	0,174 ^b	0,133 ^c	0,189 ^b	0,231 ^a	0,000 ^d	0,000 ^d	0,094 ^d	2	
<i>Prunus serrulata</i>	0,193 ^c	0,437 ^b	0,635 ^a	0,403 ^b	0,182 ^c	0,388 ^{bc}	0,052 ^d	0,369 ^{bc}	0,000 ^d	3	
<i>Prunus serotina</i>	0,199 ^d	0,383 ^b	0,424 ^{ab}	0,598 ^a	0,308 ^c	0,172 ^d	0,531 ^a	0,323 ^{bc}	0,369 ^b	4	
<i>Prunus avium</i>	2	0	0/1	1	1	1	0	0/1	0/1ц	0	
<i>Prunus 'Colt'</i>	0/2	0/1,2	2	0/1			3	1,2	1ц,3	1ц	
<i>Prunus mahaleb</i>	0/1,2	0/1	2	1	0	0			4	2ц	
<i>Prunus serrulata</i>	0	0	0/1	0	2/3,4	1	1	2		3ц	
<i>Prunus serotina</i>	0/1,2	1	0	0,1	0/1,2	3	1	0	0	4ц	

За култивар ‘Colt’ маса индукованог калуса на MS2 и MS4 подлогама је у средњим вредностима највећа, али разлика се не бележи као статистички значајна у односу на SH подлогу. Појава која је за овај култивар на свим SH подлогама карактеристичана је доста интензивна промена боје калуса. На SH1 и SH4 подлогама интензитет код неких иде и до степена 3. Код SH2 подлоге обојење је слабијег интензитета, али је приметно уз повећање масе калуса. С друге стране, пораст калуса указује да хормони у подлози одговарају деоби и умножавању ћелија калуса. Промена боје калуса на подлогама MS је слабијег интензитета и не појављује се нијанса црвене боје. Упоредно посматрана оба параметра издвајају подлогу MS2 као најпогоднију за овај култивар.

Као и у проценту индуковања пупољака, магрива је дала најслабији одговор и у расту калуса на испитиваним подлогама. Према средњим вредностима масе калуса, оне скоро да не прелазе најниже вредности масе индукованог калуса код обичне трешње (највећа маса код магриве је на медијуму WP4 од 0,231 g, што је приближно вредности 0,210 g, као најниже забележене масе калуса трешње на истом медијуму. Поред тога, подлоге SH ни у једној комбинацији коришћених хормона се нису показале одговарајућим за ову врсту. Потамњивање калуса је интензивно и у периоду краћем од назначеног долази до степена 3 или 4, односно до пропадања калуса. Слаб пораст калуса и на MS подлогама праћен је променама боје до другог степена.

Разграничење између неодговарајућих и одговарајућих хранљивих подлога за калус *Prunus serrulata*, после 35 дана је јасно, колико по маси калуса толико и по интензитету и промени боје индукованог калуса. Према средњим вредностима маса, на сва три медијума би се могле издвојити хранљиве подлоге на којима је бележена одговарајућа индукција калуса: MS2, MS4, WP1, WP4 и SH2, али промене боје калуса са интензитетом од 2 до 4 указују да су за ову врсту погодна само три првопоменута медијума, док се SH показао неодговарајућом подлогом за ову врсту.

Интензитет боје калуса и код *Prunus serotina* имао је значајну улогу у издвајању погодних подлога за раст индукованог калуса. Од подлога са 2,4-D ауксином, које су бележене као погодне за индукцију, WP1 и SH1 су добре и за

раст калуса, док се код MS1, без обзира на проценат пупољака код којих је забележена индукција калуса, маса калуса по статистичкој значајности се издваја као најлошија за ову врсту. Уједно интензитет обојења калуса је степена 2, што такође указује на подлогу која не одговара расту калуса и коришћењу за даља истраживања. С друге стране MS4 је једина подлога где комбинације NAA и IBA не изазивају потамњивање као негативну промену на калусу и у дужем временском периоду.

Ако се на исти начин како су анализирани проценти индукције калуса за све подлоге и племке на свим хранљивим медијумима, упореде вредности за масу индукованог калуса, резултати указују на статистички значајно смањење дисперзије мерених вредности и могућност анализе варијансе помоћу LSD теста на нивоу значајности од 0,05. Резултати су заједно са првопоменути приказани на графикону 4, означени као маса калуса индукованог за 35 дана.

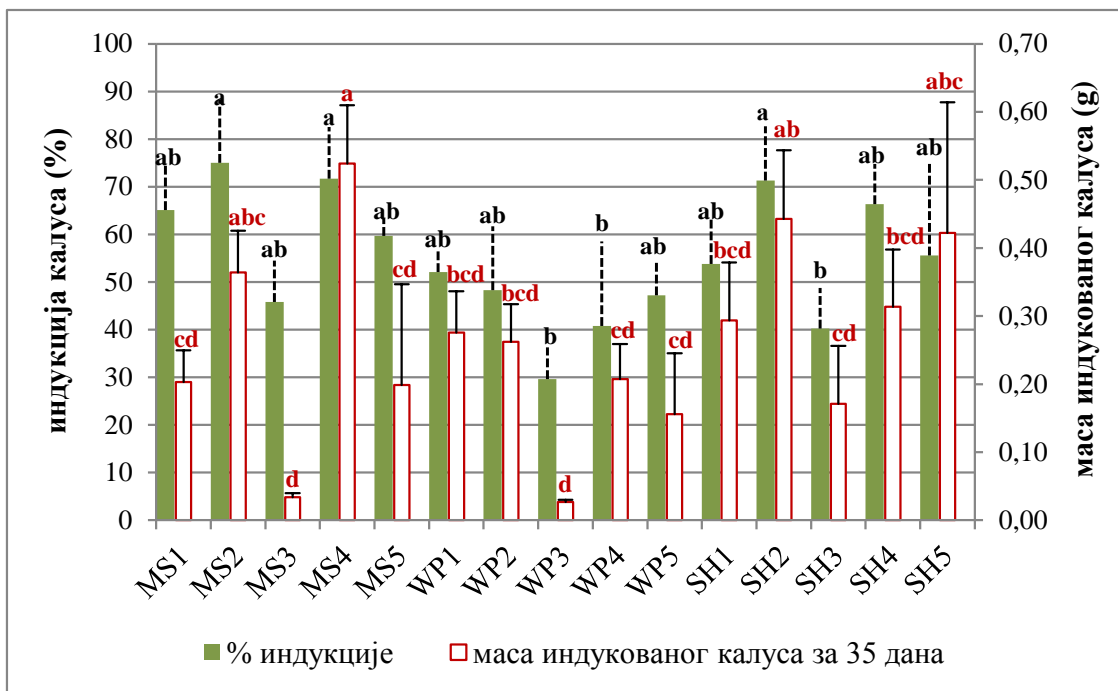
Хранљива подлога која се уз добијене средње вредности масе калуса издвојила као најпогоднија је MS4 подлога. По статистичкој значајности издвојила се као значајно најповољнија у односу на 11 преосталих хранљивих медијума, а у односу на три: SH2, SH5 и MS2 не бележи значајну разлику на статистичком нивоу. Три од четири поменуте хранљиве подлоге (MS4, MS2, SH2) садрже NAA као главни извор ауксина који се и показао да је од регулатора растења најпогоднији за већину изабраних врста. Хранљиву подлогу SH5 (са 2mg/L 2,4-D и 0,5 mg/L IBA) могуће је користити за поједине врсте или култиваре код којих се у појединачној анализи ова подлога издвојила као најпогоднија.

Хранљиве WP подлоге са различитим комбинацијама фитохормона показале су се неповољним за даља истраживања, као и подлоге код којих је једини извор ауксина био хормон IBA. У анализи укупних вредности поменутих параметара, код подлога са IBA, случајеви где су у проценту индукције калуса добијене задовољавајуће вредности (MS3, SH3) маса калуса је код свих испод 0,2 g што се може сматрати количином недовољном за коришћење у даљим истраживањима.

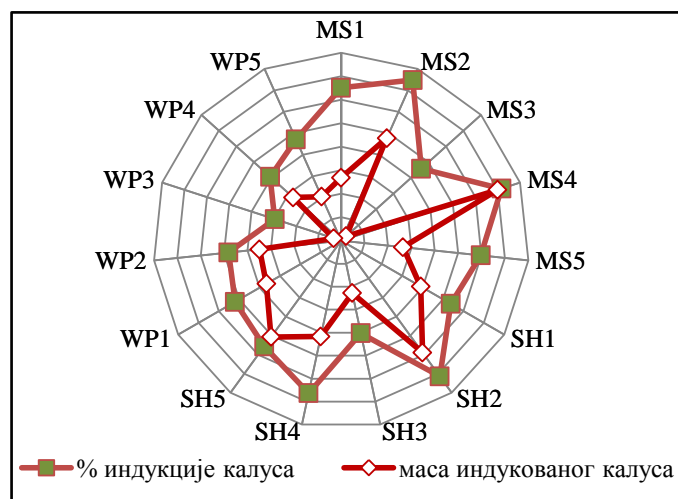
Према резултатима приказаним у графикону 5, кроз међуоднос вредности параметара индукције калуса и масе калуса на свим подлогама и за све

испитиване врсте потврђено је да се WP подлога у свим комбинацијама фитохормона није показала као подлога погодна за спајање калуса. Исти закључак се може извести и за подлоге MS3, SH3 и WP3.

Графикон 4. Процент индукованог калуса (примарна апсцисна оса) и маса калуса (секундарна апсцисна оса) код свих таксона. Вредности су приказане као средње вредности ± стандардна грешка. Вредности које се односе на исти параметар, а различите медијуме и означене су истим малим словом и истом бојом, нису статистички значајно различите, $p < 0,05$ (анализа, ANOVA, LSD тест).



Графикон 5. Међуоднос вредности параметара индукције калуса и масе калуса на свим подлогама



Анализом свих добијених резултата, за даља истраживања припремане су подлоге MS2, MS4 и SH2 и на њима су, зависно од комбинације врсте подлоге и

племке, вршена спајања калуса у условима *in vitro*.

Анализом корелација између индукције калуса и масе калуса код испитиваних врста и култивара, степен квантитативне повезаности ове две променљиве указује на јаку позитивну линеарну повезаност вредности добијених код врсте *Prunus serrulata* и три култивара: ‘Colt’, ‘Amanogawa’ и ‘Kanzan’. За преостале четири: *Prunus mahaleb*, *Prunus avium*, *Prunus serotina* и *Prunus serrulata* ‘Kiku-shidare-zakura’ ниво значајности коефицијента корелације прелази вредност од 0,05 што указује на непостојање статистички значајног односа повезаности између променљивих (табела 13). По вредности Пирсоновог коефицијента за корелацију масе и процента индукције код врсте *Prunus mahaleb*, повезаност би се могла сврстати у средње јаку, али ниво значајности од 0,056 занемарује овај степен корелације.

Табела 13. Резултати корелације параметара % индукције калуса и масе калуса за све врсте и култиваре. Ознаке: 1. *Prunus avium* 2. *Prunus* ‘Colt’ 3. *Prunus mahaleb* 4. *Prunus serrulata* 5. *Prunus serotina* 7. *P. serrulata* ‘Amanogawa’ 8. *P. serrulata* ‘Kanzan’ 9. *P. serrulata* ‘Kiku-shidare-zakura’

% индукције калуса /маса калуса	1	2	3	4	5	7	8	9
r	0,06	0,95	0,65	0,75	-0,01	0,78	0,79	0,02
0,05	0,877	0	0,056	0,019	0,971	0,006	0	0,926

Добијени односи корелација код врста и култивара код којих не постоје ни позитивне ни негативне повезаности у мерама параметара, указивале су на могућност коришћења већег броја хранљивих подлога на којима калус даје повољне резултате и за индукцију и за одговарајуће повећање масе калуса.

4.2.4. Индукција калуса из вегетативних делова са адултних матичних биљака

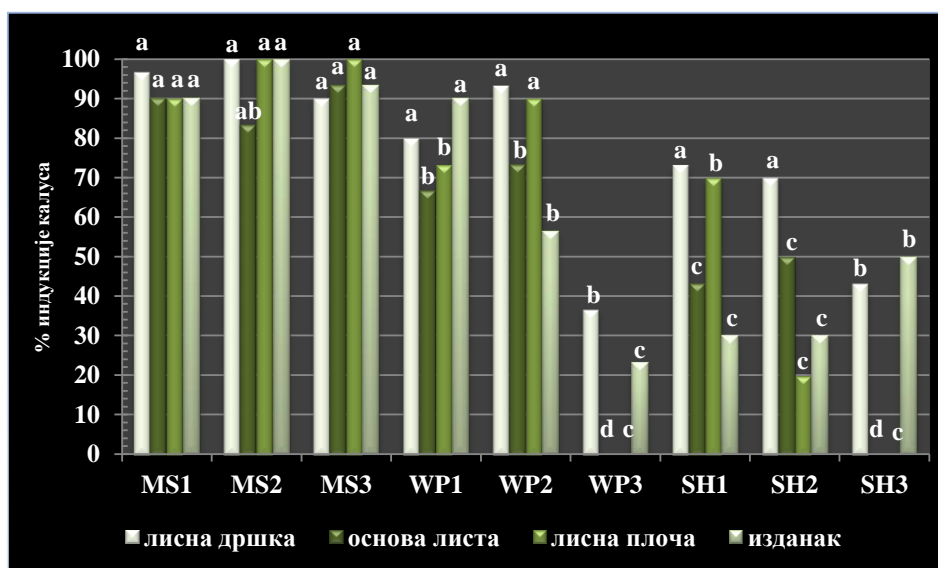
Резултати испитивања могућности успешног индуковања калуса у *in vitro* условима коришћењем делова летораста матичних биљака из, *in vivo*, нестерилних услова (које расту на отвореном пољу) указали су да је за култиваре и врсте: *P. serrulata* ‘Amanogawa’, *Prunus serrulata* ‘Kanzan’ и *Prunus serrulata* ‘Kiku-shidare-zakura’, *Prunus avium* и *Prunus* ‘Colt’ могуће користити адултно ткиво вегетативних делова пролећних, неодревљених летораста као извор експланата за

културу. Вредности параметара којима је изражавана погодност коришћења одређеног типа експланта и врсте медијума за све култиваре и врсте појединачно је дат у графичком приказу. Приказани су резултати процента индукованог калуса, дана почетка индукције калуса и степен покривености експланта калусом (СПК) мерен после 30 дана.

Prunus serrulata ‘Amanogawa’

Сва четири типа експланта су на подлогама MS у врло високом проценту индуковале калус (од 83,3 % до 100 %). Статистички значајна разлика у избору експланта појављује се на подлози MS2 (експлант – основа листа). Без обзира на појаву разлике, избор било ког од ауксина: 2,4-D, NAA или IBA (2mg/L) са ВАР од 0,5mg/L на подлози MS није имао значанију улогу у повећању или смањењу појаве калуса (графикон 6).

Графикон 6. Индукције калуса свих типова експланата на изабраним хранљивим подлогама (ANOVA, $p < 0,05$, LSD тест)

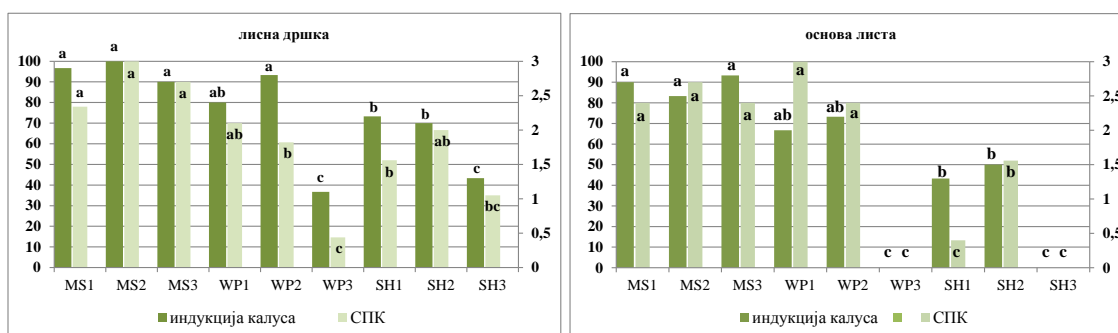


При коришћењу WP подлога, избор ауксина има улогу у индукцији калуса. Значајно бољи резултати су добијени коришћењем 2,4-D и NAA: лисна дршка, лисна плоча и део избојка са пупољком иницирају појаву калуса од 73,3 % до 90 % на хранљивој подлози са 2,4-D (WP1), а лисна дршка и лисна плоча око 90 % на подлози са NAA (WP2). Процент индукције који је на ове две подлоге статистички слабији, ипак прелази 50 % (73,3; 66,7 и 56,6 %). На подлогама са IBA, индукције није било из основе листа и лисне плоче а код дршке и дела изданка са пупољком се кретала од 23,3 до 36,7 %. Медијум SH за вегетативне

делове култивара ‘Amanogawa’ делимично је погодан само са одређеном комбинацијом ауксина и са одређеном врстом експланта. На подлогама SH1 и SH2 са 2,4-D и NAA индукује се калус на око 70 % експланата лисне дршке и лисна плоче у истом проценту али само на подлози SH1. Остали типови експланата на SH медијуму индукују калус у проценту који је мањи од 50 %. Експлант од основе листа и делова лисне плоче нису показали позитивну реакцију на ИВА у SH подлози (вредност индукције на SH3 је 0 %). Резултати процента индукције и степена покривености експланта калусом анализирани у односу тип експланта - на лисну плочу и лисну дршку приказани су на графикама 7 и 8.

Графикон 7. Процент индукције калуса (примарна апсцисна оса) и степен покривености калусом лисне дршке (секундарна апсцисна оса), (ANOVA, $p < 0,05$, LSD тест)

Графикон 8. Процент индукције калуса (примарна апсцисна оса) и степен покривености калусом основе листа (секундарна апсцисна оса), (ANOVA, $p < 0,05$, LSD тест)



Вредности ова два параметра за лисну дршку на подлогама MS1, MS2, MS3 и WP1 су највеће и не показују значајне разлике међусобом (графикон 7). За покривеност калусом оценом од 2 па навише (значи покривеност преко 66 % површине експланта и без значајне статистичке разлике) оцењена је и покривеност дршке на SH2 подлози. За проценат индукције, вредностима на поменутих подлогама придружене су и вредности добијене на WP2, SH1 и SH2. Хранљиве подлоге са ИВА за овај тип експланта побуђују статистички значајно мањи број експланата и мању количину калуса (WP3 и SH3).

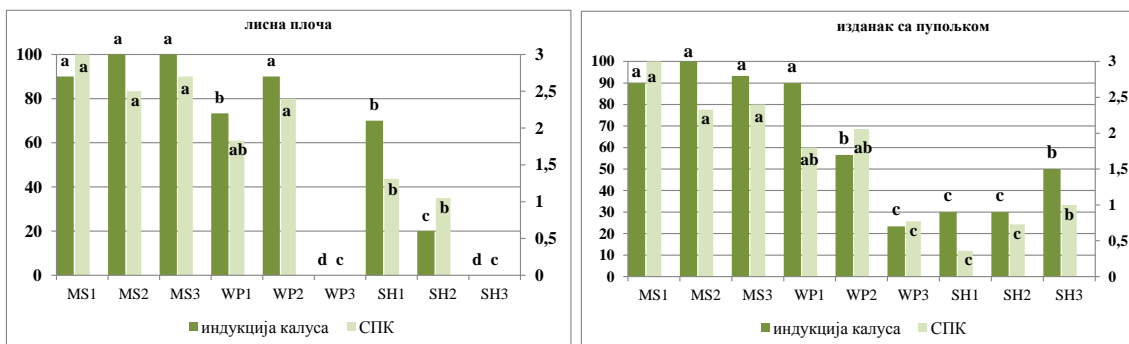
За експлант основа листа (графикон 8) реакција на различите подлоге слична је реакцији лисне дршке. У степену калусирања нешто је интензивнији процес на подлогама WP1 и WP2, чак се на WP1 иако има нешто мањег процента калусираних експланата, степен покривености вреднује максималном оценом 3. Ипак, с друге стране, подлоге SH1 и SH2 мање су одговарајуће: на SH1 подлози

индукција се јавља на око 50 % експланата, али је степен покривености веома низак, око 0,4; да NAA у подлози SH више погодује основи листа за индукцију калуса, од 2,4-D, указује оцена степена калуса од 1,6 забележена на SH2. На подлогама WP3 и SH3 није забележена индукција у току 30 дана праћења.

Делови лисне плоче имали су сличну реакцију као и остали делови листа на подлогама MS (графикон 9). Експланти у великом проценту калусирају (90 % и више) и дају доста калуса (оцена од 2,5 до 3). Реакција на WP2 се показала статистички посматрано бољом од реакције на WP1, а на SH1 бољом од SH2. Као и код делова лисне основе на медијумима WP3 и SH3 реакција индукције на лисној основи изостаје.

Графикон 9. Процент индукције калуса (примарна апсцисна оса) и степен покривености калусом лисне плоче (секундарна апсцисна оса), (ANOVA, $p < 0,05$, LSD тест)

Графикон 10. Процент индукције калуса (примарна апсцисна оса) и степен покривености изданка калусом (секундарна апсцисна оса), (ANOVA, $p < 0,05$, LSD тест)



Сличан тренд као и код осталих експланата јавља се и на делу изданка са пупољком. Разлика се бележи као значајно боља само на подлогама WP3 и SH3 (графикон 10). Заједно анализирана средња вредност параметра индукције калуса (од 55,54 до 75,92 %) израженог преко типа експланта, код овог култивара не издваја ни један по статистичкој значајности као погоднији (табела 14).

Табела 14. Анализа средњих вредности параметара индукције калуса према типу експланта и средњег времена индукције калуса, израженог у данима (ANOVA, $p < 0,05$, LSD тест)

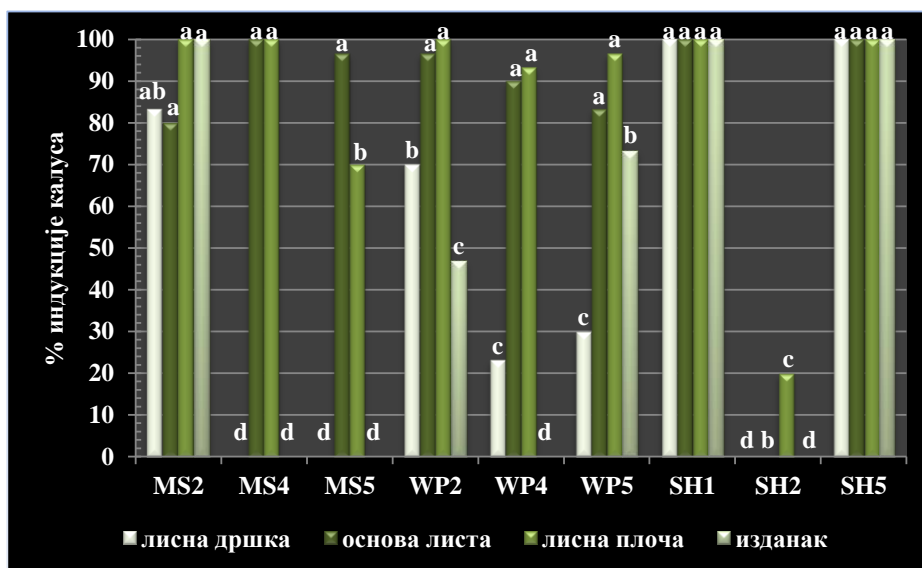
<i>Prunus serrulata</i> 'Amanogawa'				
тип експланта	% индукције калуса	први дан индукције	последњи дан индукције	средња вредност
лисна дршка	75,92 ^a ± 7,612	5	10	7 ^{ab}
основа листа	55,54 ^a ± 11,881	4	30	11,9 ^a
лисна плоча	60,37 ^a ± 13,982	7	30	13,7 ^a
изданак са пупољком	62,58 ^a ± 10,346	3	19	6,4 ^b

Прва појава калуса је забележена врло рано, трећег дана на експланту изданка са пупољком, до 7. дана на лисној плочи. Код дела изданка и лисне дршке, на свим експлантима појава калуса завршена је до 20. дана и за ова два типа експланта се може рећи да је динамика раста најинтензивнија и најједначенија (табела).

Prunus serrulata ‘Kanzan’

Хранљиве подлоге на којима је забележена индукција на свим типовима експланата у највећем проценту су SH1 и SH5 (100 % индукованог калуса) што указује да је ауксин 2,4-D у концентарцији 2 mg/L са или без 0,5 mg/L ИВА и 0,5 mg/L ВАР одговарајући однос фитохормона за пролиферацију калуса (графикон 11).

Графикон 11. Процент индукције калуса свих експланата на изабраним хранљивим подлогама за експланте култивара ‘Kanzan’, (ANOVA, $p < 0,05$, LSD тест)



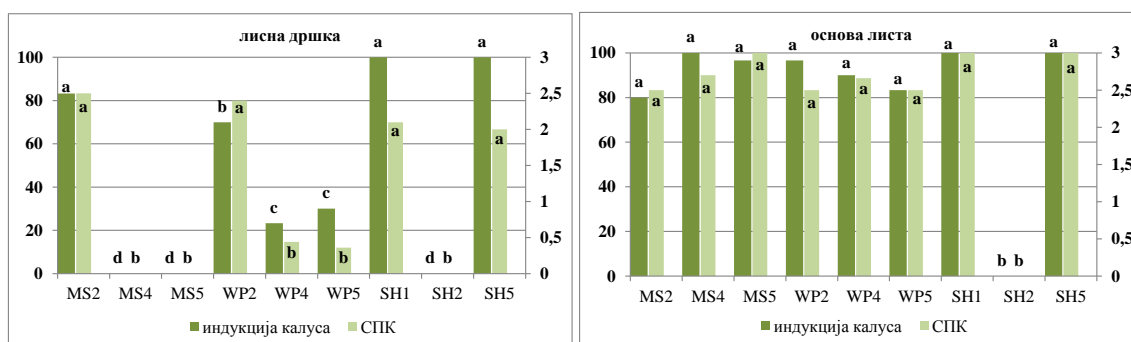
Поменут однос сва три фитохормона показао се одговарајућим и на подлогама MS5, на којој се на 96,6 % експланата од основе листа индукује калус, као и на WP5 где је проценат 83,3 и 96,7 на основи листа и лисној плочи. За део изданка као експланта успешност индукције на WP5 значајно опада на 73,3 %, а за лисну дршку на 30 %. Подлога MS5 не иницира индукцију калуса за ова два типа експланта. Замена 2,4-D ауксина у NAA за одређене типове експланата култивара ‘Kanzan’ не утиче на висок проценат индукције. На MS2, индукција је без статистички значајне разлике за све експланте преко 80 % а на MS4, WP2 и WP4 је за лисну основу и лисну плочу преко 95 %. Ипак, NAA у SH подлози доводи до

драстичног опадања индукције испод 20 % код свих типова експланата.

Степен покривености калусом указује да су се одређени типови експланта у мањој или већој мери погоднији за добијање калуса. Према резултатима приказаним на графиконима 13 и 14, оба типа експланта који су садржали део лисне ламине (основа листа или сама лисна плоча) дали су висок проценат индукције и висок степен покривености калусом за скоро све подлоге.

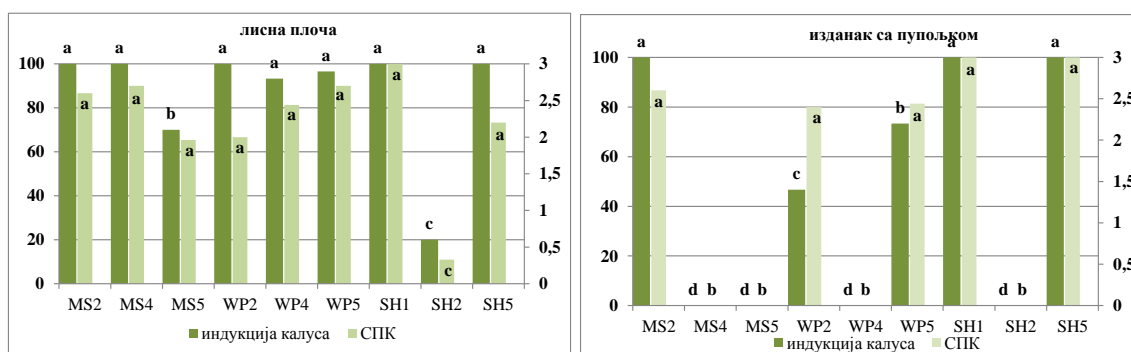
Графикон 12. Процент индукције калуса (примарна апсцисна оса) и степен покривености калусом лисне дршке (секундарна апсцисна оса), (ANOVA, $p < 0,05$, LSD тест)

Графикон 13. Процент индукције калуса (примарна апсцисна оса) основе листа и степен покривености калусом (секундарна апсцисна оса), (ANOVA, $p < 0,05$, LSD тест)



Графикон 14. Процент индукције калуса (примарна апсцисна оса) и степен покривености калусом лисне плоче (секундарна апсцисна оса), (ANOVA, $p < 0,05$, LSD тест)

Графикон 15. Процент индукције калуса (примарна апсцисна оса) на делу изданка и степен покривености калусом (секундарна апсцисна оса), (ANOVA, $p < 0,05$, LSD тест)



За лисну основу (графикон 13), на подлогама на којима је проценат индукције преко 80 % нема појаве значајних статистичких разлика у добијеним вредностима. Експланте на овим подлогама у року од 30 дана покривени су калусом на 66 % до 100 % површине (оцена покривености се креће од 2,5 до максималне 3). Једина забележена значајна разлика је у односу на вредности добијене на подлози SH2–индукција калуса, самим тим и покривеност су једнаки 0.

Процент индукције калуса лисне плоче је 100 % за 5 подлога (MS2, MS4, WP2, SH1 и SH5), а статистички значајна разлика се не јавља ни у односу на резултате добијене на WP4 и WP5. Значајност разлика се јавља у односу на MS5 (70 % индукованих експаната) и SH2 са 20 % калусираних експаната (графикон 14). Вредности оцена степена покривености од 2 до 3 распоређене су без значајних разлика. И за овај параметар статистичка разлика се јавља само у односу на вредности добијене на подлози SH2.

Процент индукције лисне дршке је преко 70 % на 4 подлоге: MS2, WP2, SH1 и SH5, с тим да се значајна разлика издваја код вредности на подлози WP2 у односу на остале. Ипак степен покривености калусом који се јавља на лисним дршкама (око 2,5) указује да се и овај избор хранљиве подлоге може сматрати повољним (графикон 12). Неадекватне за овај тип експаната су подлоге WP5 и WP4 са малим степеном покривености експланата и slabим процентом индукције око 30 % и MS2, MS5 и SH2 без појаве индукције калуса. Реакција избојка као експланата на изабране подлоге приближно се поклапа са реакцијама лисне дршке. Разлике су на WP5 подлози, која се показала погодном за овај тип експланата (индукција калуса је преко 70 %) и на WP4 подлози на којој није било позитивне реакције у индукцији калуса тако да се за изданак укупно 4 подлоге не могу сматрати адекватним: MS4, MS5, WP4 и SH2 (графикон 15).

Упоређењем вредности % индукције калуса збирно за све експланте (табела 15) издвајају се по статистичкој значајности оне добијене за основу листа и лисну плочу (82,94 и 86,66 %) у односу на лисну дршку и изданак (45,18 и 46,67 %).

Табела 15. Анализа средњих вредности параметара индукције калуса према типу експланата и средњег времена индукције калуса, израженог у данима за култивар *Prunus serrulata* 'Kanzan'

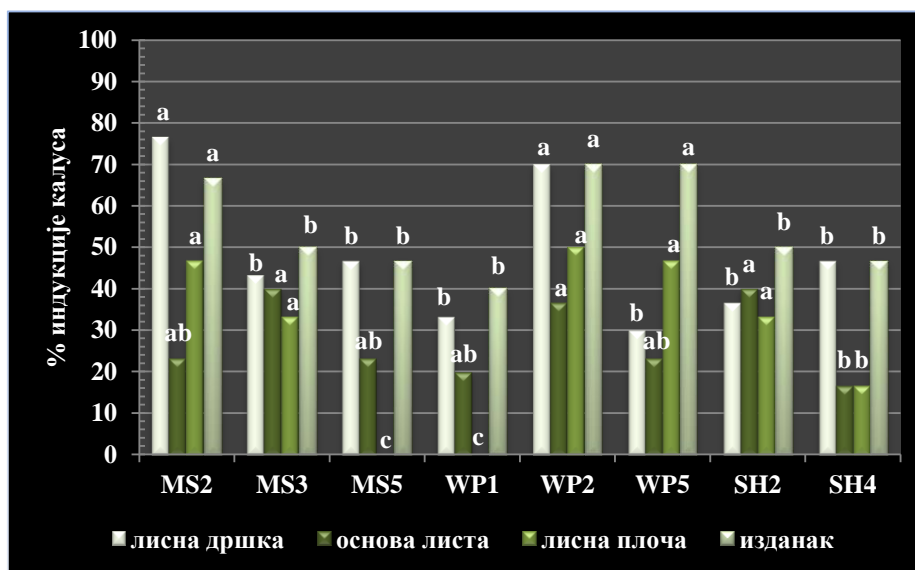
<i>Prunus serrulata</i> 'Kanzan'				
тип експланата	% индукције калуса	први дан индукције	последњи дан индукције	средња вредност
лисна дршка	45,18 ^b ± 14,391	7	30	15,22 ^a
основа листа	82,94 ^a ± 10,661	6	30	9,12 ^{ab}
лисна плоча	86,66 ^a ± 8,939	7	15	9 ^b
изданак са пупољком	46,67 ^b ± 15,791	5	30	17,2 ^a

Додавањем анализе извршене и за параметар средњег времена дана колико је трајала индукција и првог дана појављивања калуса, лисна плоча и основа листа се, такође издвајају као најпогоднији тип експланата.

Prunus serrulata ‘Kiku-shidare-zakura’

За овај култивар добијени су најслабији резултати индукције калуса са вегетативних делова летораста. Само на три подлоге и два типа експланата, на дршци листа и делу избојка, индукција се креће око 70 %. Проенти индукције су варирали за различите типове експланата на истим хранљивим подлогама. Само код две подлоге, MS3 и SH2 сви типови експланата индуковали су калус у процентима који се статистички не разликују (од 33,3 % до 50 %). На свим осталим подлогама, делови лисне дршке и избојка са пупољком дали су бољи проценат индукције од делова ламине листа. На MS2, MS5, WP1, WP2 и SH4 ове разлике су на нивоу статистичке значајности. Код подлога WP5, лисна дршка је индуковала калус у мањем проценту. Према добијеним резултатима, експлантима од вегетативних делова култивара ‘Kiku-shidare-zakura’ одговарају подлоге са NAA, мада је ово једини култивар код којег се IBA у количини од 2 mg/L показао погодним за индукцију калуса (медијум MS3). Ауксин 2,4-D у MS медијуму није имао утицај на индуковање калуса из лисне плоче. На WP1 забележена је иста појава, мада се са додатком 0,5 mg/L IBA уз 2,4-D од 2 mg/L (хранљива подлога WP5) калус индукује на око 50 % експланата овог типа (графикон 16).

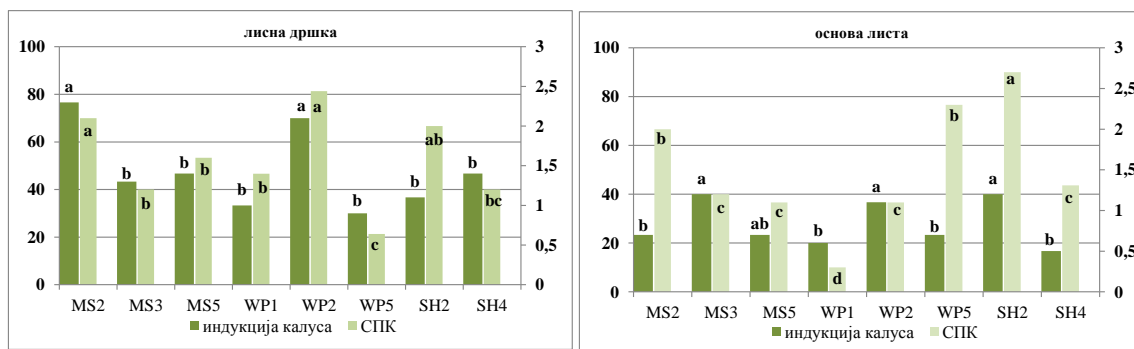
Графикон 16. Процент индукције калуса свих експланата на изабраним хранљивим подлогама за експланте култивара ‘Kiku-shidare-zakura’, (ANOVA, $p < 0,05$, LSD тест)



Приказ упоредних резултата добијених кроз степен покривености калусом индукованих експланата указује да је степен калусирања одређених типова експланата висок, иако је проценат индукције код овог култивара нижи. Код лисне дршке он прелази вредности од 2,5 на WP2 и статистички се не разликује од вредности добијених за покривност на MS2 и SH2. Разлике се јављају у односу на остале подлоге. Најмањи степен раста калуса изражен је оценом 0,6 на WP5 (графикон 17).

Графикон 17. Процент индукције калуса (примарна апсцисна оса) и степен покривености калусом лисне дршке (секундарна апсцисна оса), (ANOVA, $p < 0,05$, LSD тест)

Графикон 18. Процент индукције калуса (примарна апсцисна оса) основе листа и степен покривености калусом (секундарна апсцисна оса), (ANOVA, $p < 0,05$, LSD тест)



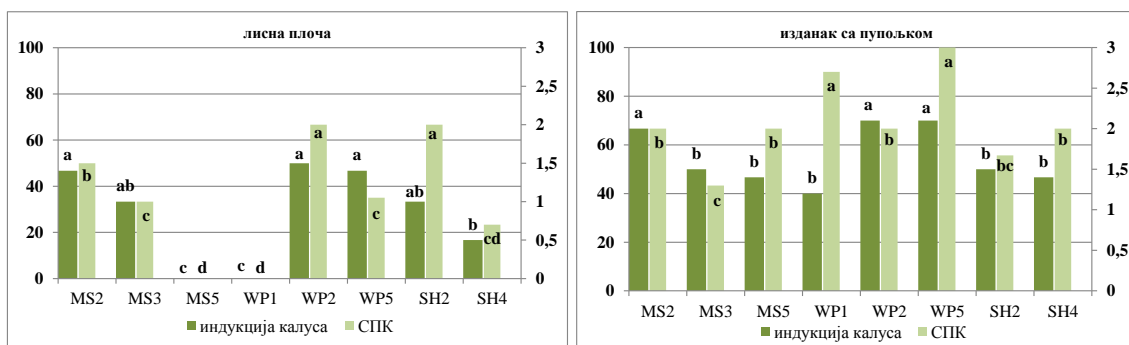
Основа листа, која је као тип експланта имала најниже резултате у проценту индукције, на подлози SH2 за 40 % индукованих основа покривеност калусом је оцењена са 2,7 и вредност се по статистичкој значајности издваја од осталих (графикон 18). Следе оцене на WP5 и MS2 (око 20 % индукованих, оцењене су оценом 2,3 и 2). Следе остале подлоге од којих се издваја као неодговарајућа подлога WP1. Лисна плоча као експлант нема индукованих више од 50 % експланата ни на једној подлози, а на WP1 и MS5 није забележена индукција. Оцена покривености калусом је 2 за WP2 и SH2 и статистички се разликује од осталих. Раст калуса на MS2 је у посебној групи, а следе оцене за MS3, WP5 и SH4 (графикон 19).

На деловима избојка за које резултати показују интензивнију индукцију калуса, степен покривености на 6 подлога прелази 66 % (оцена преко 2), а на преостале две се креће око 50 % (оцене 1,3 и 1,67). На подлогама WP1 и WP5, статистички значајно су издвојене вредности за покривност калусом као највише. Од осталих вредности забележених на подлогама MS2, MS5, WP2, SH2 и SH4

статистички се разликује само вредност добијена за степен покривености експланата на подлози MS3 (графикон 20).

Графикон 19. Процент индукције калуса лисне плоче (примарна апсцисна оса) и степен покривености калусом (секундарна апсцисна оса), (ANOVA, $p < 0,05$, LSD тест)

Графикон 20. Процент индукције калуса на делу изданка (примарна апсцисна оса) и степен покривености калусом (секундарна апсцисна оса), (ANOVA, $p < 0,05$, LSD тест)



Збирно анализирано, делови ламине листа мање су погодни за индуковање калуса и статистички без разлика у вредностима за оцену овог параметра на изабраним подлогама, од делова дршке и избојка. За погоднији експлант могу се бирати дршка листа или део избојка младог летораста.

Почетак индукције и код овог култивара почео је веома рано (од 5. до 7. дана). За све експланте осим лисне плоче индукција је завршена са 12. даном па се не јављају значајне статистичке разлике у средњем дану првог бележења појаве калуса код експланата лисне дршке, основе и избојка (табела 16). За лисну плочу се може рећи да је и према брзини и интензитету формирања калуса најнепогоднији тип експланта.

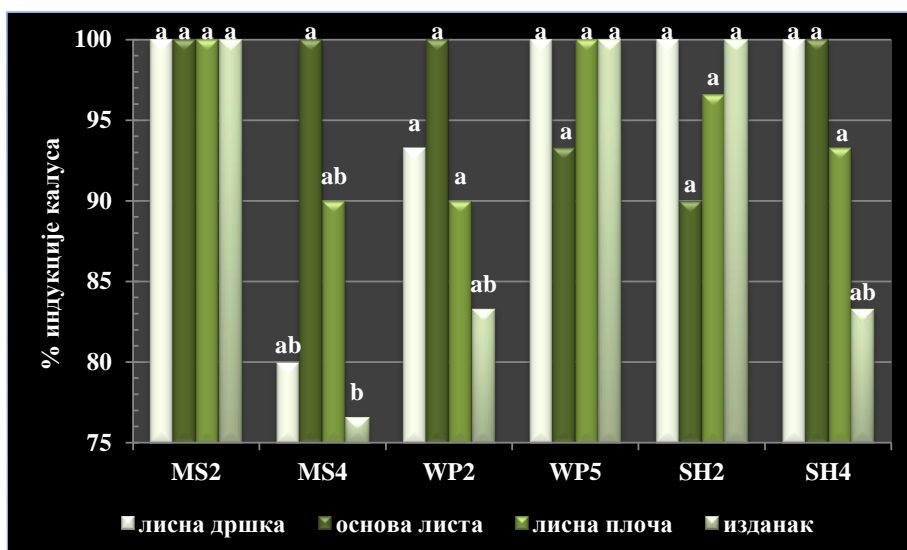
Табела 16. Анализа средњих вредности параметара индукције калуса према типу експланта и средњег времена индукције калуса, израженог у данима за култивар ‘Kiku-shidare-zakura’

<i>Prunus serrulata</i> ‘Kiku-shidare-zakura’				
тип експланта	% индукције калуса	први дан индукције	последњи дан индукције	средња вредност
лисна дршка	47,91 ^a ± 5,968	6	10	8,29 ^b
основа листа	27,91 ^b ± 3,331	7	10	8,12 ^b
лисна плоча	28,34 ^b ± 7,236	6	30	13,67 ^a
изданак са пупољком	55,01 ^a ± 4,225	5	12	7,68 ^b

Prunus avium

Свих шест изабраних хранљивих подлога показале су се одговарјућим за индукцију калуса из вегетативних делова летораста обичне трешње. Средња вредност индукције код свих подлога и типова експаната прелази 75 % и статистички значајна разлика се јавља само на MS4 медијуму за изданак. За овај начин индуковања калуса, довољно је учешће само једног ауксина у концентрацији 2 mg/L (NAA на све три подлоге или 2,4-D на WP подлози). Додавање и ИВА од 0,5 mg/L утицао је на делимично смањење индукције (графикон 19).

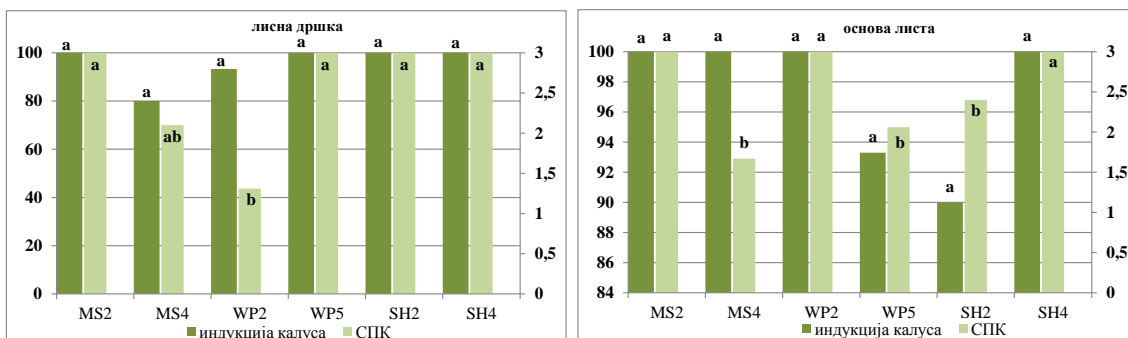
Графикон 21. Средње вредности процента индукције калуса свих експаната на изабраним хранљивим подлогама за обичну трешњу, (ANOVA, $p < 0,05$, LSD тест)



Појединачни резултати за сва четири типа експаната такође показују висок проценат индукције калуса (графикони 22, 23, 24 и 25).

Графикон 22. Процент индукције калуса лисне дршке (примарна апсцисна оса) и степен покривености калусом (секундарна апсцисна оса), (ANOVA, $p < 0,05$, LSD тест)

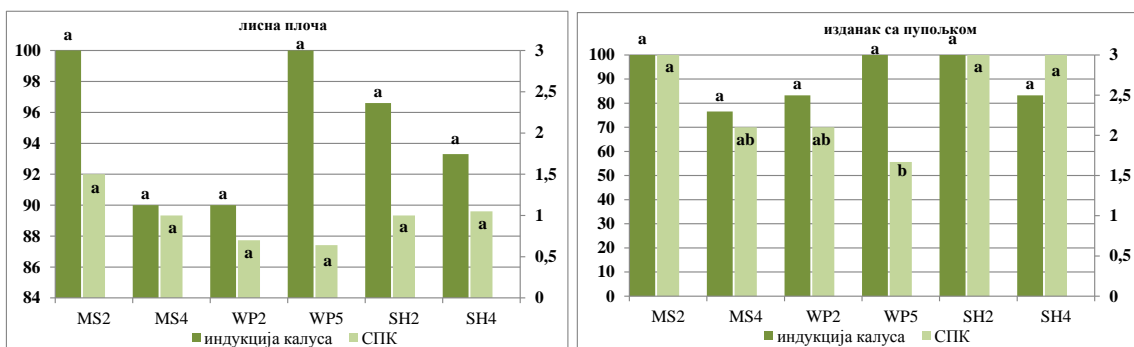
Графикон 23. Процент индукције калуса (примарна апсцисна оса) и степен покривености калусом основе листа (секундарна апсцисна оса), (ANOVA, $p < 0,05$, LSD тест)



Поједине разлике јављају се само у оцени степена покривености калусом који је нешто нижи за MS медијуме са два типа ауксина (MS4). На подлогама SH ова тенденција се не јавља, а за основу листа значајано је боља оцена на SH4 него на SH2. За лисну плочу иако је проценат индуковања висок, оцена степена покривености експланта калусом не прелази 1,5 (50 % покривености површине) на свим медијумима, а вредности су без статистичких разлика (графикон 24). Овај степен покривености експланта забележен је и на делу избојка на WP5 медијуму (графикон 25). Ова вредност се по значајности издваја као нижа у односу на степен калусирања дела избојка на MS2, SH2 и SH4 који су оцењени највишим степеном (оцена 3).

Графикон 24. Процент индукције калуса лисне плоче (примарна апсцисна оса) и степен покривености калусом (секундарна апсцисна оса), (ANOVA, $p < 0,05$, LSD тест)

Графикон 25. Процент индукције калуса изданка са пупољком (примарна апсцисна оса) и степен покривености калусом (секундарна апсцисна оса), (ANOVA, $p < 0,05$, LSD тест)



Резултати приказани у табели 17 указују да за коришћене узорке дивље трешње, избор типа експланта нема значај за успех индуковања калуса. Нешто спорије време почетка калусирања лисне плоче издваја се по значајности, али треба нагласити да се 9. дан као почетак процеса пролиферације калуса у *in vitro* култури калуса, може сврстати у доста брз и интензиван процес.

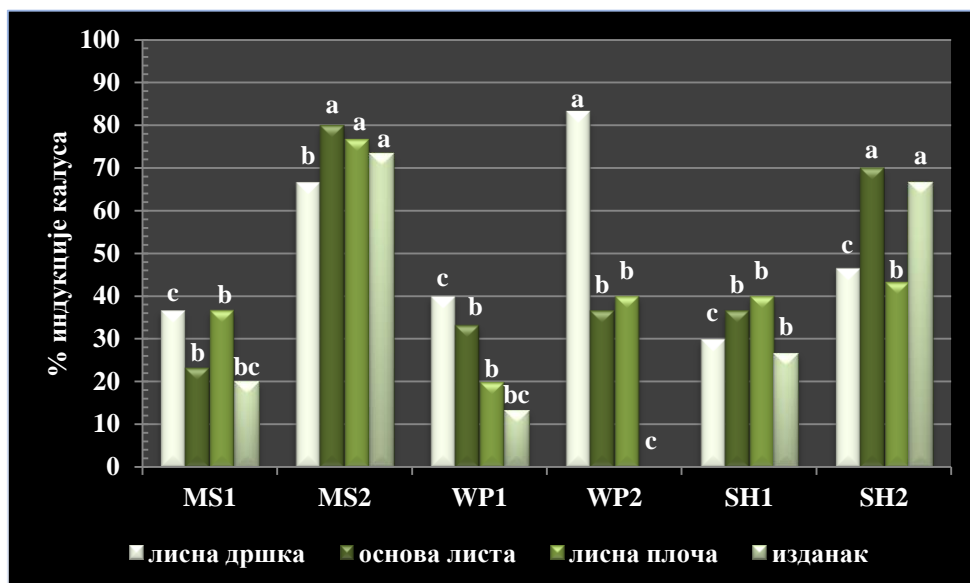
Табела 17. Анализа средњих вредности параметара индукције калуса према типу експланта и средњег времена индукције калуса, израженог у данима за обичну трешњу

<i>Prunus avium</i>				
тип експланта	% индукције калуса	први дан индукције	последњи дан индукције	средња вредност
лисна дршка	95,55 ^a ± 3,296	5	7	6 ^b
основа листа	97,22 ^a ± 1,811	5	7	6,3 ^b
лисна плоча	94,98 ^a ± 1,874	9	12	10,5 ^a
изданак са пупољком	90,53 ^a ± 4,349	5	7	6,16 ^b

Prunus 'Colt'

За разлику од обичне трешње, калус култивара 'Colt' се није индуковао интензивно на свим изабраним подлогама. Добра реакција (индукција преко 70 %) показала се само на медијумима MS2, делимично успешна – само одређени тип експланта – на SH2 и WP2 а присуство ауксина 2,4-D у подлогама није имао јачи ефекат на индукцију од 40 %. На то указују резултати за MS1, WP1 и SH1 приказани на графикону 26.

Графикон 26. Процент индукције калуса свих експланата на изабраним хранљивим подлогама за клон 'Colt'. (ANOVA, $p < 0,05$, LSD тест)



Према типу експланта, лисна дршка статистички значајно већу вредност индукције показала је на медијумима MS2 и WP2 у односу на остале. Ипак степен покривености калуса на WP2 који је оцењен са 1 (око 33,3 % покривености), благо фаворизује подлогу MS2 код које покривеност иде до 2,2 (односно око 73 %). За дршку листа су неодговарајуће хранљиве подлоге са 2,4-D на којима калус покрива само од 4 % до 26,5 % површине дршке (графикон 27).

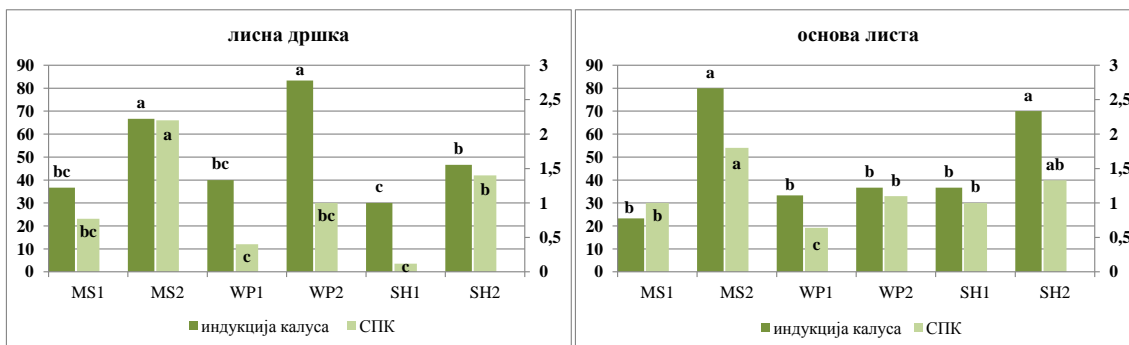
Сличан распоред вредности је и за основу листа. Разлика се јавља само код интензивнијег калусирања на подлози SH2 у односу на WP2 и у проценту индукције и у покривености експланта калусом (графикон 28).

Индукција на деловима лисне плоче (графикон 29) на свим подлогама је око 40 % осим на подлози MS2 где је око 75 %. На MS подлогама задовољавајући је и степен покривености експланта (оцењен на оба медијума MS са 2 и 2,2).

Делови избојка који на MS2 и SH2 подлози индукују 73,3 и 66,7 % експланата, без статистички значајне разлике у индукцији, а на овим подлогама је забележена и највећа покривеност калусом, значајније већа на MS2 него на SH2 (графикон 30).

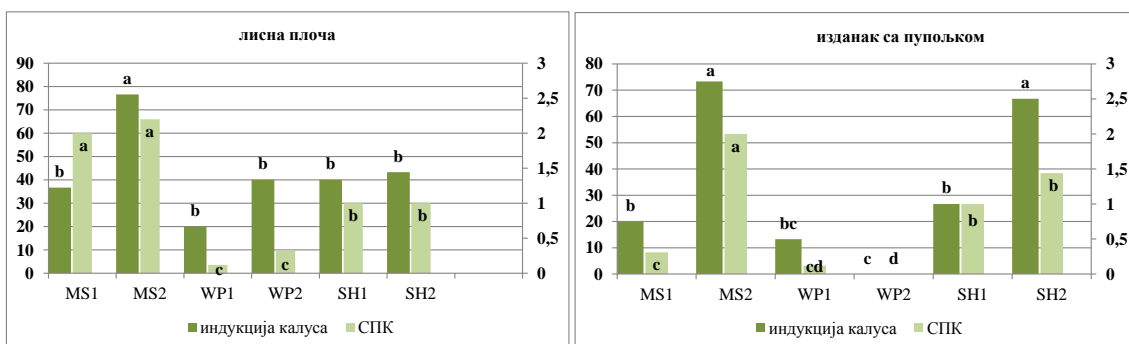
Графикон 27. Процент индукције калуса лисне дршке (примарна апсцисна оса) и степен покривености калусом (секундарна апсцисна оса), (ANOVA, $p < 0,05$, LSD тест)

Графикон. 28. Процент индукције калуса основе листа (примарна апсцисна оса) и степен покривености калусом (секундарна апсцисна оса), (ANOVA, $p < 0,05$, LSD тест)



Графикон 29. Процент индукције калуса лисне плоче (примарна апсцисна оса) и степен покривености калусом (секундарна апсцисна оса), (ANOVA, $p < 0,05$, LSD тест)

Графикон 30. Процент индукције калуса изданка (примарна апсцисна оса) и степен покривености калусом (секундарна апсцисна оса), (ANOVA, $p < 0,05$, LSD тест)



Уједначена реакција свих типова експланата на свим подлогама потврђена је и анализом резултата приказаних у табели.

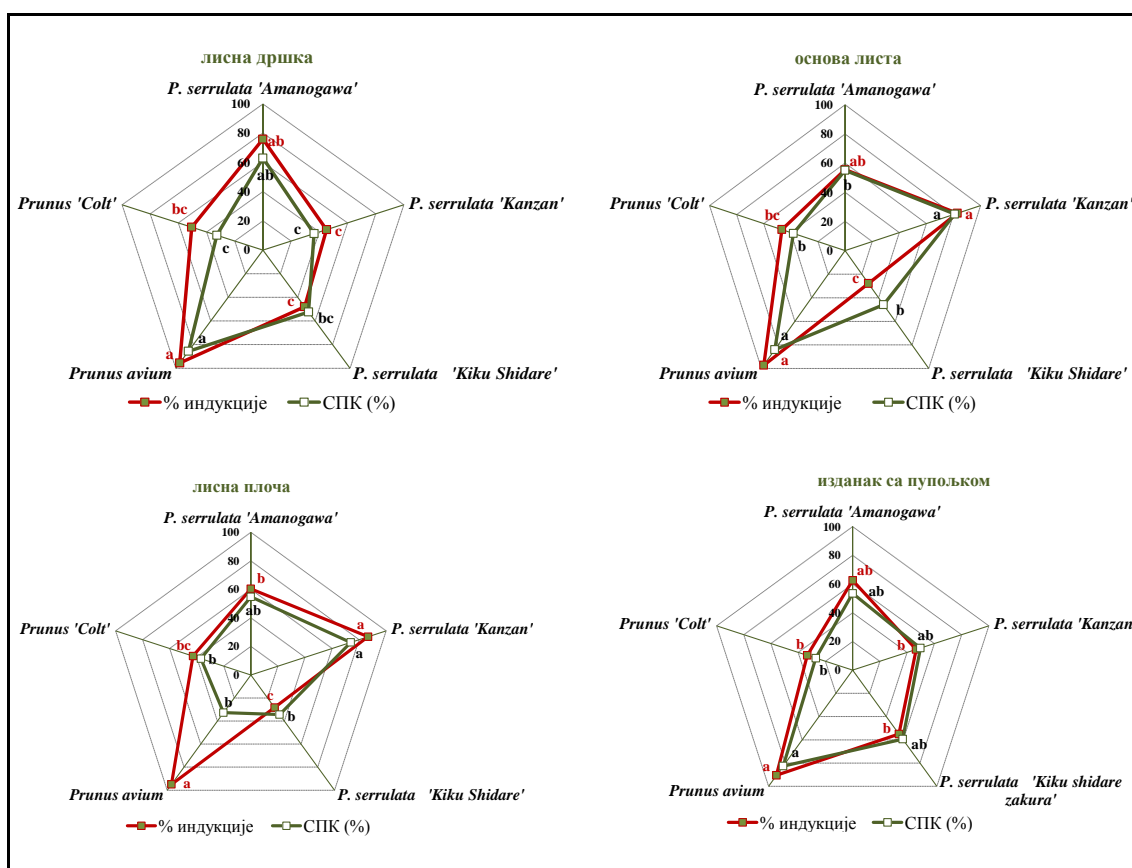
Табела 18. Анализа средњих вредности параметара индукције калуса према типу експланата и средњег времена индукције калуса, израженог у данима за култивар 'Colt'.

<i>Prunus</i> 'Colt'				
тип експланата	% индукције калуса	први дан индукције	последњи дан индукције	средња вредност
лисна дршка	50,55 ^a ± 8,315	6	21	10,83 ^a
основа листа	46,67 ^a ± 9,271	6	14	9,5 ^a
лисна плоча	42,67 ^a ± 7,561	9	14	10,5 ^a
изданак са пупољком	33,33 ^a ± 12,172	9	30	14,6 ^a

И код овог култивара трешње, појава првих знакова калуса на експлантима је забележена доста рано (од 6. до 9. дана). У средњим вредностима дана када је забележена индукција калуса на свим типовима експланата нема значајних разлика.

У односу на резултате процента индуковања калуса и степена покривености експланата калусом (који је изражен кроз процентуалну вредност), анализирана је подобност типа експланта за одређен култивар или врсту као и корелациона анализа између добијених вредности (графикон 31).

Графикон 31. Анализа варијансе и вишеструких опсега за процентуално изражене вредности индукције калуса и степена покривености калусом типа експланта за сваки култивар и врсту; (ANOVA, $p < 0,05$, LSD тест)



Резултати указују да се значајна статистичка разлика јавља за све типове експланата осим за проценат СПК избојка. Лисна дршка је веома погодан тип експланта за *Prunus avium* и *P. serrulata* 'Amanogawa' (95,55 и 75,92 % индукције и 85 и 63 % покривености калусом). Вредности добијене за оба параметра за дивљу трешњу статистички се значајно одвају од осталих вредности. У проценту

индукције калуса на лисној дршци култивара ‘Amanogawa’ вредност се показала такође статистички боља од осталих, али у степену покривености преклапа се са вредношћу добијеном за *P. serrulata*. За остале култиваре, проценат се креће око 50 % индукованих експланата и покривеношћу од 32,72 до 53,41 % без значајне разлике у вредностима за оба параметра.

Преко 80 % експланата основе листа *Prunus avium* и *P. serrulata* ‘Kanzan’ прекривено је калусом изнад 80 % површине. Код култивара *P. serrulata* ‘Amanogawa’ и *Prunus* ‘Colt’, статистички значајно се овај проценат спушта на око 50 % индукованих експланата са покривношћу калусом од 55,04 и 38,16 %. Основе листа *P. serrulata* ‘Kiku-shidare-zakura’, калусирају 30 % са покривношћу површине од 45,87 %.

Лисна плоча има сличан распоред вредности за оба мерена параметра као и основа листа, осим што је степен покривености калусом нижи код свих врста и култивара. Код *Prunus avium* ова вредност је приближно 3 пута нижа (32,72 % у односу на 84,05 %).

Изданак као тип експланта за дивљу трешњу индукује калус на 90,53 % и ова вредност се статистички значајно одваја у односу на све остале осим за вредност 62,57 % који је забележен за култивар *P. serrulata* ‘Amanogawa’. Вредност овог параметра се креће око 50 % за *Prunus serrulata* ‘Kanzan’ и ‘Kiku-shidare-zakura’ и за ‘Colt’ око 33,3 %. Сличан распоред је и за параметар СПК осим што се висок коефицијент варијације збирних података огледа у непостојању статистички значајних разлика између средњих вредности које су у интервалу од 27,05 и 82,61 %.

Корелационом анализом добијених вредности за параметре процента индукције калуса и процента СПК добија се висок корелациони коефицијент за сва поређења осим за квантитативну линеарну повезаност вредности дршке листа и лисне плоче култивара ‘Kiku-shidare-zakura’ и основе листа и дршке листа култивара ‘Colt’ (p вредност прелази ниво значајности од 0,05 што указује на непостојање статистички значајног односа повезаности између променљивих).

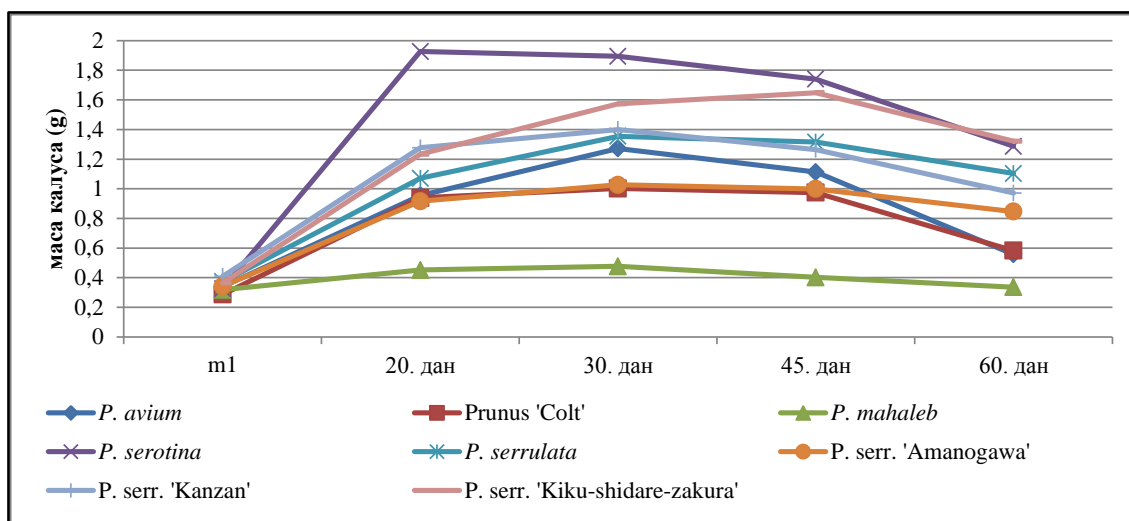
4.2.5. Анализа масе калуса из супкултуре индукованог калуса

4.2.5.1. Динамика раста калуса у супкултури

Преко резултата мерења масе калуса првог дана (m_1), 20., 45. и 60. дана добијен је дијаграм динамике раста калуса на основу кога су одређени временски размаци у којима је вршена супкултура калуса за сваку врсту односно култивар (графикон 32).

Најинтензивније расте у првих 20 дана калус врсте *Prunus serotina*, чија се маса повећа за око 6 пута (слика 14). Ово је уједно и једина врста код које маса калуса од 20. дана опада. На крају два месеца, калус је сув, мења боју у тамније жуто. Супкултура за калус ове врсте је рађена после 20. дана. Насупрот овако интензивном расту је раст калуса магриве: маса се за месец дана повећава у односу на почетну за само 1,4 пута и калус интензивно тамни у истом периоду.

Графикон 32. Динамика раста калуса свих култивара и врста мерена првог дана (m_1), 20, 30, 45. и 60. дана.



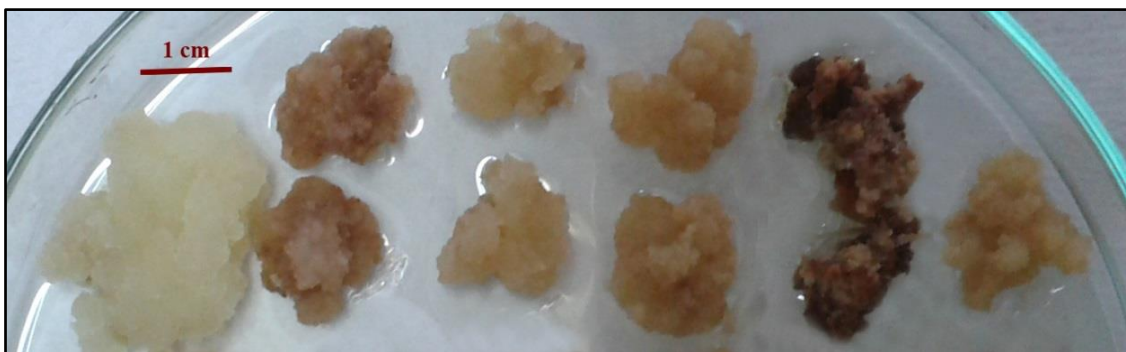
Код осталих врста и култивара, пораст у периоду од 20. дана се креће између 2,7 и 3,4 пута, са даљим растом до 30. дана (пораст масе између 3 пута и 4,3 пута). Од 30. дана креће тенденција блажег опадања масе до 45. дана и нешто интензивнијег до 60. дана (израженије опадање масе до 60. дана је забележено код обичне трешње, култивара 'Colt' и делимично код 'Kiku-shidare-zakura'). Поред наглог опадања масе, калус обичне трешње и 'Colt' се интензивније суше а калус култивара 'Colt' мења боју ка тамно мркој на површинама које нису у додиру са

хранљивим медијумом (слика 14). То је један од основних разлога за честу супкултуру за овај култивар; супкултура код ‘Colt’ је рађена на сваких 20 дана.

Калус култивара ‘Kiku-shidare-zakura’, после 45 дана не губи на маси интензивно, колико мења интензивно боју и потамњива читавом површином. Код ове три врсте супкултура калуса је рађена у периоду између 20. и 30. дана.

За калус јапанске трешње и два култивара ‘Amanogawa’ и ‘Kanzan’ у периоду од 2 месеца бележене су сличне промене, како у интензитету раста тако и у промени структуре. После приближно троструког повећања масе у периоду првих 20. дана, маса наставља са благим растом и до 30. дана. У периоду другог месеца раста, маса калуса опада, али не интензивно ни до 60. дана. За све три је карактеристична врло слаба промена боје на калусу. Он остаје свеж и без промене до краја овог периода праћења (слика 14). Супкултуру је било могуће радити и одложено до 45. дана (више због смањења масе хранљиве подлоге него због значајних промена у структури калуса).

На слици су приказани калуси стари 30 дана од постављања на хранљиви медијум. Величина свих узорака на почетку је била око 0,5 cm у пречнику. Јасно се уочава да је у истим условима раста, интензивнији пораст масе калуса сремзе у односу на остале врсте, као и промена боје култивара ‘Colt’ и делимично код ‘Kiku-shidare-zakura’.



Слика 14. Раст калуса после 30 дана. С лева на десно: *Prunus serotina*, *P. serrulata* ‘Kiku-shidare-zakura’, ‘Kanzan’, ‘Amanogawa’, *Prunus* ‘Colt’, *Prunus serrulata*

4.2.5.2. Анализа релативног раста калуса (РПК) у супкултури

Обрачунавањем релативног раста калуса (РПК), преко почетне масе калуса (m_1) и масе после 20. дана (m_2), кроз однос $(\ln m_2 - \ln m_1) / m_1$, издвојене су вредности приказане у табели 19. Анализом и упоређивањем са претходно добијеним резултатима потврђен је избор једног, најпогоднијег хранљивог медијума за сваку врсту и култивар.

Табела 19. Анализа вишеструких опсега за вредности РПК са вредностима стандардне грешке. Вредности које су означене исим словом немају статистички значајну разлику на нивоу значајности од 0,05 (ANOVA, LSD тест)

1. <i>Prunus avium</i>		2. <i>Prunus</i> 'Colt'		3. <i>Prunus mahaleb</i>		4. <i>Prunus serrulata</i>		5. <i>Prunus serotina</i>	
MS2	2,16 ^a ± 0,187	MS1	0,79 ^c ± 0,275	MS2	0,41 ^a ± 0,039	MS1	1,03 ^{ef} ± 0,143	MS1	1,08 ^{cde} ± 0,073
MS4	2,38 ^a ± 0,234	MS2	1,98 ^{ab} ± 0,137	MS4	0,44 ^a ± 0,146	MS2	2,73 ^b ± 0,189	MS2	2,73 ^{ab} ± 0,190
WP2	1,43 ^{bc} ± 0,112	WP1	2,24 ^a ± 0,494	WP2	0,24 ^b ± 0,026	MS3	0,59 ^{fg} ± 0,071	MS3	0,60 ^{de} ± 0,092
WP5	1,53 ^b ± 0,072	WP2	1,35 ^{bc} ± 0,227	WP4	0,12 ^b ± 0,030	MS4	3,23 ^a ± 0,207	MS4	1,15 ^{cde} ± 0,136
SH2	0,29 ^d ± 0,150	SH1	2,30 ^a ± 0,100			MS5	1,53 ^{cd} ± 0,069	MS5	0,98 ^{cde} ± 0,135
SH4	1,05 ^c ± 0,087	SH2	2,43 ^a ± 0,304			WP1	1,93 ^c ± 0,122	WP1	1,63 ^c ± 0,296
7. <i>Prunus serrulata</i> 'Amanogawa'		8. <i>Prunus serrulata</i> 'Kanzan'		9. <i>P. serr.</i> 'Kiku shidare zakura'		WP2	0,41 ^g ± 0,039	WP2	0,72 ^{de} ± 0,256
MS1	1,27 ^b ± 0,539	MS2	2,23 ^a ± 0,244	MS2	2,46 ^a ± 0,146	WP3	-0,04 ^h ± 0,030	WP3	-0,24 ^f ± 0,075
MS2	1,95 ^a ± 0,299	MS4	2,24 ^a ± 0,494	MS3	2,30 ^a ± 0,232	WP4	0,97 ^{ef} ± 0,080	WP4	0,59 ^{de} ± 0,071
MS3	0,58 ^c ± 0,068	MS5	1,18 ^b ± 0,116	MS5	0,88 ^b ± 0,230	WP5	1,15 ^{de} ± 0,136	WP5	0,79 ^{de} ± 0,275
WP1	1,66 ^{ab} ± 0,093	WP2	0,97 ^b ± 0,135	WP1	0,60 ^b ± 0,092	SH1	1,14 ^{de} ± 0,232	SH1	2,44 ^b ± 0,421
WP2	1,53 ^{ab} ± 0,069	WP4	1,57 ^b ± 0,144	WP2	2,25 ^a ± 0,368	SH2	1,03 ^e ± 0,191	SH2	2,40 ^b ± 0,201
WP3	0,41 ^c ± 0,039	WP5	1,42 ^b ± 0,202	WP5	1,08 ^b ± 0,071	SH3	0,38 ^{gh} ± 0,049	SH3	0,46 ^e ± 0,117
SH1	1,72 ^{ab} ± 0,201	SH1	1,24 ^b ± 0,126	SH2	1,99 ^a ± 0,317	SH4	2,46 ^b ± 0,254	SH4	1,24 ^{cd} ± 0,547
SH2	1,44 ^{ab} ± 0,140	SH2	-0,29 ^c ± 0,090	SH4	1,81 ^a ± 0,210	SH5	1,93 ^c ± 0,240	SH5	3,23 ^a ± 0,207
SH3	1,94 ^a ± 0,082	SH5	1,38 ^b ± 0,134	Релативан раст калуса РПК = $(\ln m_2 - \ln m_1) / m_1$; m_1 = почетна маса калуса; m_2 = маса калуса 20. дана					

Најпогоднија хранљива подлога за највећи број врста и култивара је MS подлога у две комбинације односа регулатора растења: MS2 (2 mg/L NAA и 0,5 mg/L BAP) и MS4 (2 mg/L NAA, 0,5 mg/L IBA и 0,5 mg/L BAP). За *Prunus avium*, *Prunus mahaleb* и *Prunus serrulata* ‘Kanzan’ обе подлоге су се показале одговарајућим осим што код калуса магриве, изабрани медијуми нису дали очекиване резултате раста и довољног развоја калуса после индукције. PPK се кретао у границама око 0,4 што је за остале врсте и култиваре пораст масе који се везивао за најнеповољније подлоге. Друга појава која је забележена код магриве је да се на подлози MS4, која поред NAA садржи и мању количину IBA, на калусу који расте, брзо и интензивно долази до потамњивања. После бројних супкултура MS2 је подлога која је издвојена као најпогоднија за калус магриве.

За култивар ‘Colt’, поред одговарајућег MS2 медијума, калус је имао добар пораст и на WP1 и SH1 што указује да је супкултура калуса добро реаговала и на други тип основних медијума и на ауксин 2,4-D. Без обзира на добре резултате приликом супкултуре, треба напоменути да је код овог култивара после одређеног броја супкултура на истом типу медијума (на подлогама SH и WP) долазило до потамњивања и пропадања калуса. Појава није забележена на MS2 подлози на основу чега је и за култивар ‘Colt’ ово била изабрана подлога за даља истраживања, али је, како је већ наглашено, и на овој подлози супкултура морала да се ради на сваких двадесетак дана.

Калус врсте *Prunus serotina* најбољи раст показује на подлози SH5 и MS2 (по резултатима раст је слабији на MS2 али разлика није статистички значајна). Избор за даља истраживања код ове врсте била је последњепоменуто хранљива подлога.

Култивар *Prunus serrulata* ‘Amanogawa’ показао је највећу позитивну прилагодљивост на употребљене хранљиве подлоге и параметар PPK је без значајних разлика у вредностима за 6 подлога (MS2, WP1, WP2, SH1, SH2 и SH3). Даља супкултура за овај култивар је рађена на MS2 медијуму.

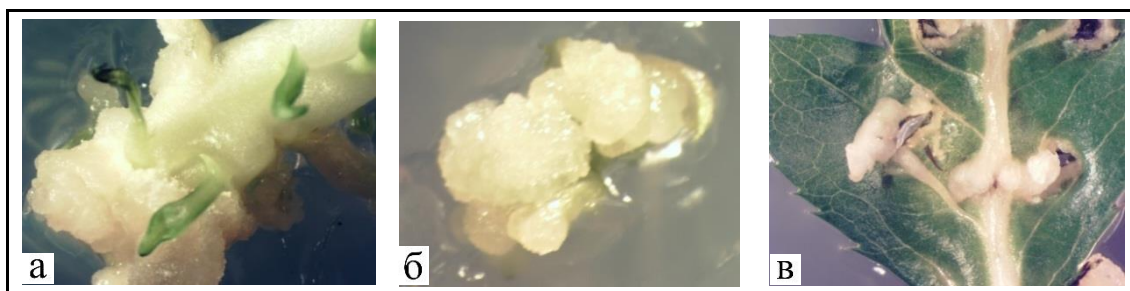
У табели 20 за сваки генотип посебно, приказане су све подлоге које су се током индукције калуса (из меристема пупољака и из вегетативних делова летораста) показале најпогоднијим за успешан процес калогенезе, као и оне

подлоге које су се после супкултура, анализе релативног раста калуса и мењања боје калуса, показале најпогоднијим за даље извођење огледа.

Табела 20. Најпогодније хранљиве подлоге за индукцију калуса свих таксона

врста или култивар	Одговарајуће хранљиве подлоге за субкултуру и индукцију калуса из меристема пупљака и вегетативних делова летораста	
	при индукцији калуса	субкултура
<i>Prunus avium</i>	MS2, MS4, WP1, WP2, WP4, WP5, SH1, SH2, SH4	MS2, MS4
<i>Prunus 'Colt'</i>	MS1, MS2, SH1, SH2, SH4	MS2, MS4
<i>Prunus mahaleb</i>	WP1, WP2	WP4, MS4
<i>Prunus serrulata</i>	MS2, MS4	MS2, MS4
<i>Prunus serotina</i>	MS1, MS2, MS3, MS4, SH1, SH2, SH4	MS2
<i>Prunus serrulata 'Amanogawa'</i>	MS2, MS4, WP2, SH2	MS2
<i>Prunus serrulata 'Kanzan'</i>	MS2, SH1, SH2, SH4, SH5	MS2, MS4, SH2
<i>Prunus serrulata 'Kiku-shidare-zakura'</i>	MS2, WP2, SH1, SH4	MS4, WP2

Резултати који нису могли бити статистички обрађени због недостатка довољне количине почетног материјала односе се на клон крушке *Pyrus communis* 'Pyrodwarf'. Како је циљ био да се добије одређена количина зрнастог, фибрилног калуса са којим би се поставила негативна контрола компатибилности (инкомпатибилан спој крушке и трешње), у даљем тексту ће бити изнети детаљи индукције калуса из почетних сток биљчица и резултати добијени у супкултурама индукованог калуса на медијумима MS2, MS4, WP1, WP4, SH1 и SH4. Индукција калуса која је извођена на медијумима MS2, MS4 и SH2, је била успешна: на делу стабљике, на дршци листа и на ламини листа (слика 15а, 15б, 15в).



Слика 15. Три типа експланта: а) део стабљике, б) дршка листа и в) лисна ламина

Индукција је најраније кренула на експланту из дела стабла, око 7. дана, уједначено на свим подлогама, затим на дршци листа и на крају око 10. дана на листу. По типу експланта, на сва три медијума најбољи резултати су постигнути са делом стабљике, потом са дршком листа док је ламина листа продуковала најмању количину калуса.

Детаљи развоја калуса до 14 дана приказани су на слици 15 и указују на појаву разлике у количини пролиферираног калуса. Од три медијума, MS4 се

показао најпогоднијим у односу на време почетка индуковања калуса и у односу на степен покривености експлантата калусом (слика 16). Затим следи хранљива подлога SH2 (слика 17) и са најслабијим резултатима подлога MS2. На експлантима постављеним на ове две подлоге појављује се и местимична некроза експлантата (слика 18).



Слика 16. Развој калуса на а) листу, б) дршци листа и в) делу стабљике на MS4



Слика 17. Развој калуса на а) листу, б) дршци листа и делу в) стабљике на SH2



Слика 18. Индукција калуса на MS2 хранљивој подлози: а) почетак индукције калуса на листу и појава некротираних површина експланта; б) развој калуса на дршци листа и в) на делу стабљике

Релативно мале количине калуса су премештане на 6 различитих хранљивих медијума у покушају да се издвоји најпогоднији за даљи раст калуса. Резултати у супкултури су показали да је једини медијум који је било могуће користити за даљу супкултуру био медијум MS4. У првим супкултурама долазило је до делимичног раста и на медијумима MS2, WP1 и SH4, али је при свакој од следећих супкултура на истим медијумима долазило је и до пропадања калуса.

4.3. УТВРЂИВАЊЕ ЈАЧИНЕ СПОЈА КАЛУСА ПЛЕМКЕ И ПОДЛОГЕ

Јачина споја између калуса племки и шест врста подлога у *in vitro* условима анализирана је утврђивањем процента успешних спојева и мерењем јачине оствареног споја. Резултати су приказани за сваки култивар јапанске трешње посебно, кроз окуларну и анатомску анализу споја.

4.3.1. Успешност спајања *Prunus serrulata* ‘Amanogawa’ са различитим врстама подлога

Код одређеног броја спојева 14. дана од извршеног спајања, јавиле су се статистички значајне разлике у оцени параметара. Код свих спојева евидентна је разлика у јачини везе калуса у анализираном временском периоду (табела 21). У односу на контролни компатибилан хомеопластични спој (7.7.) средња вредност за јачину споја 2.7. не показује значајну разлику, као ни проценат успешних спојева 4.7. у односу на контролни 8.8. Промене које су се јавиле до 21. дана појачале су спој на комбинацијама 2.7 и 4.7 и у проценту успешних спојева те се ове комбинације могу сматрати најчвршћим. Период од 21 дан се показао повољан и за број спојева и степен јачине везаности код споја култивара ‘Amanogawa’ и домаће трешње (процент успешних спојева је са 28,9 % отишао на 68,9 %, а степен јачине споја са 1,08 на 1,42).

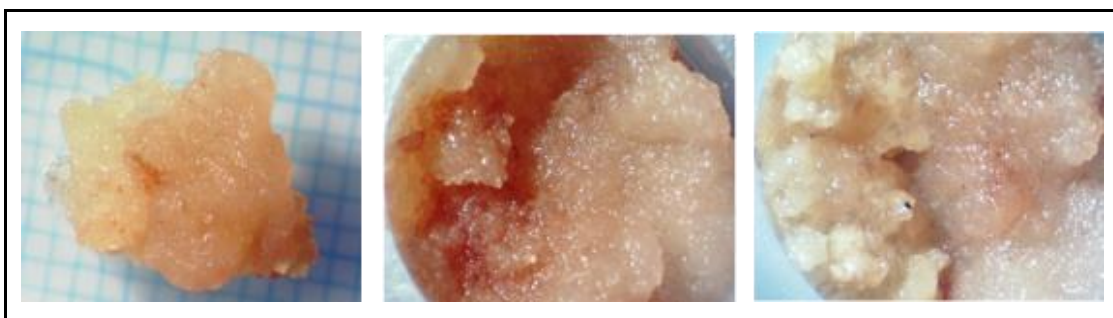
Табела 21. Анализа варијансе и вишеструких опсега за параметре % успешних спојева и оцене јачине споја (ANOVA, $p < 0,05$, LSD тест), * постоји значајна разлика у односу на контролни спој 7.7., ns разлика није сигнификантна.

7. <i>Prunus serrulata</i> ‘Amanogawa’					
14. дан			21. дан		
спој	% спојених	јачина споја	спој	% спојених	јачина споја
1.7.	28,9±5,129 *	1,08 ns	1.7.	68,9±7,727 *	1,42 *
2.7.	64,2±6,385 ns	1,34 ns	2.7.	86,7±10,092 ns	1,78 ns
3.7.	0±0,00 *	0 *	3.7.	8,90±1,442 *	1 *
4.7.	75,6±8,441 ns	1,21 ns	4.7.	86,7±8,911 ns	1,73 ns
5.7.	15,6±3,192 *	1,08 ns	5.7.	22,2±4,436 *	1 *
6.7.	0±0,00 *	0,00 *	6.7.	0±0,00 *	0,00 *
7.7.	73,4±6,118	1,22	7.7.	91,1±7,222	1,89

Резултат анализе споја са једном од комбинација која је узета као негативна контрола – 5.7. указује да је око 15 % спојева после 14. дана формирало спојеве средње јаке (без значајне разлике у односу на хомеопластичан спој 7.7). У нешто већем проценту, за око 20 % спојева, могло се сматрати да је остварена веза са калусом племке. Ипак јачина везе калуса код ове две врсте слабила је до краја 21. дана и спала са 1,08 на степен од 1, по статистичкој анализи као значајно слабија веза од хомеопластичног споја.

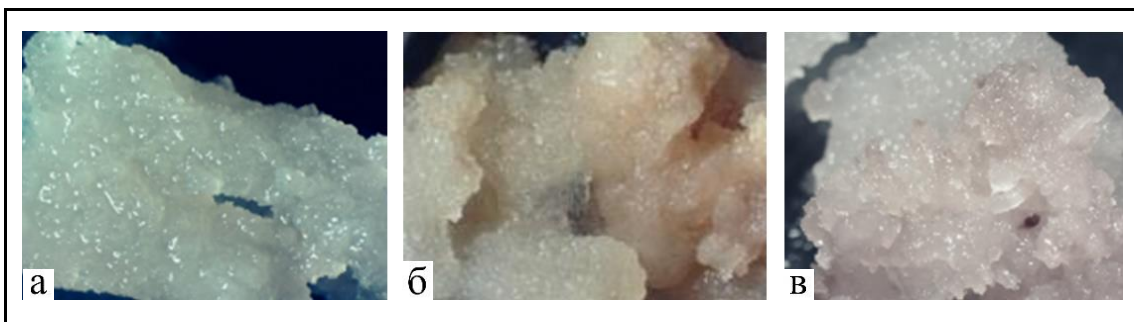
Вредност параметара за мерење успешности споја калуса врста 3. и 7. остала је до краја скоро једнака нули, а неуспостављање везе калуса и добијене вредности се статистички нису разликовале од вредности добијених спајањем крушке и култивара ‘Аманогawa’ (комбинација 6.7. – друга негативна контрола). Спој означен са 3.7. не може се по овој анализи сматрати успешним.

Поред анализе спојева извршена је и анализа промене боје самих калуса и појава линије на споју два калуса. На неким од комбинација до промене боје калуса после спајања, долазило је постепено са појачањем интензитета обојења у периоду од 10. до 21. дана. Комбинација 1.7. није показивала промене боја на самој линији споја, али су се промене дешавале на калусу култивара ‘Аманогawa’ благим тамњењем. Без обзира на промену боје, спојеви су остали чврсто спојени (слика 19).



Слика 19. Изглед калуса у споју; блага промена боје калуса култивара ‘Аманогawa’

Спојеви комбинације 4.7 су до последњег дана остајали везани и без промена боје калуса обе врсте у пределу споја (слика 20а, 20б и 20в). На споју 2.7. забележена је појава бржег раста и старења калуса подлоге ‘Colt’ у виду тамније боје периферних слојева калуса. Ова промена није имала утицај на јачину споја.



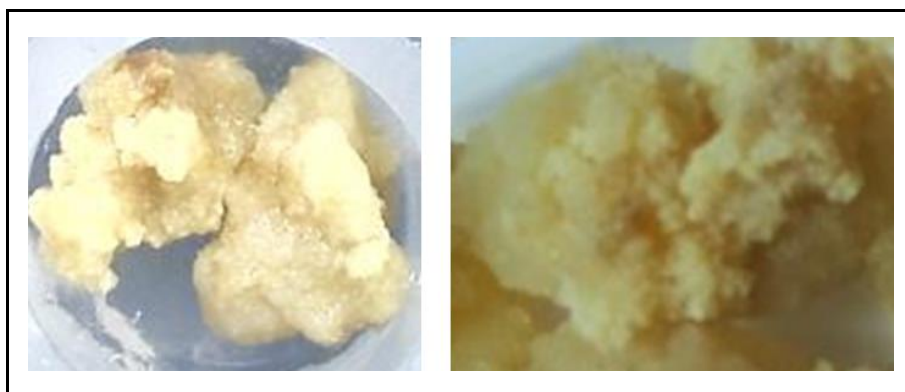
Слика 20. Калус без промене боје на споју: а) спој 4.7. ; б) спој 4.7.; в) спој 2.7.

Потпуно потамњивање калуса евидентирано је на спојевима 3.7. код свих узорака. Разлике су се ипак јавиле у степену спајања клауса, пошто је забележен мањи број спојева који су без обзира на промену боје остали везани (слика 21).



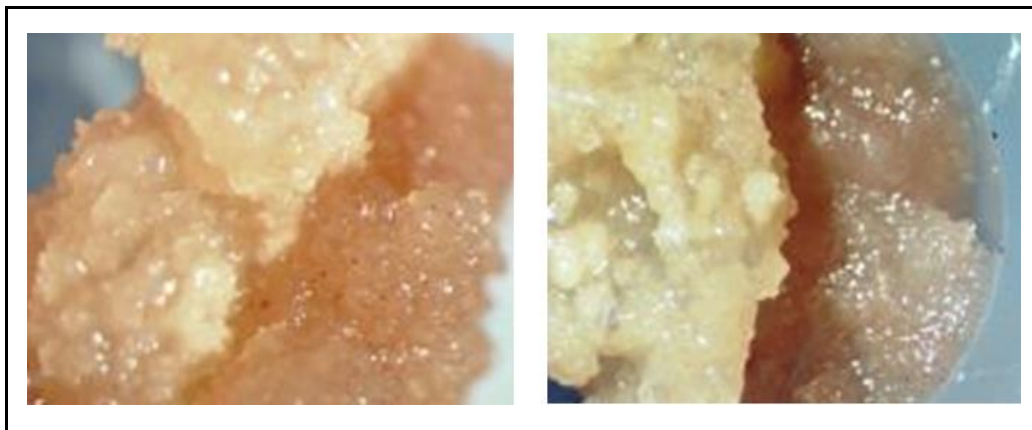
Слика 21. Изглед потамњивања калуса магриве на споју са калусом култивара

Обрнута појава је забележена код споја негативне контроле (некомпатибилне комбинације) између калуса спојева 6.7, с том разликом да је међу узорцима било спојева код којих није примећена појава потамњивања калуса али није долазило до остваривања споја (слика 22)



Слика 22. Калус без промене у боји иако није остварен спој између калуса

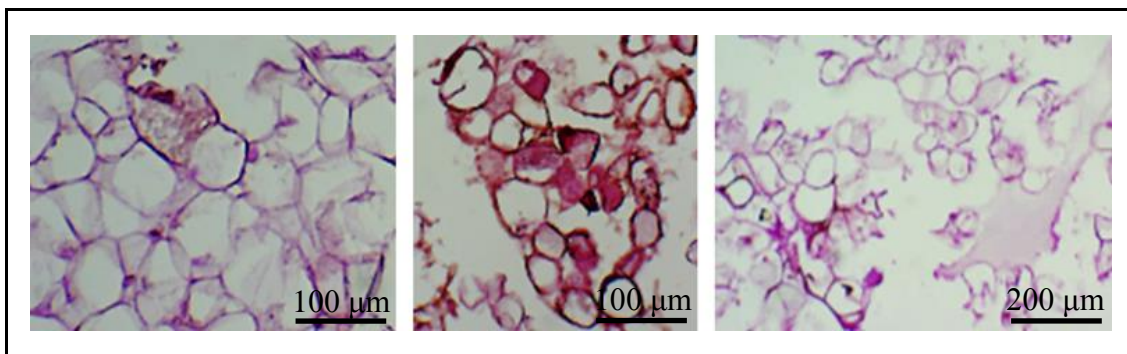
Друга контролна комбинација која је постављена као негативна контрола – 5.7 са 22,2 % формираних спојева који се нису одвајали приликом контролне провере после 21 дан, мењала је боје калуса слабијег интензитета на калусу подлоге (*Prunus serotina*) него на калусу племке (слика 23). Друга појава која је забележена после 21 дан, је приметно интензивнији раст калуса подлоге од племке.



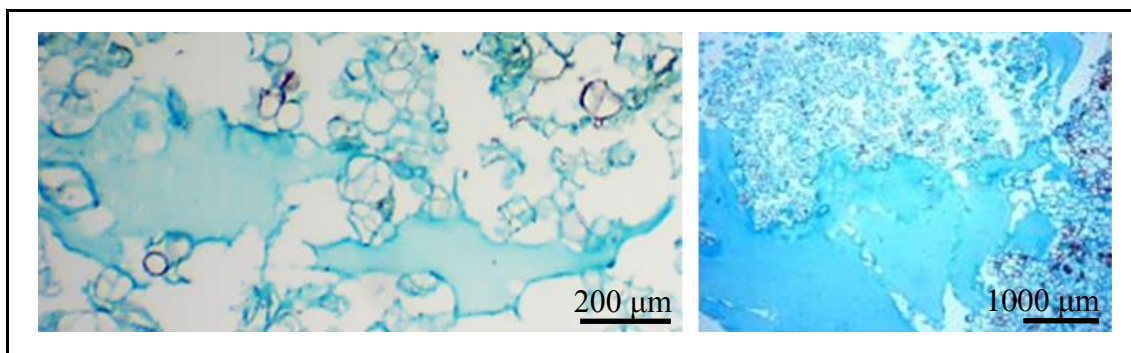
Слика 23. Спој калуса подлоге *Prunus serotina* и култивара 'Amanogawa'; слабија промена боје калуса подлоге

Анализа анатомских пресека

Анализом анатомских пресека сваке од наведених комбинација бојењем пектинских материја, фенола и масти наглашене су разлике и сличности које су се јавиле на ћелијском нивоу паренхима калуса различитих таксона. За препознавање детаља присуство и локација пектина остварена је бојењем рутенијум ред бојом, а за структурна бојења ћелија двојно бојење сафранином и алцијан плавом. Пектински полисахариди се на споју калуса 1.7. (*Prunus avium/Prunus serrulata* 'Amanogawa') појављују локализовано у зидовима ћелија калуса оба таксона (слика 24) као и у екстрацелуларном простору, местимично на читавој површини пресека (слика 25). Разлика у ширини слоја пектина у зидовима ћелија није забележена ни на спојевима ове комбинације који су се одвајали. Пектини у међућелијском простору су локализовани између ћелија исте врсте по мањој површини у односу на ону између калуса различитих ткива. Иста појава је забележена и код успешних и код неуспешних спојева.

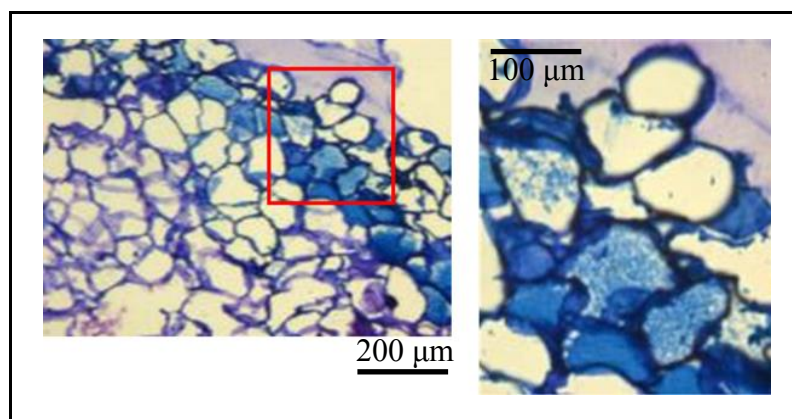


Слика 24. Пектини у зидовима ћелија калуса оба таксона у споју 1.7. бојени рутенијум црвеном бојом



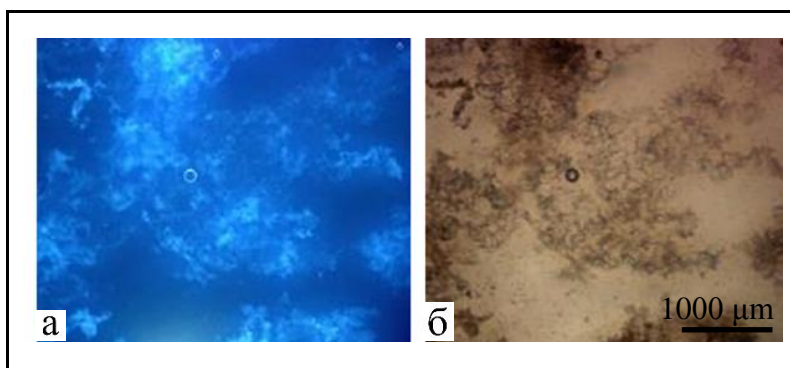
Слика 25. Пектински полисахариди у екстрацелуларном простору, бојени сафранином и алцијан плавом

У локализацији фенола коришћене методе бојења толуидин плавом указују да се на местима спајања два типа калуса феноли локализују у појединачним ћелијама уз ивицу ћелијског зида, без појаве фенола у ћелијама. Места на којима се запажају фенолна једињења унутар ћелија је калусно ткиво формирано на периферији. У оваквим случајевима јасно уочљива акумулирана фенолна једињења се код ове комбинације калуса јављају само на калусу подлоге (слика 26).



Слика 26. Толуидин плаво бојење фенола у калусу подлоге

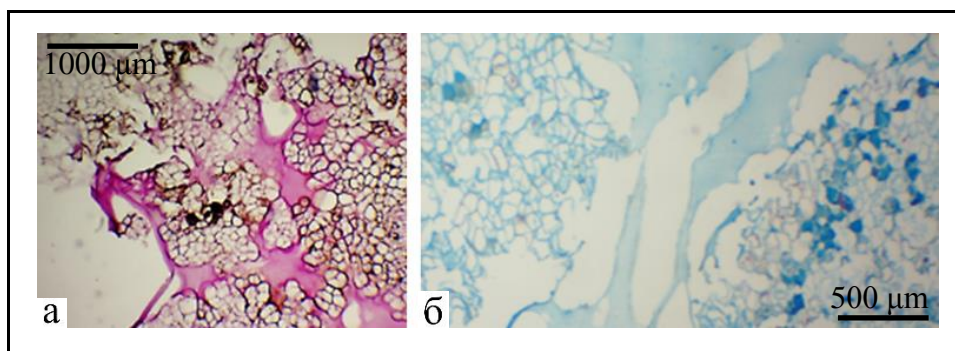
Привремени препарати анализирани на флуоресцентном микроскопу не дају јака осветљења фенолних једињења на препаратима. Јача аутофлуоресценција се јавља у случају преклапања ћелија у слоју, што је разлог појачаног контраста. Ни на једном од препарата није забележено нагомилавање фенолних једињења унутар ћелија калуса (слика 27).



Слика 27. а) Аутофлуоресценција фенола уз ћелијске зидове;
б) паралелан снимак са светлосним микроскопом

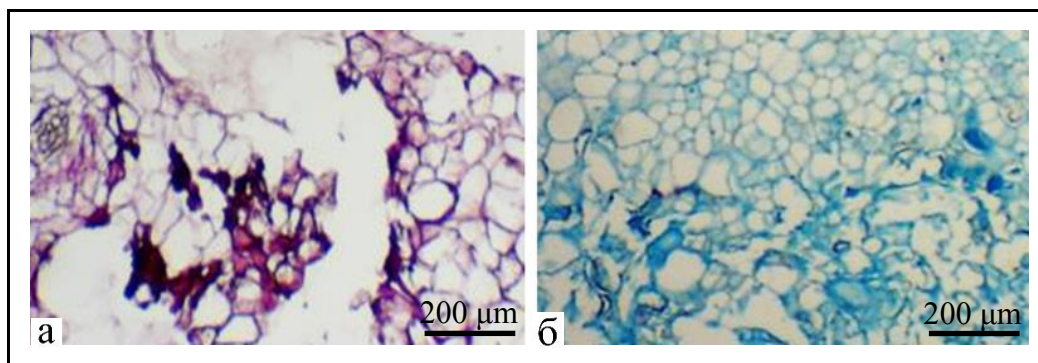
На анализираним спојевима нису локализоване ни масти које акумулирањем у ћелијама калусних спојева могу указати на инкомпатибилан спој.

Анализама на ћелијском нивоу спојева означених са 2.7. (*Prunus* ‘Colt’/*Prunus serrulata* ‘Amanogawa’) и 4.7. (*Prunus serrulata*/*Prunus serrulata* ‘Amanogawa’) потврђени су резултати добијени претходном анализом да су калуси ове две подлоге компатибилни са калусом култивара. Пектински полисахариди акумулирани су између ћелија споја у неправилним површинама дуж читавог пресека обе комбинације у близини спојева и ка периферији. Код споја 2.7. слабије је изражено присуство пектина у ћелијским зидовима у односу на исту појаву на споју 4.7. (слика 28).



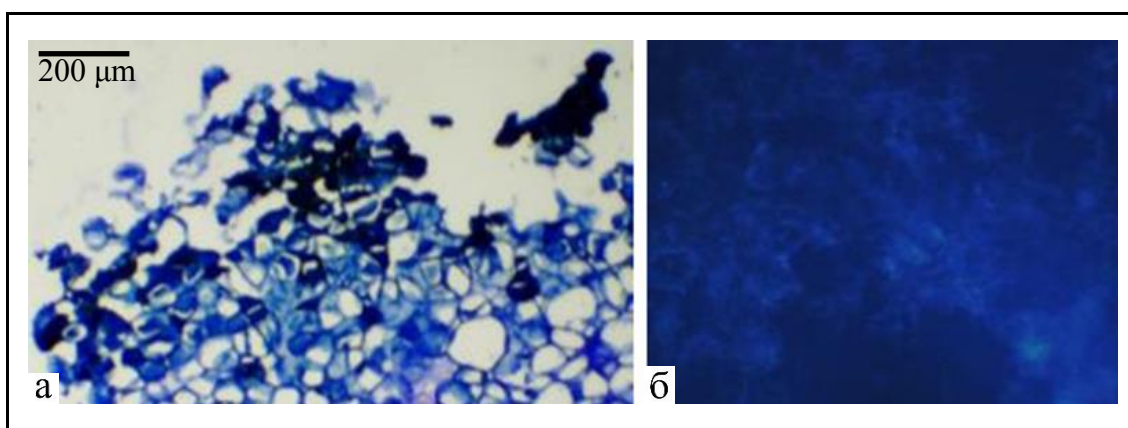
Слика 28. Пектини у међупростору између калуса а) на споју бојено рутенијум црвеном
б) 2.7. пектини бојени сафранин и ацијан плавом

Код споја 4.7. јављају се површине око ћелијских зидова интензивно обојене тамнијим и светлијим нијансама мрко црвене боје (слика 29).



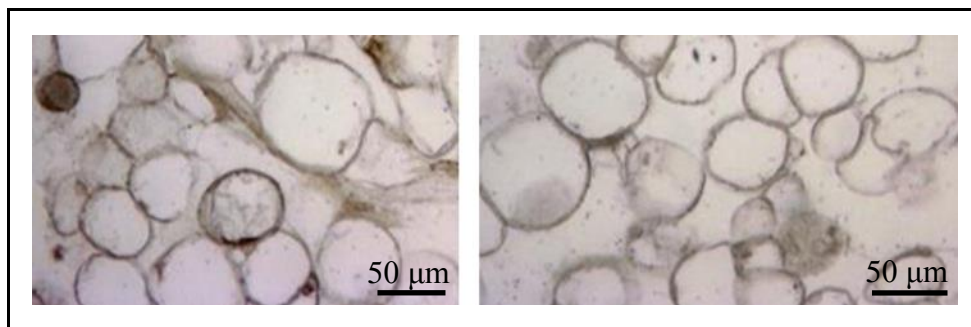
29. Пектини локализовани унутар ћелија на споју 4.7.
а) боја рутенијум црвена и б) Боја сафранин и ацијан плава

Уједначено старење калуса јапанских трешања у комбинацији 4.7. условило је да се феноли не сакупљају ни на периферним странама калуса који је експониран и није у додиру са хранљивим медијумом. То се јасно види на пресецима бојеним толуидин плавом, где уједначена боја задебљалих зидова указује само на присуство пектина. За разлику од овог споја, интензивно старење калуса подлоге ‘Colt’ манифестује се и на анатомском нивоу у појави нагомилавања фенола у ћелијама периферног појаса. Флуоресценцијом на криотомским пресецима присуство фенола локализовано је уз ћелијске зидове, без јасног диференцирања читавог појаса спољашње зоне калуса (слика 30 а и 30 б).



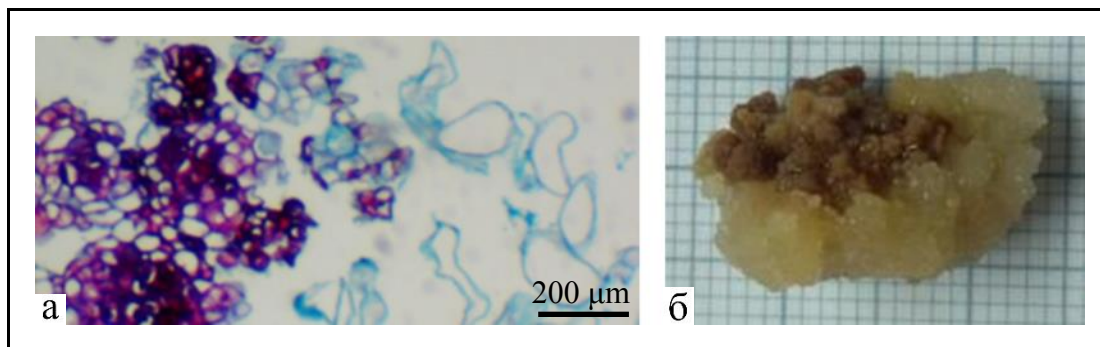
Слика 30 а) Локализација фенола у периферним деловима калуса ‘Colt’- боја толуидин плава
б) Аутофлуоресценција фенола само уз ћелијске зидове

Једињења масти нису локализована ни на једном споју обе комбинације, што потврђује потенцијалну компатибилност (слика 31).



Слика 31. Бојењем суданском плавом нису локализоване масти на споју 4.7.

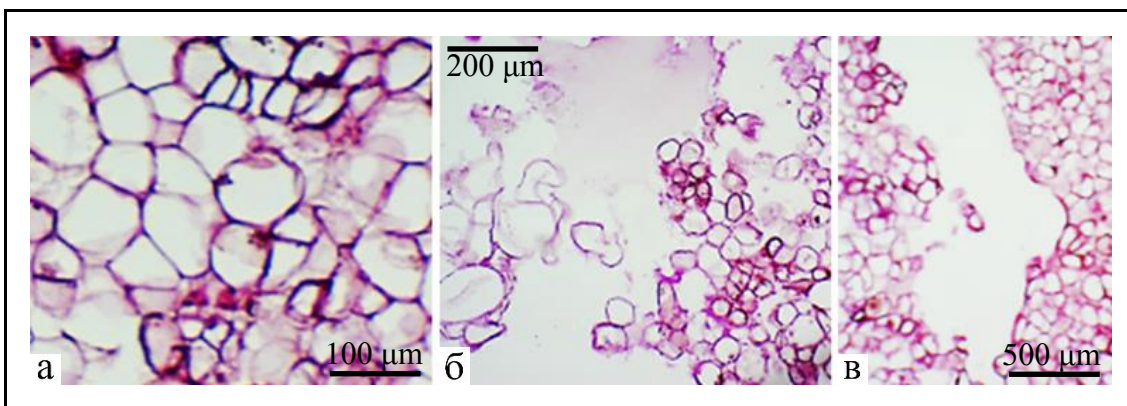
Спојеве магриве и култивара ‘Аманогawa’ означени 3.7. према резултатима анатомских анализа (слика 32 а) показују најприближније резултате резултатима са негативном контролом 6.7 (*Pyrus communis* ‘Pyrodwarf’/*Prunus serrulata* ‘Аманогawa’). Чињеница да је степен обраоњења калуса магриве најинтензивнији од свих испитаних култивара и врста, донекле може да разјасни добијене резултате. С друге стране калус магриве најспорије расте и процес пролиферације калуса споријег темпа огледа се и у скоро двоструко већој маси калуса спајане врсте на крају термина за анализу поменутих манифестација (слика 32б).



Слика 32 а) Црвена обојења фенола на пресецима у ћелијама магриве; боја сафранин и алцијен плава **б)** Двоструко већа маса калуса култивара ‘Аманогawa’ од калуса магриве

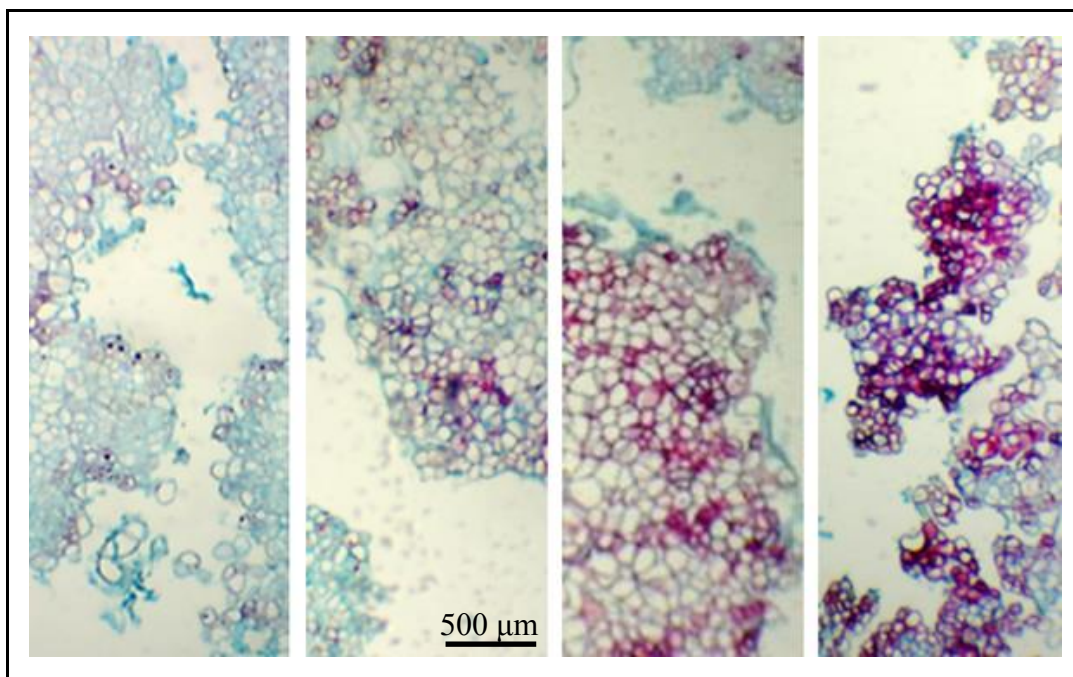
У начину распореда пектинских полисахарида није уочена већа разлика у односу на претходно описане спојеве. Пектини су локализовани код обе врсте калуса на поменут начин. У ћелијама подлоге количина пектина је већа, али није приметно нагомилавање карактеристично за до сада анализиране спојеве (слика 33а). Покривеност површине у међућелијском простору код осталих испитиваних спојева је такође значајно већа. На споју 3.7. ове површине се јављају спорадично,

у већој мери између ћелија различитих врста (слика 33б). Јасно разграничене површине се не јављају међу груписаним ћелијама исте врсте (слика 33в).



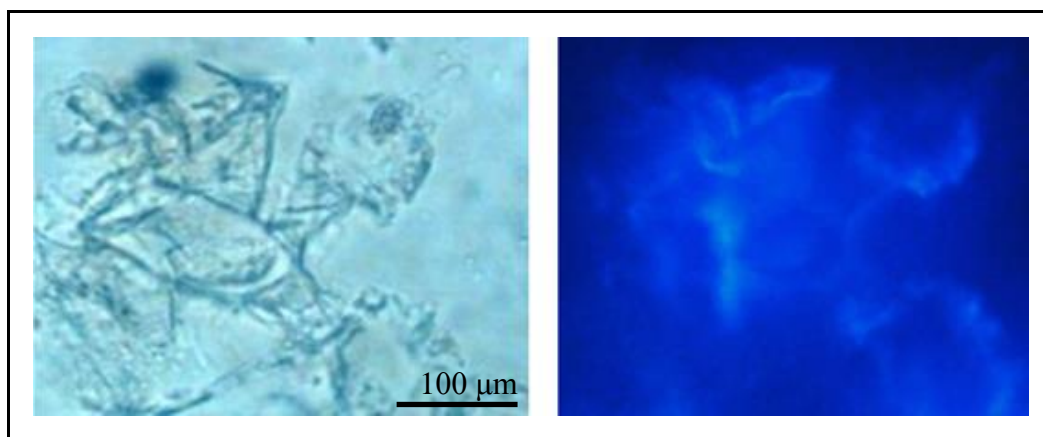
Слика. 33 а). Пектини у ћелијама подлоге б) Спорадична појава пектина између ћелија различитих врста у споју 3.7. в) Јасно разграничене површине између ћелија исте врсте; боја рутенијум црвена

Фенолна једињења се према резултатима бојења у великој мери нагомилавају у ћелијама подлоге. Потамњивање калуса се интензивира временом и до краја 3. недеље испитивања на одређеним деловима покрива читаву површину калуса (слика 34). Ипак, без обзира на спољашњи изглед калуса (уједначена промена боје на читавој површини) на пресецима се јављају површине код којих је нагомилавање фенола мање.

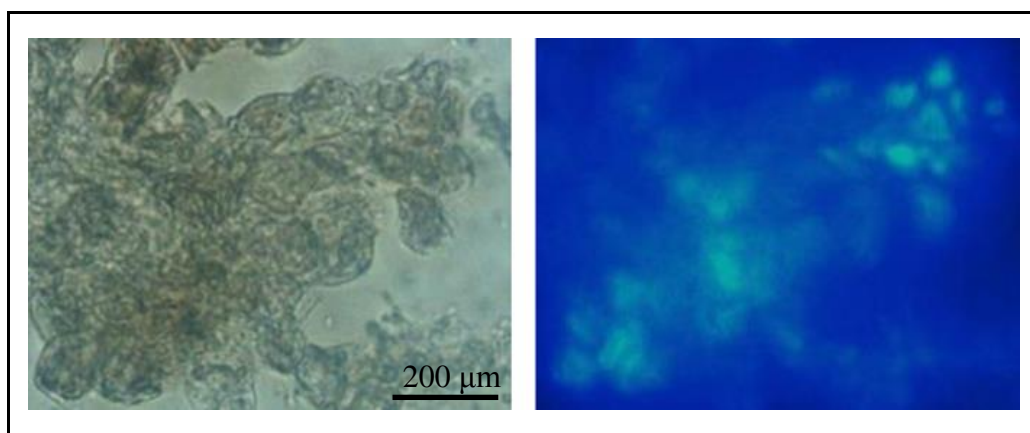


Слика 34. Промена садржаја фенола у ћелијама током времена у споју 3.7. боја сафранин и алцијен плава

Количина присутних фенолних једињења у споју 3.7. и способност аутофлуоресценције као одговор на осветљеност и апсорбцију зрака, а у исто време реемитовање светлости веће таласне дужине и мање енергије, код споја је дала утисак јаче осветљености наспрам тамног видног поља. Осветљена површина код ћелија подлоге јасно је формирана у структури ћелијског зида док је код ћелија племке она уочљива и у ћелијама (слика 35 и 36).

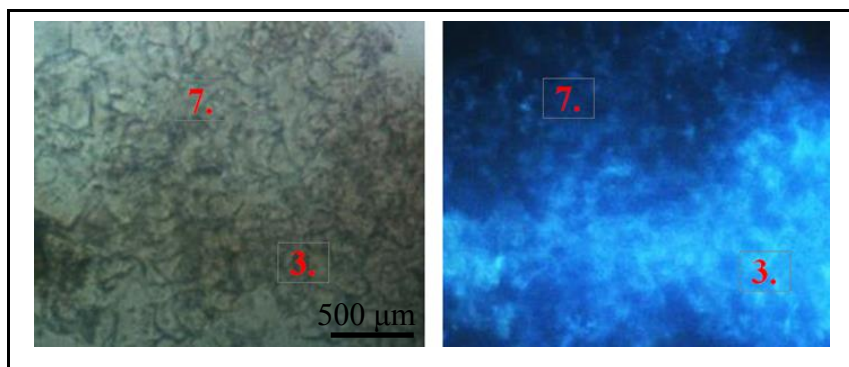


Слика 35. Аутофлуоресценција фенола локализована у ћелијама подлоге



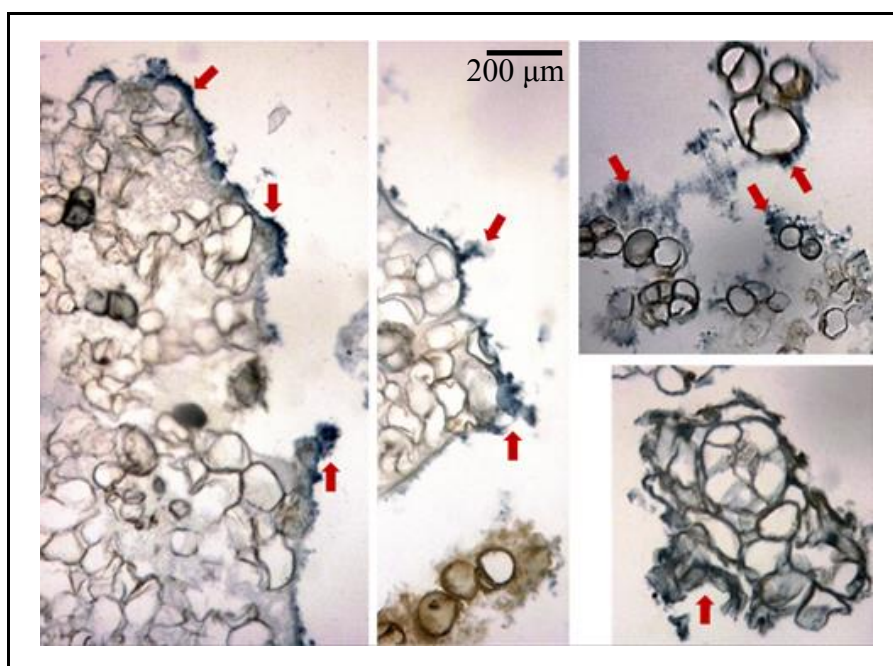
Слика 36. Аутофлуоресценција фенола локализована у ћелијама племке

Први од анализираних спојева код којег је јасно раздвојена површина покривена калусима различитих врста. Како је напоменуто, потамњивање као последица нагомилавања фенолних једињења код калуса подлоге јавља се на читавој површини (слика 37). На пресецима није уочена локализација фенолних једињења само у линијској структури споја. Код свих пресека, ћелије калуса племке не акумулирају феноле у додиру са калусом подлоге и нема забележене промене боје и повећања степена потамњивања.



Слика 37. Аутофлуоресценција масе калуса на споју 3.7. без јаче реемисије саме линије споја

Бојењем судан црном бојом установљено је присуство масти у пресецима споја 3.7 (масти се боје у тамно тегет боју) Локализација је интензивнија на периферним деловима обода групације ћелија и само је у мањем обиму унутар ћелијског зида. На деловима пресека масти су слободно раширене у интерцелуларном простору (слика 38).

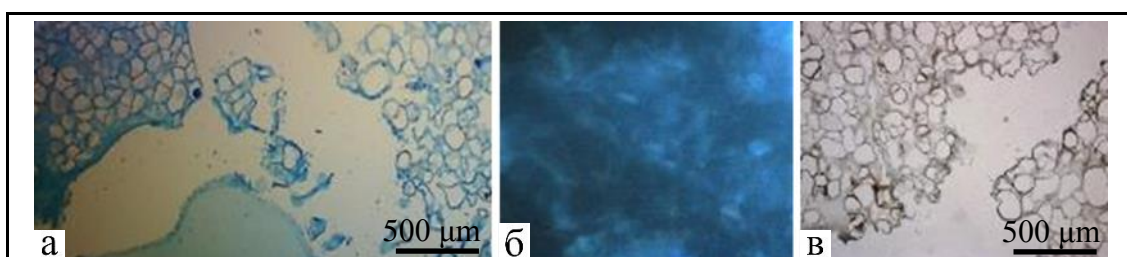


Слика 38. Локализација масти код споја магриве и култивара ‘Amanogawa’

Резултати добијени спајањем калуса култивара ‘Amanogawa’ са калусом врсте *Prunus serotina* (једна од две изабране врсте за негативну контролу споја) нису у потпуности дали очекивани одговор инкомпатибилног споја. Пектински полисахариди на анатомским пресецима локализовани су у обе поменуте форме по читавој површини пресека. У ћелијским зидовима култивара у ширем обиму

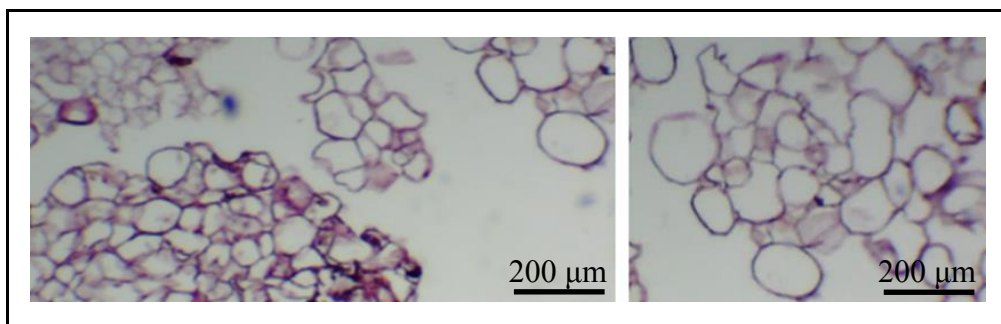
него у ћелијама подлоге, а маса неправилних површина пектина у међућелијским просторима присутна је подједнако код калуса оба таксона.

Бојењем фенолних једињења утврђено је слабо присуство ових једињења у калусима и код подлоге и код племке. Сафранином и алцијан плавим добијене су информације о морфолошким карактеристикама ћелија калуса. Присуство црвене боје на пресецима је занемарљиво, а исти одговор са слабом флуоресценцијом дали су сви делови ћелија оба калуса. Једина места аутофлуоресцирања су ћелијски зидови. Сакупљање масти у ћелијама такође није забележено као значајнија манифестација овог споја (слика 39).



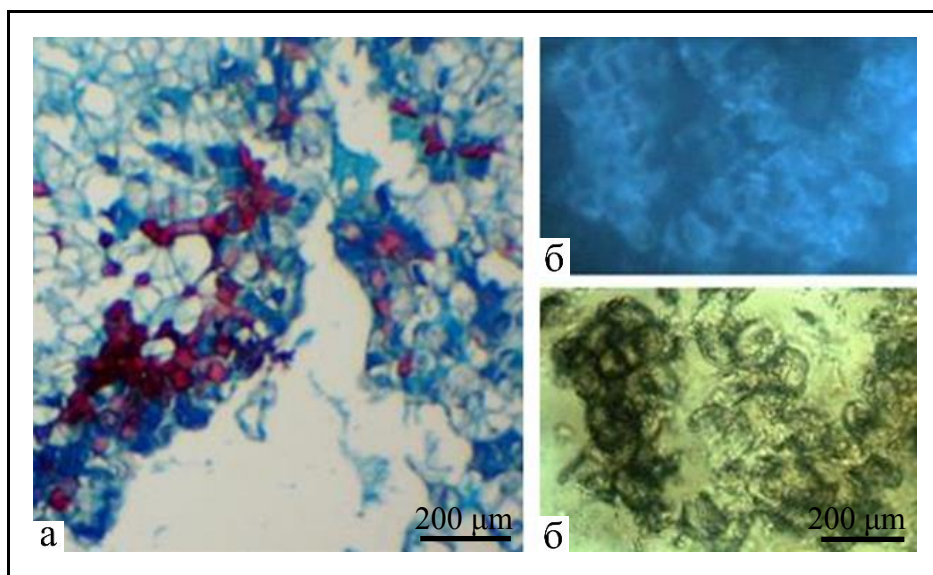
Слика 39. а) Присуство пектина; боја сафранин и алцијан плава. б) Слаба аутофлуоресценција и в) Пресеци без локализације масти указују на добар спој, бојено судан црном

На пресецима припреманим и бојеним за анализу пектина код друге негативне контроле – спој 6.7, у ћелијама подлоге *Pyrus communis* ‘Pyrodwarf’ пектини су присутнији у већој количини у ћелијским зидовима и покривају неправилне површине између тесно збијених ћелија. Као компонента ћелијског сока, присутни су у мањој мери. С друге стране, ћелијски зидови калуса *Prunus serrulata* ‘Amanogawa’ су тањи, покривеност неправилних површина пектинима је мања, а њихова појава у међућелијском простору на целом пресеку је незнатна (слика 40).



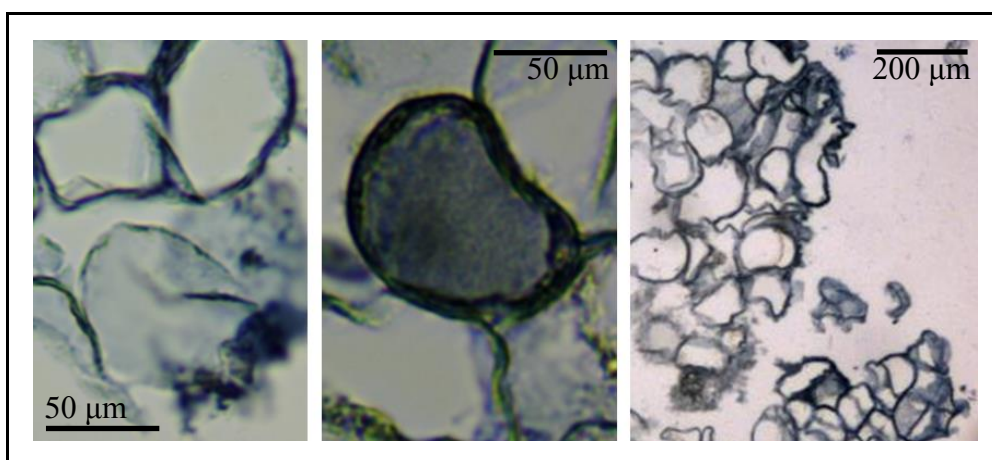
Слика 40. Слабије присуство пектина у ћелијама, уз зидове и међућелијском простору; бојење рутенијом црвеном

Фенолна једињења појављују се на пресеку споја 6.7. у зонама које указују на нагомилавање у деловима калуса који је у додиру са калусом друге врсте (слика 41 а). Насупрот јасно издвојених делова који су бојењем указали на појаву фенолних једињења у ћелијама, флуоресценција ових једињења није довољно јаког интензитета и они се код већине спојева јасно уочавају у ћелијском зиду, али не довољно јасно у унутрашњости ћелија (слика 41 б).



Слика 41 а) Јасно бојење фенола у ћелијама споја калуса; боја сафранин и алцијен плава.
Слика 41 б) аутофлуоресценција ћелија

Боја судан црна на пресецима је јасно издвојила површине појединачних ћелија и групе ћелија (слика 42) код којих су површине обојене тамно тегет бојом локализована једињења масти. Појава ових једињења у оквиру споја калуса две врсте може указати на инкомпатибилност споја.



Слика 42. Локализација липида у ћелијама и уз ћелијски зид код споја 6.7.

4.3.2. Успешност спајања *Prunus serrulata* ‘Kanzan’ са различитим врстама подлога

Две недеље од постављања комбинација спојева, у односу на контролни, хомеопластични, компатибилан спој 8.8., добијени резултати показују да је остварен јак спој калуса култивара ‘Kanzan’ са обичном трешњом (табела 22). Добијене средње вредности процента успешних спојева као и степен јачине споја за спој 1.8. су веће вредности од оних добијених за спој 8.8. (али без статистичке значајности у разлици за оба параметра). Обична трешња показује висок степен компатибилности калуса са калусом култивара.

По значајности за први параметар не јављају се разлике ни у односу на спој 5.8. Код ове комбинације јачина споја је била јача у односу на контролни спој 8.8 у току првих 14 дана и јачина везе није слабила до 21. дана, осим што је та вредност по значајности са контролном прешла у групу значајно слабије везе.

Табела 22. Анализа варијансе и вишеструких опсега за параметре % успешних спојева и оцене јачине споја (ANOVA, $p < 0,05$, LSD тест), * постоји значајна разлика у односу на контролни спој 8.8., ns разлика није сигнификантна.

8. <i>Prunus serrulata</i> ‘Kanzan’					
14. дан			21. дан		
спој	% спојених	јачина споја	спој	% спојених	јачина споја
1.8.	71,1±5,539 ^{ns}	1,11 ^{ns}	1.8.	80±8,032 ^{ns}	1,73 ^{ns}
2.8.	48,9±7,817 [*]	1,00 ^{ns}	2.8.	64,2±9,911 ^{ns}	1,42 [*]
3.8.	15,6±2,998 [*]	1,00 ^{ns}	3.8.	44,4±3,765 [*]	1,11 [*]
4.8.	55,6±8,221 ^{ns}	1,34 [*]	4.8.	84,4±5,532 ^{ns}	1,89 ^{ns}
5.8.	73,4±6,674 ^{ns}	1,22 [*]	5.8.	55,6±4,291 [*]	1,22 [*]
6.8.	0±0,000 [*]	0,00 [*]	6.8.	0±0,000 [*]	0,00 [*]
8.8.	68,9±4,569	1,00	8.8.	84,4±5,012	2,00

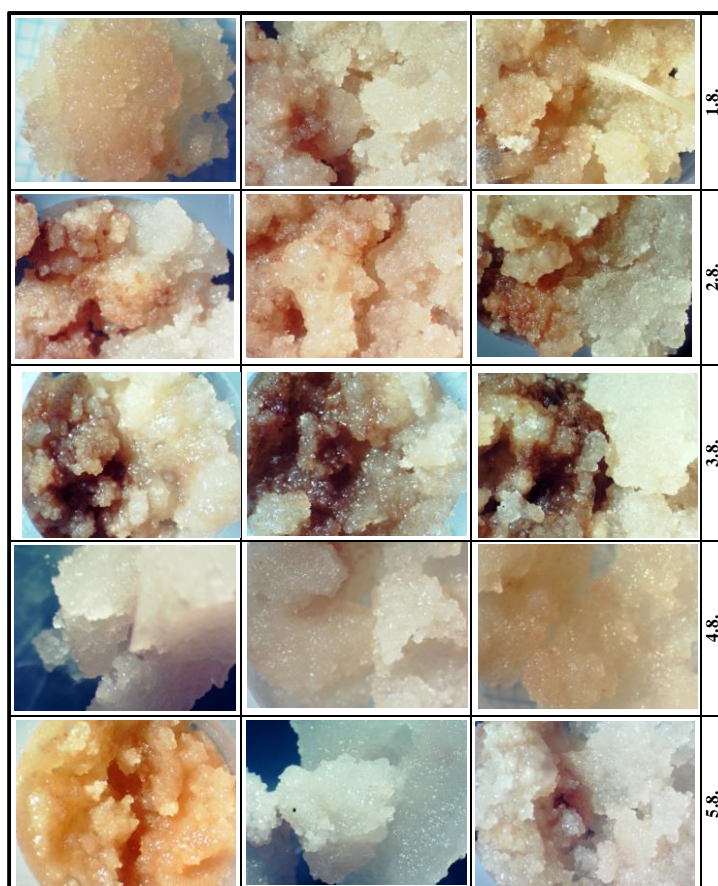
Следе вредности добијене за спојеве јапанских трешања (спој 4.8) са доста чврстим спојем (степен јачине оцењен је са 1,34), али значајно мањим процентом спојених. У односу на поменуте спојеве, слабији по проценту али не и по степену јачине је и спој 2.8. Преостали испитивани спој 3.8., показао је најслабије вредности за мерене параметре и по вредностима се преклапа са вредношћу негативно контролног споја 6.8.

До 21. дана дошло је до промена у односима добијених вредности за мерене параметре јачине споја калуса. Као и даље јаки и успешни

хетеропластични спојеви могу се сматрати комбинације 4.8. и 1.8. (вредности за оба параметра су без статистичке разлике у односу на хомеопластични спој) и делом комбинација 2.8 (јачина споја је значајно нижа од вредности за прве три).

Спој са магривом, без обзира на брзо потамњивање калуса и спор процес пролиферације калуса, се ипак делимично може сматрати успешним и компатибилним – вредност за проценат успешних спојева се креће око 50 % са јачином споја од 1,11. Негативан контролни спој који је после 14. дана показивао делом боље резултате у односу на мерене вредности после 21. дана је спој 5.8. Ипак, проценат успешно спојених се са 73,4 снижио на 55,6 %, а јачина споја је остала иста – средње јака (1,22). Спој друге негативне контроле није остварен ни у једном случају.

Промене у боји калуса код различитих спојева калуса култивара ‘Kanzan’ са калусима различитих подлога приказани су на слици 43.

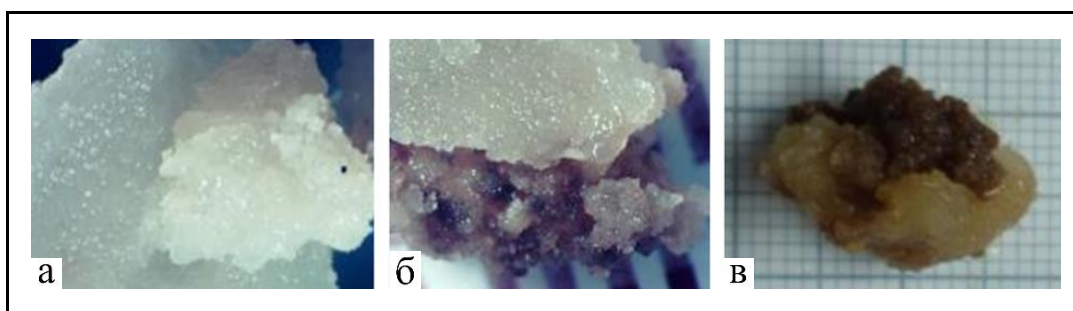


Слика 43. Промене у боји калуса на различитим спојевима култивара ‘Kanzan’

Промена боје калуса посматрана после 21. дана најмање је уочљива на спојевима 4.8, 1.8. и 5.8. с тим што је код прва два, спој остварен на читавој

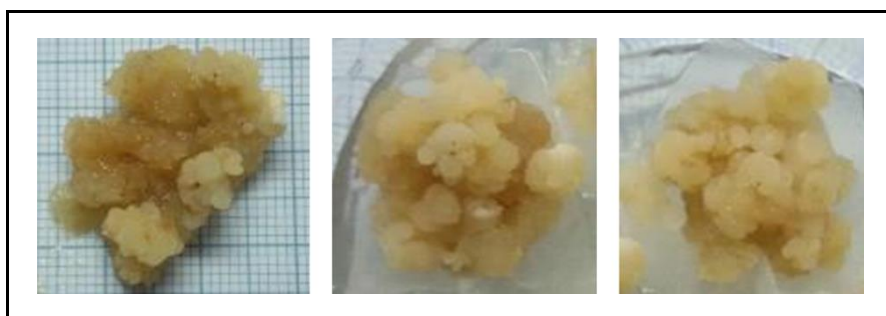
површини спојених делова калуса, док је код комбинације 5.8. за калус племке остајао везан само део калуса подлоге (слика 44а).

Као што у претходно поменутом случају задржавање светле боје калуса није гарант чврстог споја, тако ни повећање степена потамњивања није подразумевало пропадање или лош спој калуса подлоге и племке. На спојевима 2.8 и 3.8. очигледна је разлика у степену обојења калуса. Код споја 2.8. брзина раста калуса подлоге – ‘Colt’ и старење калуса које је описано у ранијим резултатима доводе до несразмерног односа масе и боје у формираном споју. Али без обзира на поменуто, калуси остају чврсто везани (слика 44б).



Слика 44 а) Делови калуса касне сремзе спојени са калусом култивара (спој 5.8)
б) Чврсто везан калус у споју 2.8 без обзира на промену боје калуса ‘Colt’
в) тамна боја калуса магриве у споју 3.8. и скоро дупло мање калуса у споју

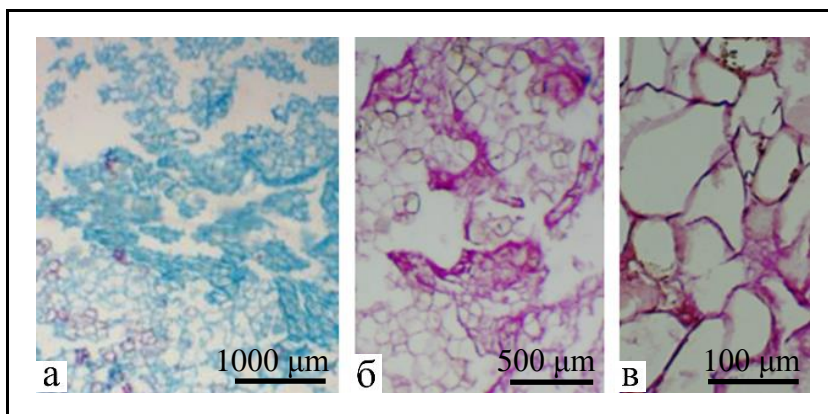
Насупрот оваквој динамици раста калуса, код калуса магриве, пролиферација на изабраним хранљивим подлогама је веома спора и увећање масе калуса у периоду од 21 дан је минимално, али је зато процес старења калуса најинтензивнији у односу на све остале. Резултат је тамна боја калуса у споју и скоро дупло мање калуса у споју (слика 44 в). Очекивана инкомпатибилност код споја 6.8. такође упућује да боја калуса не условљава јачину споја. Калуси обе врсте нису показали најмањи степен потамњивања али спој није успостављен ни у једном делу контакта (слика 45).



Слика 45. Калуси у споју 6.8. без промене боје и код неуспелих спојева

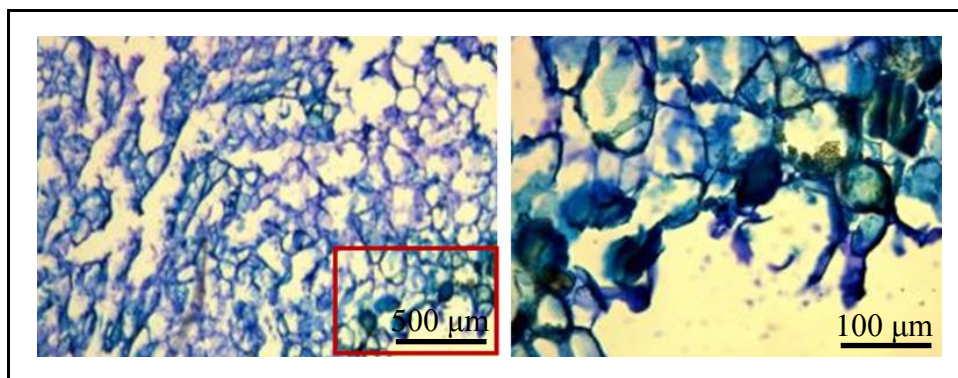
Анализа анатомских пресека

У локализацији пектина у ћелијским зидовима, бојени препарати указују да се на местима спајања калуса у комбинацији 1.8. (*Prunus avium/Prunus serrulata* ‘Kanzan’) пектински полисахариди јасно уочавају на калусу обе врсте. Поред тог облика појављивања, на читавој површини пресека се особина пектина да привлачи молекуле воде уочава у екстрацелуларном простору кроз појаву јасно разграничених површина које покривају слободне зоне између ћелија два калуса (слика 46).



Слика 46. Локализација пектина на споју обичне трешње и култивара ‘Kanzan’;
а) боја сафранин и алцијен плава; б) и в) боја рутенијум црвена

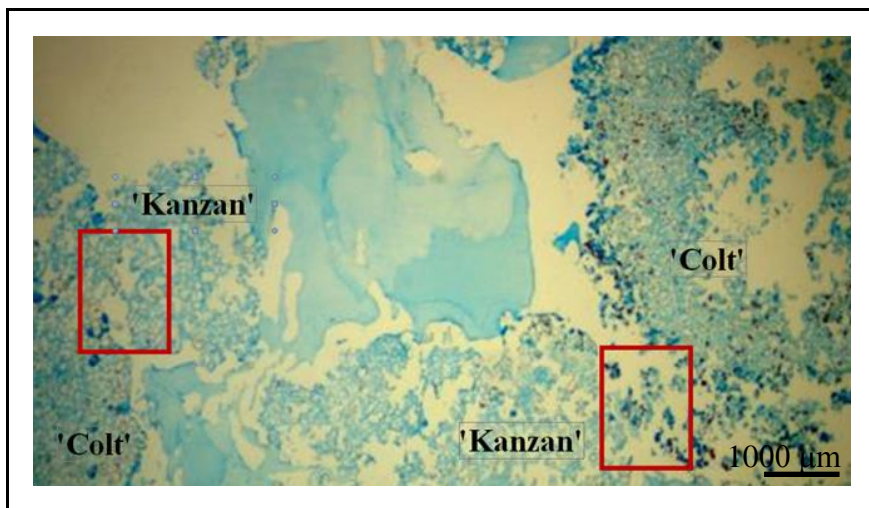
Аутофлуоресценција фенолних једињења на препаратима није интензивна и ни на једном од препарата није забележено нагомилавање фенолних једињења унутар ћелија калуса. Бојење фенола толуидин плавом указују да се на местима спајања два типа калуса феноли не локализују у појединачним ћелијама ни уз ивицу ћелијског зида. Места на којима се запажају фенолна једињења унутар ћелија је калусно ткиво подлоге формирано на периферији споја, што се може приписати пропадању ивичних делова калуса. (слика 47).



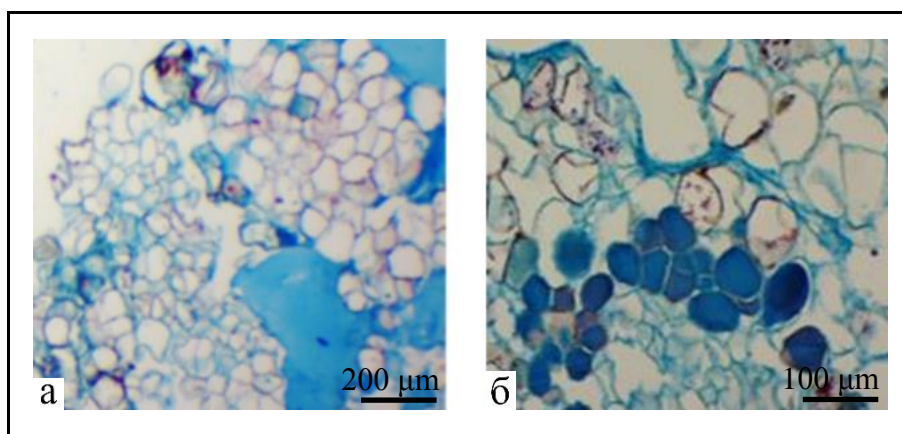
Слика 47. Акумулација фенола у ћелијама на периферији споја; боја толуидин плава

Бојењем препарата судан црним у ћелијама калусног споја, нису идентификоване масти које акумулирањем у ћелијама калусних спојева могу указати на инкомпатибилан спој.

Анализама на ћелијском нивоу спојева означених са 2.8. (*Prunus* 'Colt'/*Prunus serrulata* 'Kanzan') добијен је резултат који указује да калус култивара 'Colt' на одређеном броју спојева показује манифестације инкомпатибилности са калусом племке култивара. Насупрот томе, многа места споја показују добро остварен контакт између ћелија калуса (слика 48). Као последица интензивног и бржег старења калусних ћелија подлоге, појава нагомилавања фенола у ћелијама периферног појаса се јавља на ободном калусу али су уочена таква места и на појасу споја (слика 49).

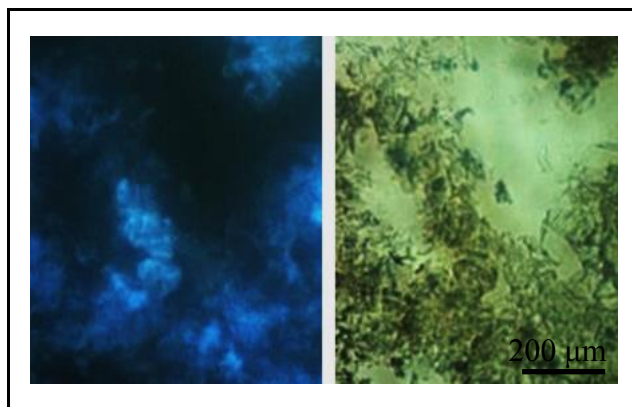


Слика 48. Места добро оствареног споја између калуса (лево) и појава фенола у ћелијама које старе у периферним деловима калуса (десно); боја сафранин и алцијен плава



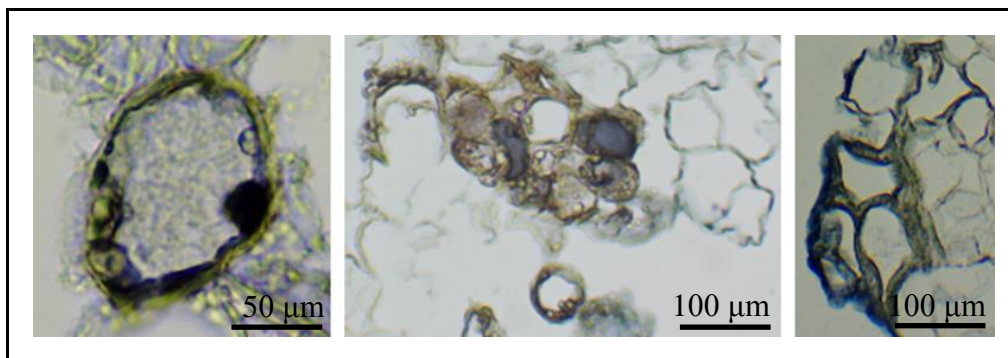
Слика 49. Увеличани детаљи а) успешног споја и б) ћелије на периферији калуса које тамне уз повећан садржај фенола; боја сафранин и алцијен плава

Аутофлуоресценцијом на криотомским пресецима присуство фенола локализовано је уз ћелијске зидове, без јасног диференцирања читавог појаса спољашње зоне калуса у којој има нагомилавања фенола. На слици 50 маса преклопљених ћелија одаје јачу аутофлуоресценцију.



Слика 50. Аутофлуоресценција фенола у зони ћелијског зида

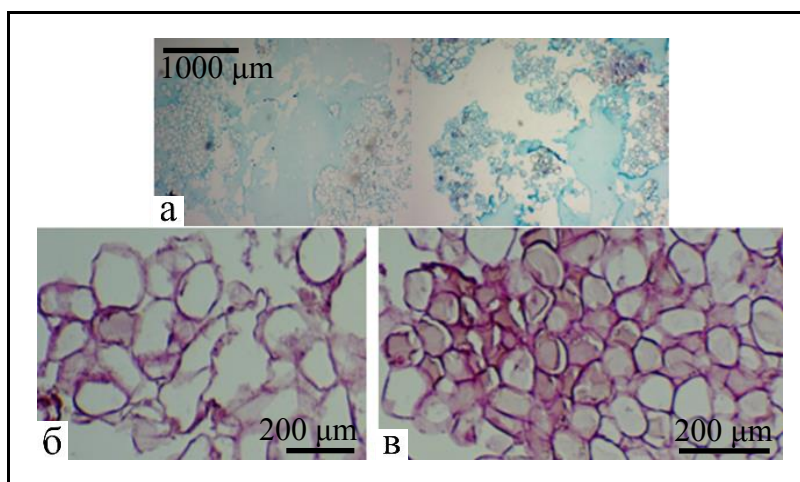
Масти у ћелијама подлоге или племке нису уочене у ћелијама које су у околини споја, што би указивало на још једну од значајних особина ране инкомпатибилности на спојевима калуса. Масти се у мањем обиму, појављују у спорадичним ћелијама на пресеку и њихова појава се не може довести у везу са измењеним метаболизмом ћелија на споју ткива две различите врсте (слика 51).



Слика 51. Слаба локализација масти у ћелијама

Спојеви магриве и култивара ‘Kanzan’ означени 3.8. према резултатима анатомских анализа показују да је степен обрађења калуса магриве и код ове комбинације утицао на неуспостављање већег броја спојева са задовољавајућом јачином везе. Као и у споју са култиваром ‘Amanogawa’ (3.7.) успорени раст калуса магриве и код споја 3.8. резултује у формирању скоро двоструко веће масе калуса култивара од калуса подлоге до краја термина за анализу. Ипак код овог

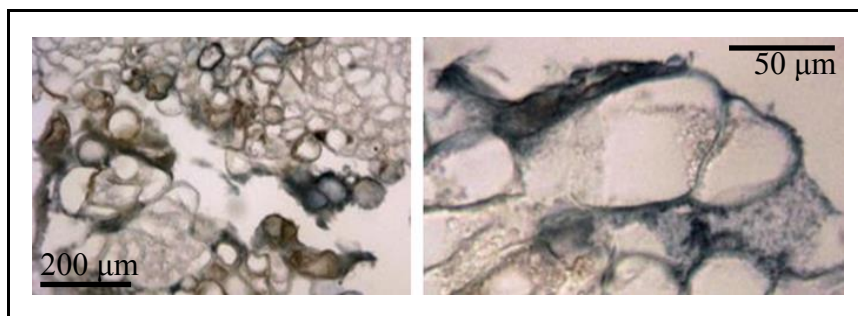
споја забележено је доста места на пресеку која указују на могућ добар спој. Анализом присуства пектинских полисахарида у ћелијама обе врсте, показано је да се он у довољној мери задржава у ћелијским зидовима и у интерцелуларном простору. Пектини разливени у међућелијском простору између ћелија калуса подлоге и племке су још једна разлика која се јавља у односу на спој магриве са претходно анализираним спојем. Код споја 3.8. површине покривене пектиским садржајем су јасно уочљиве (слика 52).



Слика 52. Пектини на пресецима у ћелијама подлоге и племке; а) боја сафранин и алцијен плава; б) и в) боја рутенијум црвена

Разлике у количинама пектина забележене су на рачун веће количине у ћелијама подлоге него племке.

Нагомилавање веће количине фенолних једињења није забележено ни једном од анализа, ни методом бојења толуидин плавом ни флуоресценцијом, без обзира што се потамњивање калуса интензивирало временом. Бојењем судан црном бојом установљена су спорадична места где има накупљања масти – код делова спојева у којима има више и фенолних једињења (слика 53).

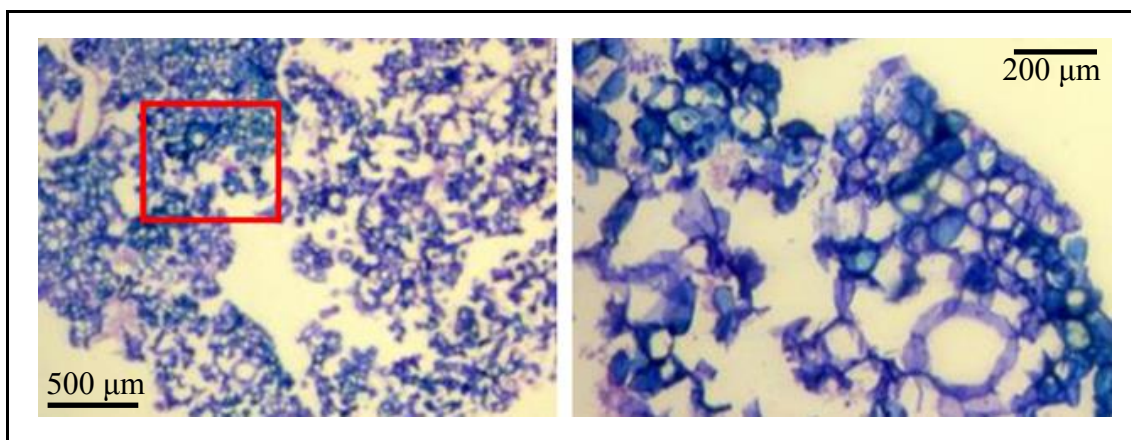


Слика 53. Детаљи пресека бојени судан плавом за локализацију масти; местимична обојења

Спој *Prunus serrulata/Prunus serrulata* ‘Kanzan’ означен са 4.8. на анатомским пресецима указује да су калуси у овој комбинацији компатибилни. Пектински полисахариди акумулирани су између ћелија споја у густим неправилним површина дуж читавог пресека у близини спојева и ка периферији. Сличност калуса јапанских трешања условила је да се феноли не сакупљају на периферним странама калуса који је експониран (на пресецима бојеним толуидин плавом, уједначена боја задебљалих зидова указује само на присуство пектина). Флуоресценцијом на криотомским пресецима присуство фенола није локализовано осим у ћелијским зидовима, без јасног диференцирања веће количине фенола у зонама споја. Бојења масти су дала негативан одговор на овом споју што потврђује потенцијалну компатибилност подлоге и племке.

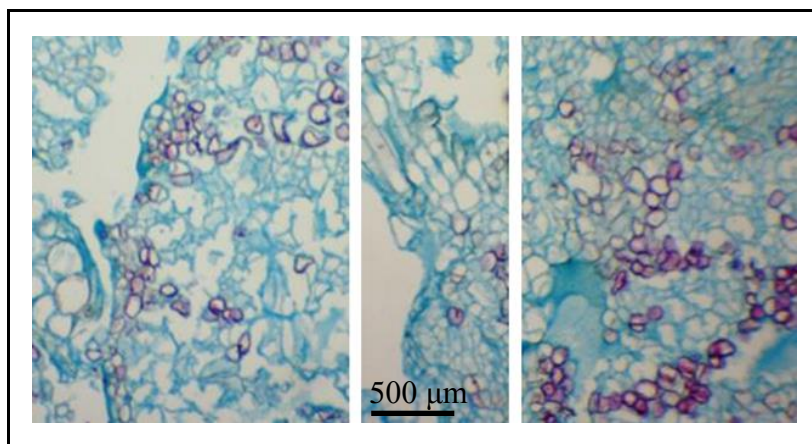
Калус култивара ‘Kanzan’ са калусом врсте *Prunus serotina* (једна од две изабране врсте за негативну контролу – 5.8.) формира спојеве у малим површинама које се могу водити као успешни, али су видни и детаљи на којима није успостављена добра веза између ткива различитих врста. Пектински полисахариди локализовани су у ћелијским зидовима, у ћелијама и у међућелијском простору у површинама неравномерног облика (све поменуте манифестације појављивања пектина су слична свим до сада поменутим које су се односиле на форму успешног споја).

Присуство фенолних једињења у већем обиму није забележено на калусима подлоге и племке. Она се појављују на читавој површини често у појединачним ћелијама разбацана по ткиву и не као одговор два ткива на спој (слика 54).



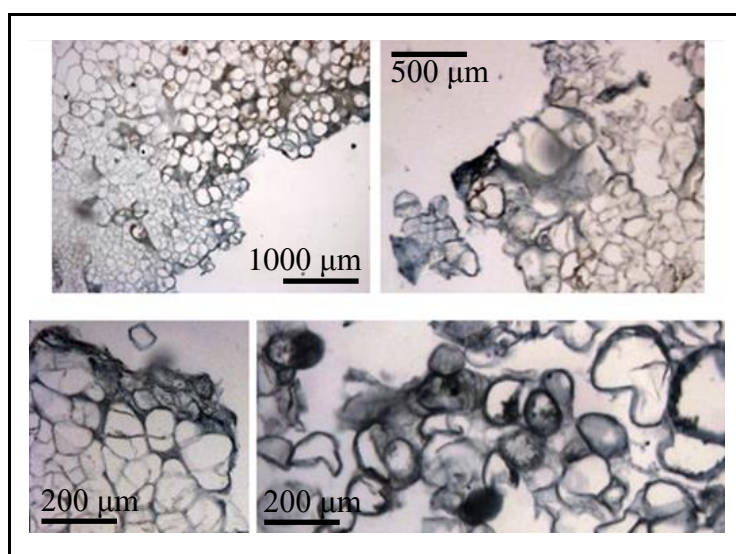
Слика 54. Дифузна локализација фенола на споју 5.8. бојена толуидин плавом

Насупрот томе, на спојевима делова различитих калуса јављају се и промене боје ћелија у низу које могу указивати на неостварен спој (слика 55)



Слика 55. Феноли у ћелијама дуж споја 5.8. у ћелијама у линијским формацијама, бојено сафранином и алцијен плавом

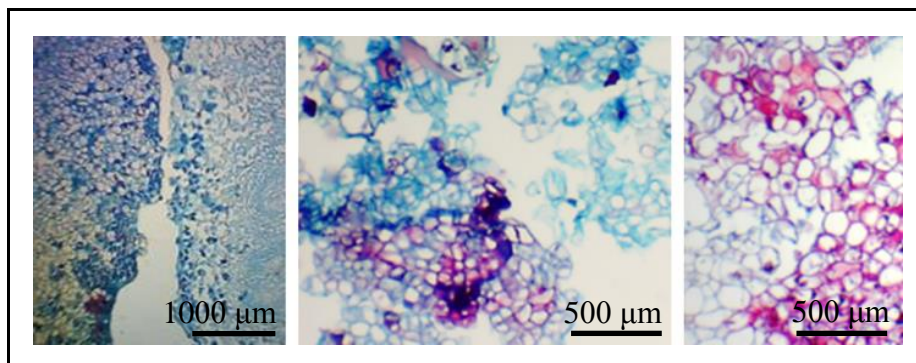
Локализација масти дала је сличан одговор као и бојење фенола. Од површина са ћелијама без нагомилавања масти, до оних на којима су масти забележене унутар ћелијског простора или изван њега (слика 56).



Слика 56. Детаљи локализације масти на пресеку споја 5.8.

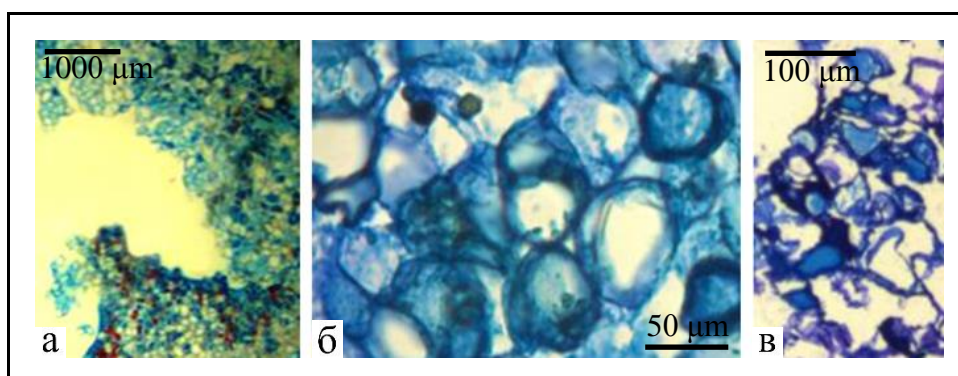
Код споја 6.8. који је формиран као друга негативна контрола на пресецима, за анализу пектина између ћелија подлоге *Pyrus communis* 'Pyrodwarf' и племке *Prunus serrulata* 'Kanzan' ни у једном делу међућелијског простора између ткива калуса нису уочене формације пектинских полисахарида. Пектини су само присутни у појединачним ћелијама калуса сваке од врста, матриксу

ћелијског зида и у ћелијама (слика 57).



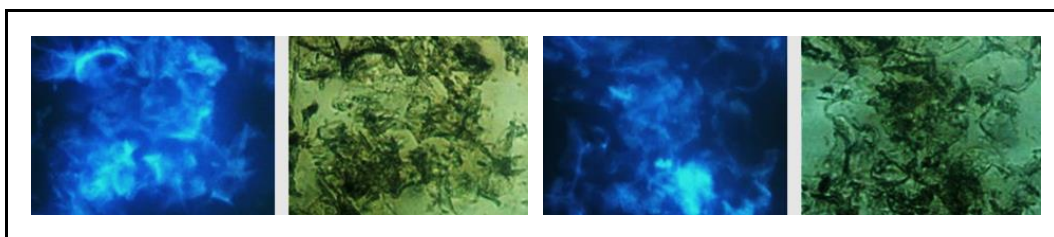
Слика 57. Пектински полисахариди нису локализовани у међућелијском простору споја 6.8.; локализовано бојењем сафранином и алцијен плавом

Процес бојења фенола резултирао је издвајањем јасно обојених зона на површинама између споја две врсте калуса. Најочљивије су издвојене површине код пресека бојених сафранином и алцијан плавом, али се и код толуидин плаве могу издвојити ћелије у којима има веће количине фенолних једињења (слика 58).



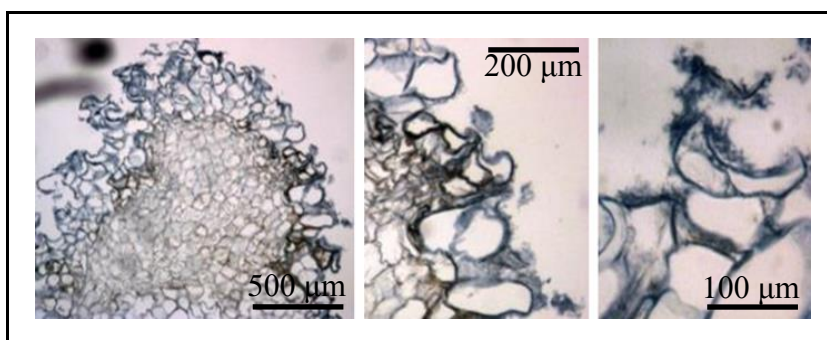
Слика 58. Појава фенола у ћелијама на споју 6.8.; а) боја сафранин и алцијен плава; б) и в) бојено толуидин плавом

Флуоресценција фенола на препаратима спојева 6.8. указује на њихову присутност у паренхимским ћелијама обе врсте. Интензитет осветљења јаче је изражен уз ћелијске зидове, али се уочава и у ширим зонама у унутрашњости (слика 59).



Слика 59. Јача аутофлуоресценција код споја 6.8.

Потврда негативне контроле споја две врсте калуса у комбинацији 6.8. има и у појави масти које су детектоване после коришћења судан црне боје (слика 60).



Слика 60. Локализација масти у ћелијама споја култивара ‘Kanzan’ и култивара крушке ‘Pyrodwarf’

4.3.3. Успешност спајања *Prunus serrulata* ‘Kiku-shidare-zakura’ са различитим врстама подлога

Две недеље од постављања комбинација спојева, у односу на контролни, хомеопластичан, спој 9.9., добијени резултати показују да је остварен слаб до делимично јак спој калуса култивара ‘Kiku-shidare-zakura’ са трешњом (табела 23).

Табела 23. Анализа варијансе и вишеструких опсега за параметре % успешних спојева и оцене јачине споја (ANOVA, $p < 0,05$, LSD тест), * постоји значајна разлика у односу на контролни спој 9.9., ns разлика није сигнификантна.

9. <i>Prunus serrulata</i> ‘Kiku-shidare-zakura’					
спој	14. дан		спој	21. дан	
	% спојених	јачина споја		% спојених	јачина споја
1.9.	35,6±4,402 *	1,00 *	1.9.	48,9±3,338 *	1,42 *
2.9.	75,9±6,650 ns	1,37 *	2.9.	86,7±8,954 ns	1,73 ns
3.9.	28,9±4,675 *	1,00 *	3.9.	44,4±5,328 *	1,11 *
4.9.	60±7,819 *	1,67 ns	4.9.	93,4±6,221 ns	1,89 ns
5.9.	55,6±2,234 *	1,22 *	5.9.	55,6±7,715 *	1,42 *
6.9.	0±0,000 *	0,00 *	6.9.	0±0,000 *	0,00 *
9.9.	88,9±3,326	1,78	9.9.	100±0,000	2,00

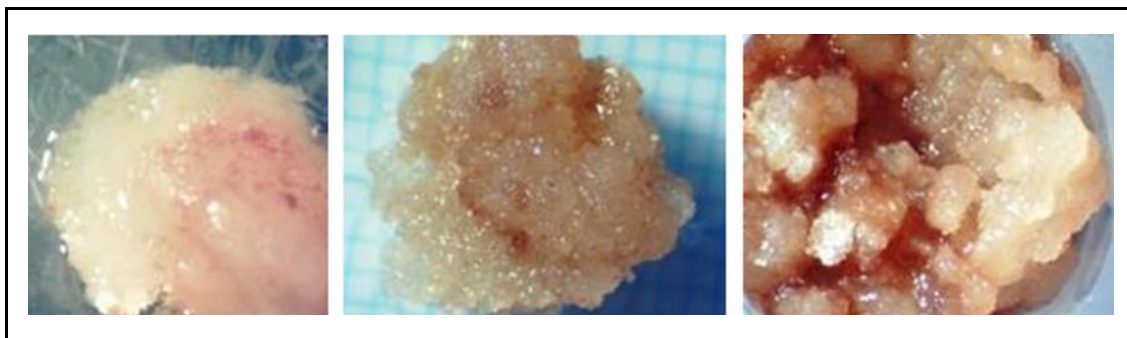
У току прве две недеље око 35% калуса су остали спојени, са укупним степеном повезаности оцењеним средње јаком везом (1,00). За продужени рок од

још 7 дана веза између калуса је оцењена бољом (1,42) на око 50 % спојева. С обзиром да је домаћа трешња најчешћа подлога за овај култивар, добијене вредности су слабије од очекиваних. Што се тиче промена које су се јављале у боји калуса, ткиво племке има карактеристично црвену нијансу калуса и она се мења временом ка тамнијим црвеним нијансама; код подлоге у року од 21 дан боја се мења незнатно у односу на почетно стање (слика 61).



Слика 61. Разлика у промени боје калуса култивара и домаће трешње (спој 1.9.)

Подаци вредни пажње су забележени за везу 2.9. Статистички значајне разлике у оцењеним параметрима нису забележене у односу на хомеопластичан спој 9.9. ни после 14. нити 21. дана, што показује да се ‘Colt’ може сматрати погодном заменом за обичну трешњу као подлогу за култивар ‘Kiku-shidarezakura’. Оцењивани параметри су: скоро 90 % успешних спојева са јачином оцењеном са 1,73. Поред тога и у случајевима када је долазило до потамњивања калуса подлоге (за коју је већ напоменуто да најинтензивније стари) спојеви су остајали чврсти (слика 62). Калус култивара ове јапанске трешње је најфибрознији и приликом манипулације спајања са овим калусом се најлакше обликује жељена форма.



Слика 62. Чврсти спојеви код комбинације 2.9.

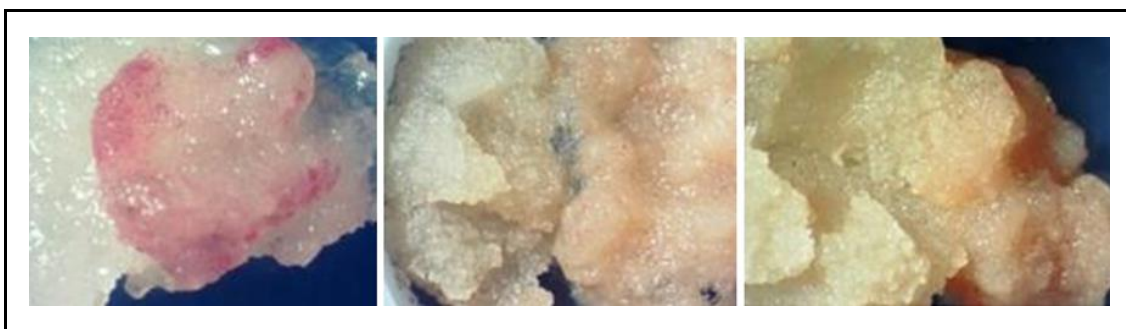
Код спојева са магривом (3.9), вредности оцењиваних параметара после 14 дана дали су најслабије резултате, који се статистички одвајају као бољи од негативне контроле инкомпатибилног споја 6.9. али и као лошији од свих осталих. На крају периода анализирања, проценат спојева оцењених као успешни расте на 44,4 % а јачина споја оцењена је са 1,11. Ове вредности се без статистички значајне разлике, сврставају у групу вредности спојева 1.9. и 5.9.

Потамњивање калуса магриве је, како је поменуто и у овом случају интензивно. У периоду од двадесет једног дана он потпуно потамни. Ипак без обзира на ову појаву, део спојева остаје чврст (слика 63).



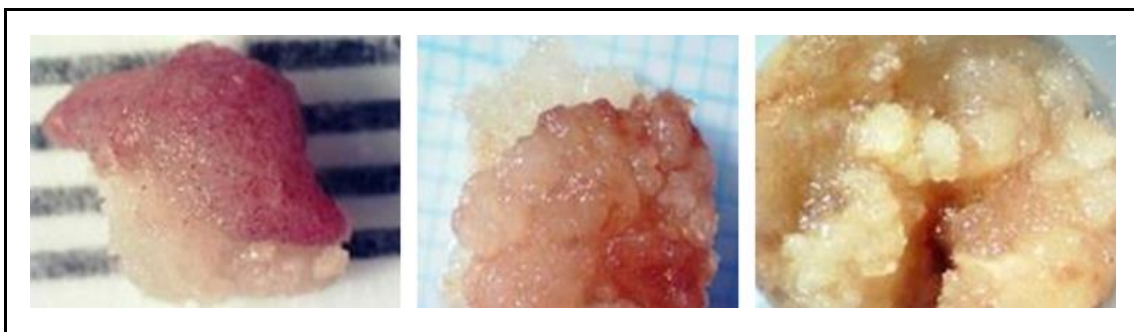
Слика 63. Интензивна промена боје калуса; поред тога остварује се чврст спој (3.9.)

Комбинација која је и пре формирања спојева сматрана компатибилном је 4.9. Спој калуса јапанске основне врсте и култивара ‘Kiku-shidare-zakura’ дао је очекивано добре резултате у свим понављањима. У првих две недеље 60 % спојених се попео на 93,4 % на крају 21. дана а јачина споја са 1,67 на 1,89 статистички се није разликовала од вредности параметара за спој 9.9. Промене боје калуса забележене су само на рачун боје калуса племке који има карактеристичне нијансе црвене боје. Ова промена није утицала на степен успешности спајања (слика 64).



Слика 64. Јак и успешан спој јапанских трешања (спој 4.9.). Калус култивара ‘Kiku-shidare-zakura’ карактеристичне црвене боје

Успостављање споја који се може сматрати компатибилним је и око 50% спојева калуса у комбинацији 5.9. И код овог спајања са врстом изабраном за негативну контролу остварен је успешан спој. Степен јачине споја са 1,22 после 14. дана порастао је на 1,44 на крају 21. дана. Разлике у нијансама црвене боје калуса племке и беле подлоге чине јасније видљивим место споја (слика 65).

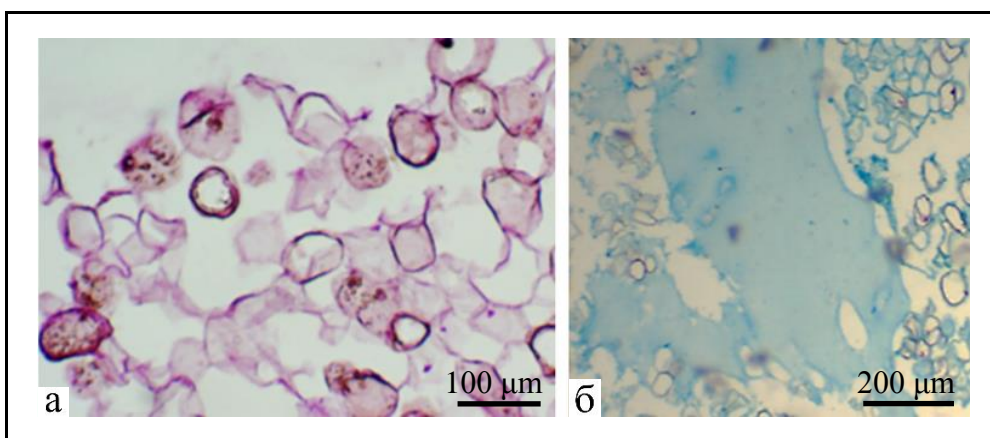


Слика 65. Разлика у боји калуса на споју јапанског култивара и касне сремзе (спој 5.9.)

Спојеви некомпатибилних калуса у комбинацији 6.9. лако су се раздвајали после 21. дана. До промене боје калуса подлоге није дошло у овом периоду, а калус култивара је задржавао карактеристичну нијансу.

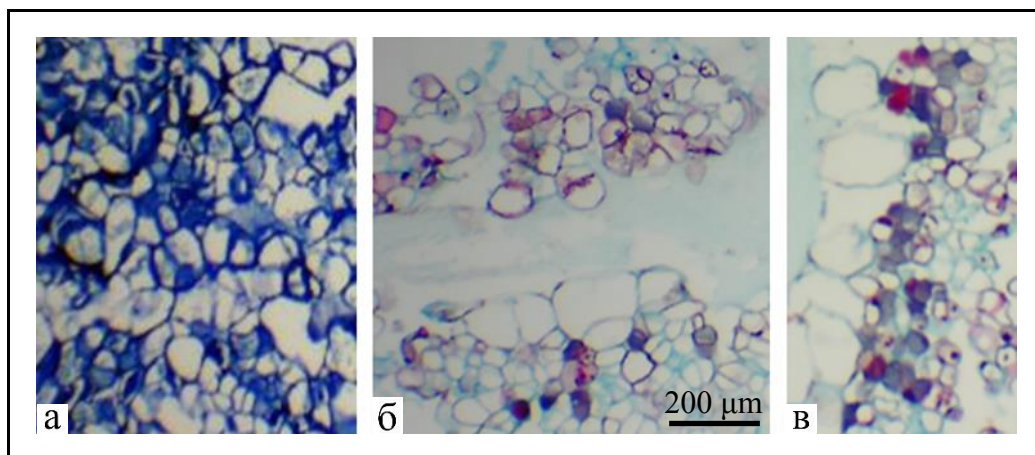
Анализа анатомских пресека

Према прегледу анатомских пресека калуса обичне трешње и култивара ‘Kiku-shidare-zakura’ – спој 1.9. бојених рутенијум ред бојом за локализацију пектина, и анцијан плаве са сафранином уочава се да поменути полисахариди учествују у сва три облика у овом споју: у ћелијском зиду граде гел – матрикс, преко површинског слоја ћелијског зида учествују и у међућелијским адхезијама, а и компонента су саме ћелије (слика 66).



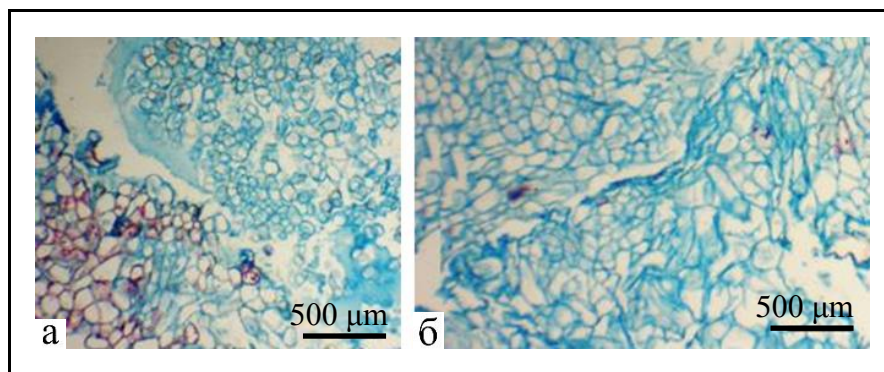
Слика 66. Појава пектинских полисахарида на споју 1.8.
а) бојено рутенијум црвеном и б) бојено сафранином и алцијен плавом

У анализи фенола код овог споја, посебну пажњу треба посветити детаљима који су уочљиви на анатомским пресецима, а тичу се локализације фенола на деловима калуса који су у споју. Појава није присутна свуда али се понавља и не треба је изузети из разматрања. У односу на спојеве култивара ‘Amanogawa’ и ‘Kanzan’ са трешњом (спојеви 1.7. и 1.8.) скупљање фенола у ћелијама споја 1.9. је интензивније (слика 67).



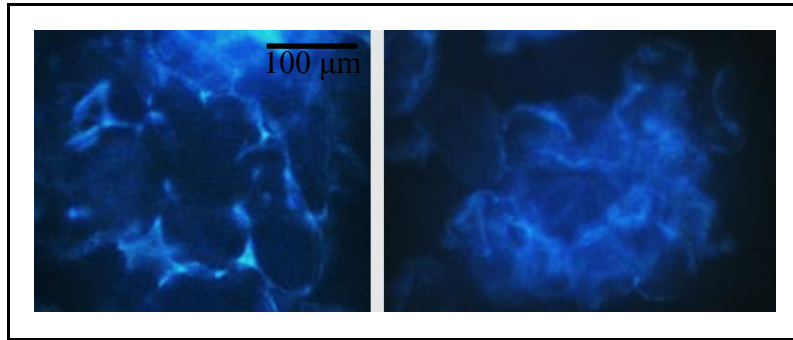
Слика 67. Делимично нагомилавање фенола уз зидове споја 1.9.
а) бојење толуидин плавом; б) и в) бојено сафранином и алцијан плавом

Поред приказаних манифестација на споју калуса ове две врсте, многи спојеви су се формирали и без присуства фенола у ћелијама (слика 68).



Слика 68. Спој 1.9. са различитим калусима: а) у подлози почиње накупљање фенола;
б) ћелије на споју без фенола; оба бојења сафранином и алцијан плавом

Аутофлуоресценцијом која је јачег интензитета, осветљене су површине уз ћелијски зид. Ни на једном пресеку није примећена јача рефлексија светлости у линији споја калуса и места нагомилавања (слика 69). Ни анализама препарата бојених суданском црном за издвајање масти нису добијени позитивни резултати.

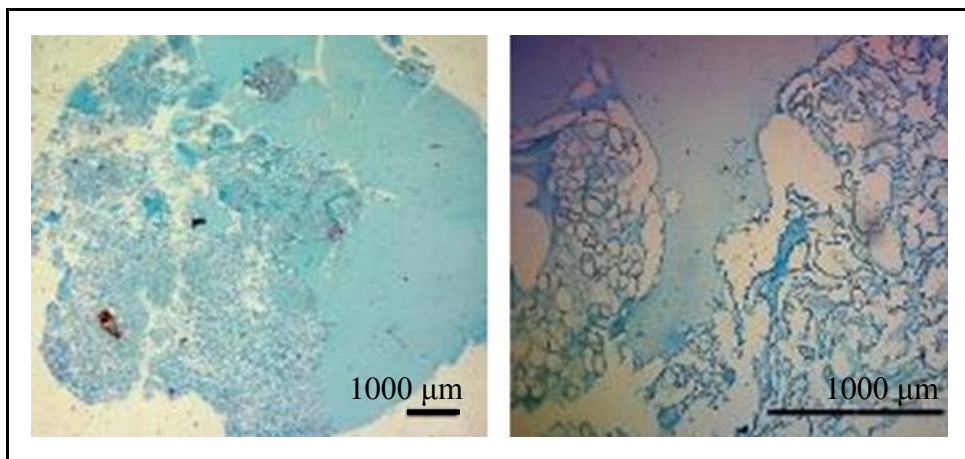


Слика 69. Аутофлуоресценција калуса у споју 1.9. без јачег интензитета осим око ћелијских зидова

Комбинацијом *Prunus serrulata* ‘Kiku-shidare-zakura’ са култиваром ‘Colt’ (2.9.) добијени су слични резултати као код споја са обичном трешњом али је код споја 2.9. присуство већег броја позитивних спојева. У локализацији пектинских полисахарида нема разлике у облику заступљености у калусу подлоге и племке. Окупљање фенолних супстанци у околини споја је приметно али је мање заступљено него у претходном случају, док у бојењу масти нису добијени детаљи који могу указивати на њихово присуство у ћелијама око споја. Ова комбинација се може сврстати у високом степену као компатибилна за култивар ‘Kiku-shidare-zakura’.

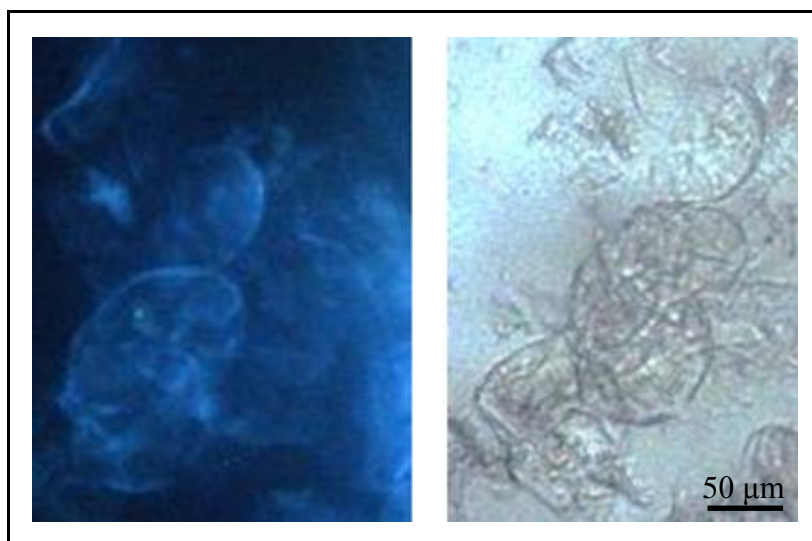
Висок степен подударности калуса и њихових спојева показују и пресеци прављени у комбинацији 4.9. (*Prunus serrulata/ Prunus serrulata* ‘Kiku-shidare-zakura’), што је био и очекиван резултат. Као и код претходна два култивара јапанских трешања спој калуса основне врсте са калусом њених култивара у *in vitro* условима указује на потпуну компатибилност ткива. На анатомским пресецима потврђена је обимност пектинских материја у ћелијама оба калуса као и у интерцелуларном простору. С друге стране, бојење фенола и масти нису дали позитиван одговор што указује да су спојеви компатибилни.

Две преостале врсте које су коришћене за подлогу поменутог култивара као негативне (инкомпатибилне) контроле дале су следеће резултате у цитолошкој анализи спојева калуса. На споју 5.9. (подлога је касна сремза – *Prunus serotina*) добијени су интересантни резултати у анатомским бојењима. Без обзира на чињеницу да је спој коришћен као негативна контрола, у бојењу пектинских полисахарида, ниједан други спој ни у једној другој комбинацији било које врсте подлоге и племке није имао тако обимну количину ексудованих пектина (слика 70).



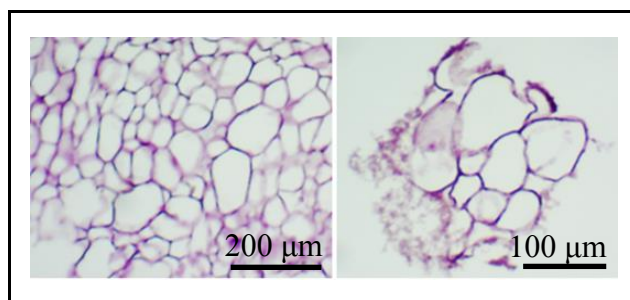
Слика 70. Пектини у већим површинама на пресеку споја калуса 5.9.; пресеци бојени сафранином и алцијан плавом

Феноли као ни масти у већој мери нису забележени на пресецима после примењених одговарајућих метода бојења. Аутофлуоресценција фенола приметна је само уз ћелијске зидове (слика 71). Изнети резултати о овом споју говоре у прилог потенцијалној компатибилности ове две врсте.



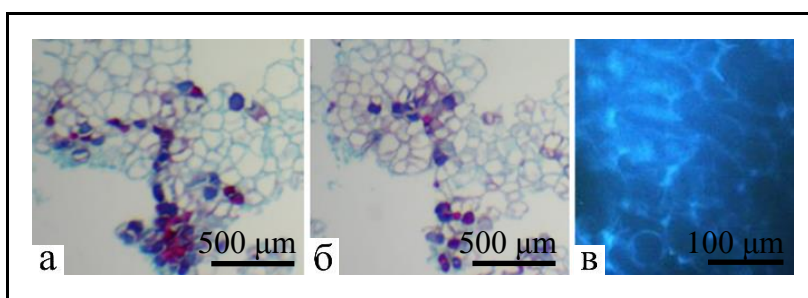
Слика 71. Аутофлуоресцирање ћелија калуса на споју 5.9.

Друга инкомпатибилна комбинација 6.9. (*Pyrus communis* 'Pyrodwarf'/*Prunus serrulata* 'Kiku-shidare-zakura'), као негативна контрола показује сличне манифестације какве су забележене код два претходна култивара. Пектини се не појављују у међућелијском простору, између ћелија различите врсте. Има их само у оквиру ћелијског зида, у већој количини код калуса подлоге. Адхезиони пектински материјал и између ћелија истог калуса такође се појављује у мањој мери (слика 72).



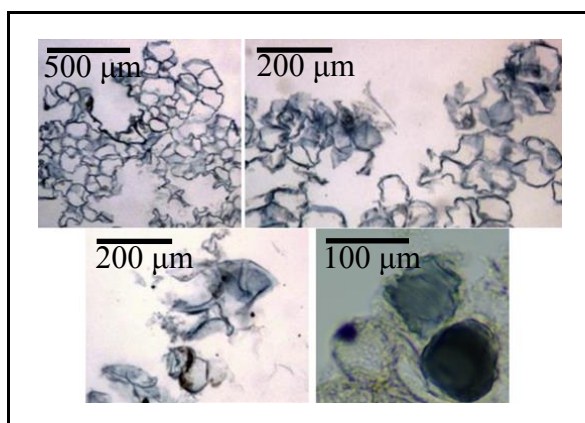
Слика 72. Слабије локализовани пектини у ћелијама калуса на споју 6.9. бојени рутенијум црвеном бојом

Феноли су локализовани на рубним деловима групација ћелија без формираног споја различитих калуса. С обзиром да је слаб степен потамњивања калуса, на пресецима нема ни јачих обојења зона у којима се види старење калуса. Флуоресценцијом су делимично осветљени ћелијски зидови без појаве јачег осветљења унутрашњег садржаја (слика 73).



Слика 73. Фенолна једињења: а) у појединачним ћелијама и б) на деловима споја; бојени сафранином и алцијан плавом в) уз зидове (јача аутофлуоресценција тих области)

Масти се у мањој мери уочавају на периферним зонама спајаних калуса и није запажена њихова већа локализација у околини споја. Појављују се унутар појединачних ћелија или уз саму ивицу ћелијског зида (слика 74).



Слика 74. Делимична локализација масти унутар појединачних ћелија или уз саму ивицу ћелијског зида

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

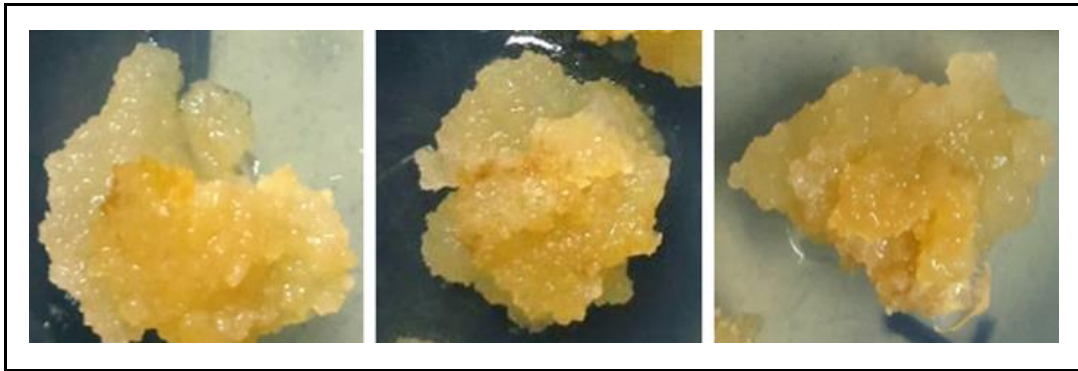
Према резултатима добијеним после *in vitro* спајања калуса врсте *Prunus serrulata* као посредника, са калусом подлоге обичне трешње, култивара 'Colt' и касне сремзе, компатибилан спој калуса је остварен са калусима трешања и делимично са сремзом (табела 24).

У првих 14 дана на спојевима 1.4. средње вредности параметара се статистички не разликује од хомеопластичног споја 4.4; на крају огледа, вредност за проценат успешних спојева је близу 95 % а јачина споја је 1,73 (значајна разлика постоји). Код споја 2.4. добијен је по статистичкој значајности слабији резултат за проценат успешних спојева али се по јачини споја разлике не бележе као статистички значајне после 14 дана. Јачина везе је иста као на споју 2.4. али је проценат успешности формирања споја за 20 % нижи. Ипак, после 21. дана код овог споја се појављују разлике у односу на спој 4.4. које су на значајном нивоу. Спојеви са касном сремзом се према добијеним вредностима у оба периода и за оба параметра сврставају у групу статистички слабијих резултата у односу на контролни спој 4.4. У оба периода мерења параметара, не повећава се број успешних спојева.

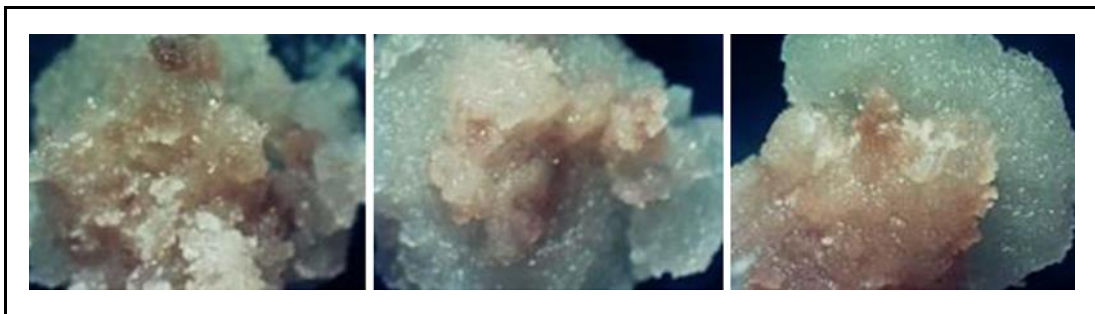
Табела 24. Анализа варијансе и вишеструких опсега за параметре % успешних спојева и оцене јачине споја (ANOVA, $p < 0,05$, LSD тест), * постоји значајна разлика у односу на контролни спој 4.4., ns разлика није сигнификантна.

4. <i>Prunus serrulata</i>					
спој	14. дан		спој	21. дан	
	% спојених	јачина споја		% спојених	јачина споја
1.4.	75,9±5,278 ^{ns}	1,22 ^{ns}	1.4.	93,4±7,714 ^{ns}	1,73 [*]
2.4.	60±7,741 [*]	1,11 ^{ns}	2.4.	73,4±5,760 [*]	1,73 [*]
5.4.	37,7±5,502 [*]	1,00 [*]	5.4.	37,7±4,118 [*]	1,00 [*]
4.4.	84,5±6,612	1,42	4.4.	100±0,000	2,00

Драстични степен потамњивања калуса и формирање јасно видљиве линије између спојева није забележено ни у једној комбинацији у периоду од 21 дан. Промена боје калуса ка тамнијој нијанси благо је јача на калусу таксона подлога у односу на калус *Prunus serrulata* (слике 75 и 76).

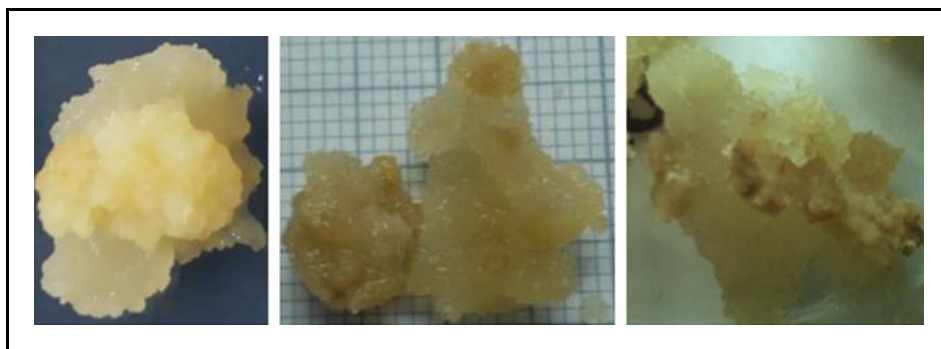


Слика 75. Калус у споју јапанске и обичне трешње (спој 1.4.)



Слика 76. Калус јапанске трешње у споју са 'Colt' (спој 2.4.)

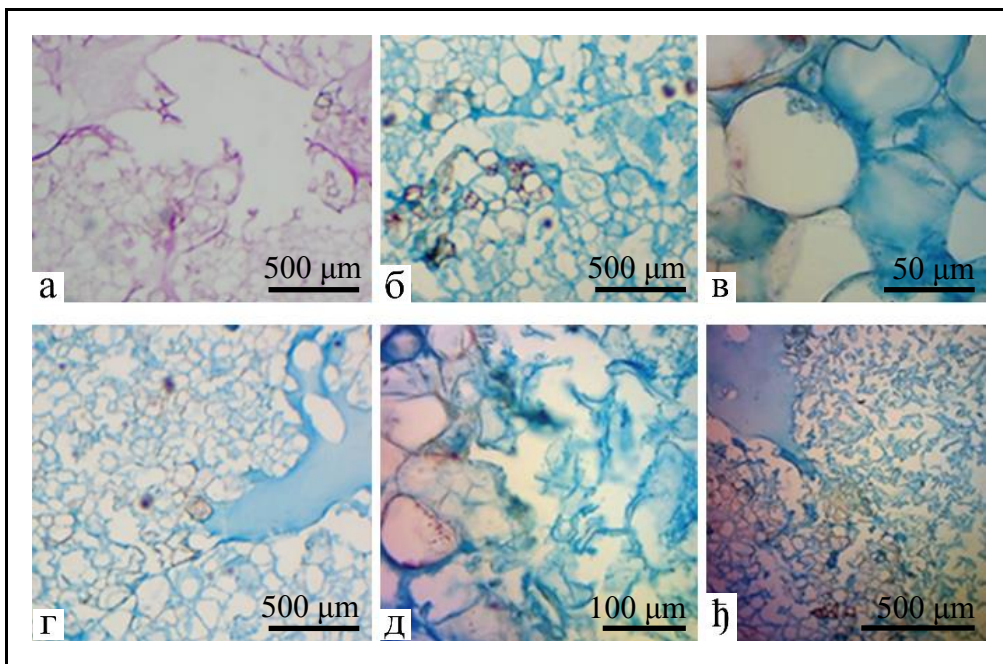
На комбинацији 5.4. у средини виде се и одвојени делови калуса неуспелих спојева (слика 77).



Слика 77. Спој јапанске трешње и касне сремзе (спој 5.4)

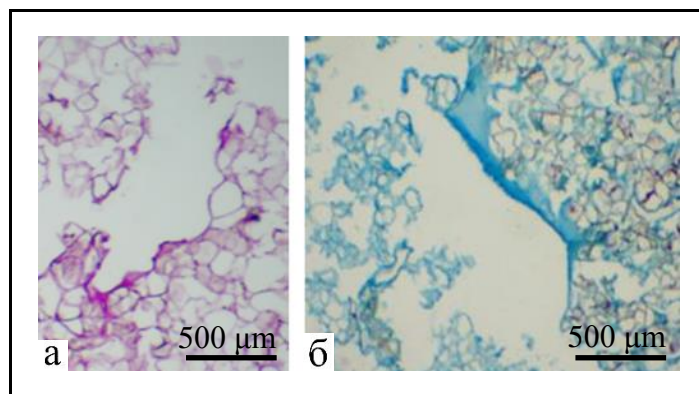
Као ни код претходних комбинација спојева, потамњивање калуса није имало утицај на јачину споја као и на успешно успостављање споја.

На хистолошким пресецима спојева 1.4., 2.4. и 5.4. нису запажене специфичности које се нису јавиле у досадашњим анализама спојева. Пектински полисахариди карактеристично се јављају у сва три облика: у јачем обиму у интерцелуларним шупљинама и широком ободу око ћелијских зидова калуса и једне и друге врсте, код спојева 1.4. и 2.4. (слика 78).



Слика 78. Локализација пектина на спојевима 1.4. (а,б,в) и споју 2.4. (г,д њ)

На пресецима споја 5.4. пектина има у адхезионом слоју између ћелија исте врсте али су приметни у мањој мери у додирним зонама калуса различитих врста (слика 79).



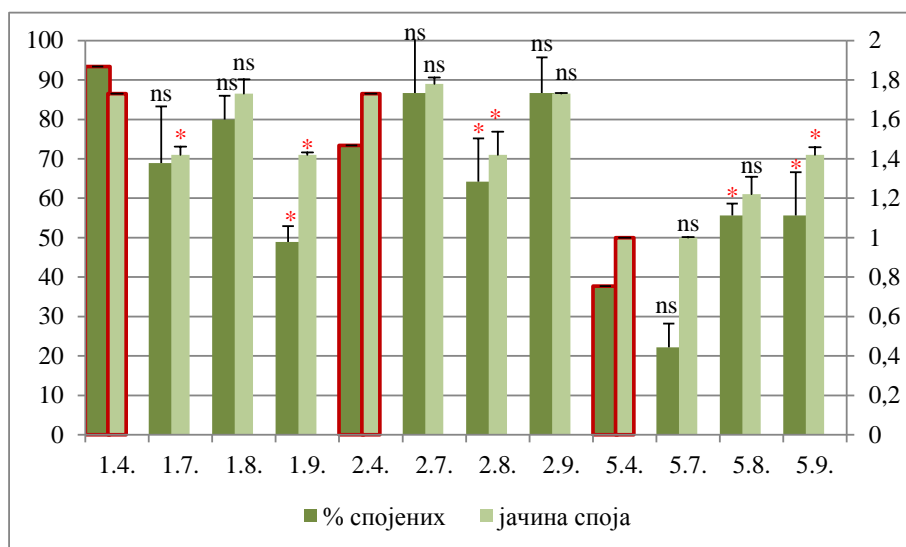
Слика 79. Присуство пектина у спојевима јапанске трешње и касне сремзе, спој 5.4.
а) бојење рутенијум црвеном бојом б) бојење сафранином и алцијан плавом

Феноли нису присутни ни у једној комбинацији спојева у већој мери што је потврђено обема методама бојења односно аутофлуоресценцијом. Исти одговор добијен је и на пресецима бојеним за детекцију масти.

Ако се спојеви 1.4., 2.4. и 5.4. узму као контролни, а остали спојеви као зависне променљиве, однос средњих вредности параметара % спојених и степена приказаних на графикону 33 указују на могућност коришћења врсте *Prunus*

serrulata као потенцијалног посредника у калемљењу јапанских украсних трешања на најчешће коришћене подлоге код нас.

Графикон 33. Процента успешних спојева (примарна апсцисна оса) и оцене јачине споја (секундарна апсцисна оса) за јапанску трешњу као посредника у калемљењу. Вредности параметара за спојеве 1.4., 2.4. и 5.4. (уоквирени црвеном бојом) су контролне вредности (ANOVA, $p < 0,05$, LSD тест); * постоји значајна разлика у односу на контролне спојеве; ns разлика није сигнификантна



За култивар ‘Kiku-shidare-zakura’ према анализи за оба мерена параметра, при калемљењу на обичну трешњу могуће је користити за посредника врсту *Prunus serrulata*. Код култивара ‘Amanogawa’ с обзиром да не постоје статистички значајна разлика у проценту успеха спајања, али се контакт који остварују *Prunus avium/Prunus serrulata* статистички одваја као јачи и у овој комбинацији је могуће коришћење јапанске основне форме као посредника.

Резултати добијени са култиваром ‘Colt’ као подлогом за калемљење су веома добри код култивара ‘Amanogawa’ и ‘Kiku-shidare-zakura’ и у овој комбинацији нема потребе за калемљењем са посредником, али према добијеним резултатима могуће је испитати успешност калемљења култивара ‘Kanzan’ на подлогу ‘Colt’ са уметањем основне врсте јапанске трешње као посредника.

Резултати добијени са касном сремзом као подлогом у комбинацији 5.4. су статистички значајно слабији од оних добијених са спојевима касне сремзе и два култивара јапанских трешања (спој 5.8 и 5.9.), док се резултати на споју 5.7. без статистичких разлика у односу на поменуто контролу (5.4.). Ови резултати указују на неоправданост коришћења касне сремзе као посредника при калемљењу.

4.4. АНАЛИЗА САДРЖАЈА УКУПНИХ ФЕНОЛА (TPC) И АНТИОКСИДАТИВНЕ АКТИВНОСТИ (RSA)

Резултати добијени анализом садржаја укупних фенола у екстракту (g GAE/kg свежје масе – св.м) указују да је количина ових једињења зависила од комбинације споја две врсте калуса (табела 25).

Табела 25. Анализа варијансе и вишеструких опсега средњих вредности садржаја укупних фенола TPC (g GAE/kg) и антиоксидативне активности RSA (mmol TE/kg) екстракта свежје масе калуса хомео (назначени сивом нијансом у табели) и хетеропластичних спојева (ANOVA, $p < 0,05$, LSD тест). Вредности са значајном статистичком разликом у односу на хомеопластични спој означене су *, без статистички значајне разлике са ns.

СПОЈ		TPC		RSA	
ознака	врста	(g GAE/kg)	std	(mmol TE/kg)	std
1.1.	avium/avium	0,28	± 0,007	5,59	± 0,124
1.4.	avium/serrulata	0,75 *	± 0,012	6,43 *	± 0,114
1.7.	avium/'Amanogawa'	0,42 *	± 0,004	5,96 ^{ns}	± 0,055
1.8.	avium/'Kanzan'	0,65 ^{ns}	± 0,000	6,42 *	± 0,020
1.9.	avium/'Kiku shidare'	0,54 ^{ns}	± 0,002	6,38 *	± 0,001
2.2.	Colt/'Colt'	0,51	± 0,017	11,30	± 0,106
2.4.	Colt/serrulata	1,49 *	± 0,009	10,20 *	± 0,111
2.7.	Colt/'Amanogawa'	0,21 *	± 0,007	5,96 *	± 0,024
2.8.	Colt/'Kanzan'	1,45 *	± 0,012	9,58 *	± 0,001
2.9.	Colt/'Kiku shidare'	1,17 *	± 0,001	9,92 *	± 0,138
3.3.	mahaleb/mahaleb	3,77	± 0,032	11,79	± 0,191
3.1.	mahaleb/avium	2,64 *	± 0,038	12,90 *	± 0,000
3.4.	mahaleb/serrulata	4,56 *	± 0,017	10,40 *	± 0,443
3.7.	mahaleb/'Amanogawa'	4,24 *	± 0,172	12,88 *	± 0,021
3.8.	mahaleb/'Kanzan'	2,27 *	± 0,065	13,58 *	± 0,160
3.9.	mahaleb/'Kiku shidare'	2,42 *	± 0,003	12,46 *	± 0,083
4.4.	serrulata/serrulata	0,43	± 0,020	3,33	± 0,037
4.7.	serrulata/'Amanogawa'	0,66 *	± 0,002	3,43 ^{ns}	± 0,013
4.8.	serrulata/'Kanzan'	0,58 ^{ns}	± 0,001	3,35 ^{ns}	± 0,033
4.9.	serrulata/'Kiku shidare'	0,68 *	± 0,004	3,45 ^{ns}	± 0,007
5.5.	serotina/serotina	0,19	± 0,001	5,78	± 0,000
5.4.	serotina/serrulata	0,25 ^{ns}	± 0,005	6,06 ^{ns}	± 0,088
5.7.	serotina/'Amanogawa'	0,47 *	± 0,008	6,24 *	± 0,024
5.8.	serotina/'Kanzan'	0,35 *	± 0,005	6,46 *	± 0,164
5.9.	serotina/'Kiku shidare'	0,35 *	± 0,009	6,85 *	± 0,123
6.6.	pyrus/pyrus	0,61	± 0,008	5,13	± 0,084
6.4.	pyrus/serrulata	1,17 *	± 0,021	7,12 *	± 0,057
6.7.	pyrus/'Amanogawa'	0,41 *	± 0,003	6,27 *	± 0,091
6.8.	pyrus/'Kanzan'	1,26 *	± 0,000	8,04 *	± 0,400
6.9.	pyrus/'Kiku shidare'	1,34 *	± 0,030	5,68 *	± 0,161
7.7.	Amanogawa/'Amanogawa'	0,56	± 0,003	3,59	± 0,005
8.8.	Kanzan/'Kanzan'	0,63	± 0,007	5,23	± 0,033
9.9.	Kiku shidare/'Kiku shidare'	0,55	± 0,008	3,30	± 0,013

Садржај укупних фенола је варирао од најнижих вредности које су забележене на спојевима са касном сремзом (од 0,19 g GAE/kg на хомеопластичном споју 5.5. до 0,47 g GAE/kg на споју 5.7.) до највиших, забележених на спојевима са магривом (од 2,27 до 4,54 g GAE/kg). Код спојева са обичном трешњом, вредност за ТРС на хомеопластичном споју је најнижа и износи 0,28 g GAE/kg, а бележи се пораст на спојевима са јапанским трешњама ('Amanogawa' 0,42; 'Kanzan' 0,65 и 'Kiku-shidare-zakura' 0,54 g GAE/kg). Најуједначенији однос садржаја укупних фенола забележен је код спојева јапанских украсних култивара са таксоном *Prunus serrulata*. На спојевима са подлогама 'Colt' и 'Pyrodwarf' забележен је значајни пораст садржаја укупних фенола на свим спојевима у односу на хомеопластичне, осим код споја са култиваром 'Amanogawa', где је код обе поменуте комбинације дошло до значајног смањења садржаја укупних фенола. Како повећање садржаја фенола у ткивима упућује на одговор биљке на стрес, анализом промене садржаја укупних фенола у хетеропластичним спојевима издвојене су комбинације код којих је уочено повећање, смањење или стање без промене у односу на контролне хомеопластичне спојеве. Смањење садржаја укупних фенола забележено је код култивара 'Amanogawa' са обичном трешњом, култиварима 'Colt', 'Pyrodwarf' и делимично са касном сремзом. У споју са магривом и јапанском трешњом укупни садржај фенола бележи благ раст. Култивар 'Kanzan' у споју са обичном и јапанском трешњом мења садржај укупних фенола у количинама које се не вреднују као статистички значајне (0,65 и 0,58 g GAE/kg св.м). Спојеви на којима се за овај култивар бележи значајно повећање садржаја укупних фенола у односу на обе контролне групе хомеопластичних спојева су 2.8. и 6.8., а они на којима је забележен пораст у односу на једну од контролних спојева, су спојеви са сремзом и магривом (5.8. и 3.8.). Сличан распоред средњих вредности за укупан садржај фенола показују комбинације спојева са култиваром 'Kiku-shidare-zakura'; разлика у односу на претходни култивар јавља се само код споја са јапанском трешњом где је забележен благи пораст (0,68 у односу на 0,43 и 0,55 g GAE/kg св.м).

Из екстракта добијеног из хомеопластичних и хетеропластичних спојева калуса анализирана је антиоксидативна активност (RSA) и тестирана способност уклањања DPPH радикала. Способност 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил радикала

да реагује са донорима водоника (фенолна једињења у екстракту) квантитативно се оцењује кроз DPPH тест. Стабилни DPPH радикал снажно апсорбује у видљивом спектру на 515 nm, а везивање водоника до којег долази по додавању антиоксиданта/редукујућег агенса, резултује у смањењу апсорбанције на поменутој таласној дужини. Резултати приказани у табели 24 указују на утврђене статистички значајне разлике ($p < 0,05$) између одређеног споја и одговарајућих хомеопластичних контролних узорака. Разлике које су се издвојиле као статистички значајне у смеру повећања антиоксидативности у односу на оба контролна споја су забележене на: 1.4., 1.8., 1.9., свим комбинацијама са *P. mahaleb* (3.1., 3.7., 3.8., и 3.9.), *P. serotina* (5.7., 5.8., и 5.9.) и 6.7. и 6.8. Спојеви код којих није дошло ни до значајног смањења, нити повећања антиоксидативне активности (без појаве значајности у разликама, означени ns) су спојеви 1.7., 4.7., 4.8., 4.9. и 5.4., док је код осталих разлика забележена у односу на један од хомеопластичних спојева који су чинили контролу за дати спој. То су све комбинације на 'Colt' (2.4., 2.7., 2.8., 2.9.), 3.4. и 6.9. Највишу антиоксидативну активност показали су екстракти спојева са магривом (12,34 mmolTE/kg), а најмању са *P. serrulata* (3,39 mmolTE/kg). Антиоксидативна активност је опадала по следећем редоследу спојева са: *P. mahaleb* > *P. 'Colt'* > *Pyrus 'Pyrodwarf'* > *P. serotina* > *P. avium* > *P. serrulata*.

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

односа повезаности између вредности ова два параметра ($p = 0,09$ и $0,706$ по редоследу).

Анализом вредности укупних фенола добијених за хомеопластичне спојеве ‘Amanogawa’, ‘Kanzan’ и ‘Kiku-shidare-zakura’ и вредности добијених на спојевима са различитим подлогама (хетеропластични спојеви), добијен је резултат који показује односе са или без статистички значајних разлика (табела 26).

Табела 26. Анализа варијансе и вишеструких опсега средњих вредности садржаја укупних фенола ТСА (g GAE/kg) у спојевима култивара ‘Amanogawa’, ‘Kanzan’ и ‘Kiku-shidare-zakura’ са одређеном подлогом (ANOVA, $p < 0,05$, LSD тест). Вредности са значајном статистичком разликом у односу на хомеопластични спој означене су *, без разлике ns.

<i>P. serrulata</i> 'Amanogawa'		<i>P. serrulata</i> 'Kanzan'		<i>P. serrulata</i> 'Kiku shidare'	
спој	ТСА g GAE/kg	спој	ТСА g GAE/kg	спој	ТСА g GAE/kg
2.7.	0,21 * \pm 0,005	5.8.	0,36 * \pm 0,005	5.9.	0,36 * \pm 0,005
6.7.	0,42 * \pm 0,005	4.8.	0,58 ^{ns} \pm 0	1.9.	0,54 ^{ns} \pm 0,005
1.7.	0,43 ^{ns} \pm 0,005	8.8.	0,63 \pm 0,005	9.9.	0,56 \pm 0,005
5.7.	0,48 ^{ns} \pm 0,005	1.8.	0,65 ^{ns} \pm 0	4.9.	0,69 ^{ns} \pm 0,005
7.7.	0,56 \pm 0,005	6.8.	1,26 * \pm 0	2.9.	1,17 * \pm 0,005
4.7.	0,67 ^{ns} \pm 0,005	2.8.	1,45 * \pm 0,005	6.9.	1,34 * \pm 0,02
3.7.	4,24 * \pm 0,12	3.8.	2,28 * \pm 0,045	3.9.	2,43 * \pm 0,005

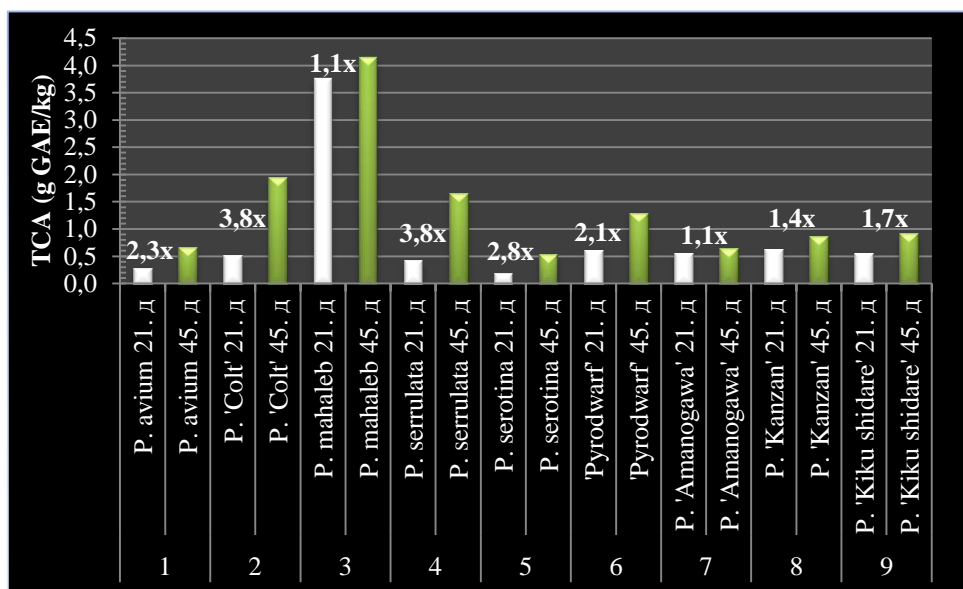
Према распоређивању вредности за сва три култивара, спојеви са обичном и јапанском трешњом у количини укупних фенола не показују значајне разлике у односу на контролне хомеоспојеве. Код култивара ‘Amanogawa’, у групу несигнификантних разлика улази и вредност добијена на споју са касном сремзом.

За свих 9 култивара и врста, поред вредности које су приказане (које су мерене после 21 дан), одређен је садржај укупних фенола на екстрактима калуса хомеоспојева и после 45. дана, чиме је утврђен степен пораста количине фенола зависно од времена. Како се старењем калуса у њему повећава садржај фенолних једињења, анализом се покушало утврдити да ли постоји разлика у променама на овом нивоу. На графикону 34 су приказани резултати односа садржаја укупних фенола после 21. и 45. дана.

За калус врсте *Prunus mahaleb* и *P. serrulata* ‘Amanogawa’ количина укупних фенола се мења незнатно до 45. дана (1,1 пут у односу на мерење 21. дана), осим што је апсолутни садржај ТСА код магриве висок у оба мерења.

Вредност повећања садржаја укупних фенола повећава се за 0,3 до 0,4 за култиваре и врсте редом: *P. serrulata* ‘Kanzan’ (1,4x), ‘Kiku-shidare-zakura (1,7x)’, *Pyrus* ‘Pyrodwarf’ (2,1x), *Prunus avium* (2,3x). Код *Prunus* ‘Colt’ и *Prunus serrulata* забележено је повећање за око 3,8 пута. Добијени резултати могу се поредити и са променама у боји калуса који су приказани у поглављу 3.2.5.1. Калус магриве од момента формирања споја има нијансу тамно браон боје, док се код култивара ‘Colt’, она најинтензивније мења у периоду после 20. дана. Приказани резултати ТСА за култивар ‘Kiku-shidare-zakura’ не указује на видне промене боје калуса које су јасно евидентирани у појачаној нијанси црвене.

Графикон 34 . Однос садржаја укупних фенола за свих 9 таксона, после 21. и 45. дана



4.5. АНАЛИЗА САДРЖАЈА ПОЈЕДИНАЧНИХ ПОЛИФЕНОЛА У СПОЈЕВИМА РАЗЛИЧИТИХ КОМБИНАЦИЈА КАЛУСА

Табела 27. Идентификација и квантификација фенолних једињења у екстрактима калуса хомео и хетеропластичних спојева;
н.д. - није детектовано присуство; 1. флавоноиди: 1а. флавоноли, 1б. флаволи, 1в. флаванони; 2. дихидрохалкони; 3. фенолне киселине
фенолна једињења

фенолна једињења		спојеви калуса																
mg/L		1.1.	1.4.	1.7.	1.8.	1.9.	2.2.	2.4.	2.7.	2.8.	2.9.	3.3.	3.1.	3.4.	3.7.	3.8.	3.9.	
1	Ескулин (Aesculin)	0,285	0,353	0,273	0,311	0,304	0,145	0,322	0,227	0,379	0,438	0,923	0,198	0,273	0,243	0,457	0,22	
	Катехин (Catehin)	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	1,405	н.д.	1,293	1,365	2,914	н.д.	н.д.	1,162	2,195	н.д.	
	Кверцетин (Quercetin)	0,044	0,038	0,071	0,058	0,046	н.д.	0,06	0,035	0,162	0,196	0,115	0,058	0,101	0,061	0,073	0,057	
	1а Рутин (Quercetin_3-O-rutinoside)	0,285	0,294	0,283	0,291	0,299	0,279	0,285	н.д.	0,288	0,288	0,289	0,286	0,283	0,283	0,29	0,29	
	Хиперозид (Quercetin_3-O-galactoside)	0,105	0,105	0,088	0,102	0,105	0,076	0,163	0,081	0,168	0,128	0,15	0,097	0,097	0,095	0,13	0,092	
	Астрагалин (Kaempferol_3-O-glucoside)	0,031	н.д.	н.д.	0,032	0,032	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
	Кемферол (Kaempferol)	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	0,359	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
	Цинарозид (Luteolin_7-O-glucoside)	0,258	0,626	0,583	0,733	1,453	0,518	1,579	0,69	1,659	1,398	9,743	1,996	4,335	3,391	4,881	2,446	
	Апигетрин (Apigenin_7-O-glucoside)	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,015	0,013	0,016	0,014	0,025	0,013	0,013	0,013	0,019	0,013	
	1б	Апин (Apigenin_7-O-apioglucoside)	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	0,061	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
Лутеолин (Luteolin)	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	0,175	н.д.	н.д.	н.д.	0,212	0,338	0,211	н.д.	0,25	0,187	0,173	0,193		
Апигенин (Apigenin)	н.д.	н.д.	0,001	н.д.	н.д.	н.д.	0,006	н.д.	0,013	0,006	0,179	0,007	0,035	0,023	0,089	0,023		
Баикалеин (Baicalein)	0,027	0,036	0,04	0,054	0,045	0,033	0,06	0,047	0,147	0,156	0,09	0,044	0,082	0,058	0,063	0,057		
1в	Нарингенин (Naringenin)	0,048	0,058	0,062	0,079	0,067	0,052	0,085	0,07	0,185	0,197	0,122	0,068	0,113	0,086	0,091	0,082	
2	Флоризин (Phlorizin)	н.д.	0,046	0,03	0,051	0,052	0,03	0,114	0,036	0,118	0,08	0,261	0,048	0,089	0,085	0,154	0,061	
3	р-Кумаринска кис. (p-Coumaric_acid)	0,146	0,078	0,216	0,127	0,147	0,064	н.д.	0,08	0,066	0,149	0,194	0,106	0,373	0,191	0,097	0,171	
	Кофеинска кис. (Caffeic_acid)	0,39	0,372	0,398	0,376	0,367	н.д.	н.д.	н.д.	0,367	0,372	0,37	н.д.	0,371	0,364	0,364	н.д.	
	Ферулинска кис. (Ferulic_acid)	0,101	0,054	0,127	0,067	0,059	н.д.	н.д.	0,044	н.д.	0,078	0,065	0,045	0,07	0,052	0,043	0,048	
	Елагинска кис. (Ellagic_acid)	0,018	н.д.	0,015	0,009	н.д.	0,015	н.д.	н.д.	0,015	0,019	н.д.	0,01	н.д.	0,007	н.д.	н.д.	
	Синапинска кис. (Sinapic_acid)	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	0,255	0,266	0,513	н.д.	н.д.	0,247	н.д.	н.д.	н.д.	
	Неохлорогена кис. (5-O-Caffeoylquinic_acid)	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	

наставак Табеле 27. Идентификација и квантификација фенолних једињења у екстрактима калуса хомео и хетеропластичних спојева; н.д. - није детектовано присуство; 1. флавоноиди: 1а. флавоноли, 1б. флаволи, 1в. флаванони; 2. дихидрохалкони; 3. фенолне киселине

фенолна једињења		спојеви калуса																	
mg/L		4.4.	4.7.	4.8.	4.9.	5.5.	5.4.	5.7.	5.8.	5.9.	6.6.	6.4.	6.7.	6.8.	6.9.	7.7.	8.8.	9.9.	
1а	Ескулин (Aesquelin)	0,255	0,25	0,268	0,262	0,223	0,313	0,3	0,295	0,384	0,24	0,15	0,184	0,345	0,189	0,23	0,491	0,478	
	Катехин (Catehin)	н.д.	1,209	1,251	1,207	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	2,218	н.д.	1,269	2,519	1,173	
	Кверцетин (Quercetin)	0,036	0,037	0,035	0,048	н.д.	н.д.	0,043	0,03	0,039	0,147	0,035	0,29	0,057	0,065	0,037	0,044	0,052	
	Рутин (Quercetin_3-O-rutinoside)	0,292	0,299	0,29	0,295	0,284	0,288	0,294	0,287	0,289	0,323	н.д.	0,296	0,305	0,28	0,296	0,305	0,305	
	Хиперозид (Quercetin_3-O-galactoside)	0,098	0,097	0,099	0,112	0,1	0,103	0,113	0,102	0,106	0,197	0,081	0,114	0,149	0,082	0,098	0,116	0,099	
	Астрагалин (Kaempferol_3-O-glucoside)	0,032	н.д.	0,032	0,032	0,031	0,031	н.д.	0,031	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	0,032	н.д.	0,032
	Кемферол (Kaempferol)	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
1б	Цинарозид (Luteolin_7-O-glucoside)	0,618	0,664	0,902	0,833	0,202	0,545	0,741	0,483	0,804	н.д.	0,245	0,325	0,951	0,421	1,014	1,003	1,095	
	Апигетрин (Apigenin_7-O-glucoside)	0,012	0,012	0,013	0,013	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,014	0,012	0,013	0,017	0,012	0,012	0,013	0,012	
	Апин (Apigenin_7-O-apioglucoside)	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
	Лутеолин (Luteolin)	н.д.	н.д.	н.д.	0,154	н.д.	н.д.	0,161	н.д.	0,227	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	0,193	0,162	н.д.	0,159	
	Апигенин (Apigenin)	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
1в	Банкалеин (Baicalein)	0,035	0,034	0,032	0,039	0,024	0,026	0,043	0,027	0,047	0,034	0,026	0,037	0,047	0,044	0,042	0,031	0,033	
2	Нарингенин (Naringenin)	0,057	0,055	0,054	0,063	0,044	0,047	0,067	0,049	0,071	0,056	0,047	0,058	0,07	0,069	0,065	0,052	0,054	
3	Флоризин (Phlorizin)	0,047	0,055	0,06	0,055	н.д.	0,039	0,045	0,037	0,037	0,028	0,027	н.д.	0,072	0,029	0,062	0,084	0,045	
3	р-Кумаринска кис. (p-Coumaric_acid)	0,066	н.д.	н.д.	0,066	0,086	0,085	0,153	0,082	0,151	0,064	0,062	0,063	0,075	0,133	0,064	0,063	0,091	
	Кофеинска кис. (Caffeic_acid)	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	0,365	0,366	0,374	0,366	0,371	0,372	н.д.	н.д.	н.д.	0,365	н.д.	н.д.	н.д.	
	Ферулинска кис. (Ferulic_acid)	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	0,047	0,045	0,11	0,044	0,085	0,067	н.д.	0,041	н.д.	0,048	н.д.	н.д.	0,049	
	Елагинска кис. (Ellagic_acid)	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	0,011	н.д.	н.д.	0,007	
	Синапинска кис. (Sinapic_acid)	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	0,279	0,966	н.д.	0,333	0,265	0,292	н.д.	н.д.	0,305	
	Неохлорогена кис. (5-O-Caffeoylquinic_acid)	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	0,845	0,296	0,533	0,386	0,298	н.д.	н.д.	н.д.	

У екстрактима калуса хомео и хетеропластичних спојева добијених помоћу киселог ацетона идентификовано је и квантификовано 21 фенолно једињење. Детектовани су представници пет класа фенолних једињења (табела 26): три класе флавоноида (флавоноли, флавони и флаванони), један дихидрохалкон и шест фенолних киселине (све из групе хидроксициметних киселина). Од флавонола присутни су: ескулин, катехин, кверцетин, рутин (Quercetin 3-O-rutinoside), хиперозид (Quercetin 3-O-galactoside), астрагалин (Kaempferol 3-O-glucoside) и кемферол, од којих су на свим спојевима у различитим концентрацијама детектовани ескулин, рутин и хиперозид. Ескулин се јавља у количинама које варирају од 0,145 mg/L код хомеоспоја 'Colt' (2.2.) до 0,923 mg/L на магриви (3.3.). Количине овог флавонола опадају у спојевима калуса 'Amanogawa', 'Kanzan' и 'Kiku-shidare-zakura' на свим подлогама осим споја 5.7. и 5.4. Количина рутина је детектована у веома малим одступањима у односу на све узорке (од 0,279 mg/L до 0,323 mg/L) и није забележен већи пад или пораст на спојевима култивара и врста подлога. Хиперозид опада или остаје у истим концентрацијама на свим хетероспојевима осим код спојева са култиваром 'Colt'. Астрагалин, у узорцима у којима је детектован има приближно исту концентрацију (0,032 и 0,031 mg/L) и јавља се у спојевима 'Kanzan'/касна сремзе и код сва три култивара са обичном и јапанском трешњом. Кемферол је детектован само код магриве са процентуалним уделом од 2,2 % у односу на укупну количину полифенола. На одређеном броју хетероспојева (2.4., 2.8, 2.9, 3.7., 3.8, 4.7., 4.8., 4.9 и 6.8.) забележена је већа концентрација катехина, иако једињење није детектовано у врстама подлога (ни на једној осим код магриве), али је присутно код хомеоспојева култивара 7.7., 8.8. и 9.9. у процентуалном учешћу од 37,5 %, 53,3 % и 29,4 % (1,269 mg/L, 2,519 mg/L и 1,173 mg/L) у односу на укупну количину полифенола.

Од детектованих флавонона присутни су у различитим концентрацијама следећи: цинарозид (Luteolin 7-O-glucoside), апигетрин (Apigenin 7-O-glucoside), апин (Apigenin 7-O-apioglucoside), лутеолин, апигенин и баикалеин. Посматрано у односу на процентуално учешће у односу на све детектоване полифеноле, цинарозид на неким спојевима има учешће и преко 60 %. Код магриве је детектован у највећим концентрацијама – на хомео споју 3.3. у вредности од 9,743

mg/L. Концентрација опада на спојевима: скоро 5 пута на споју магриве и обичне трешње (3.1.), а 2 пута на спојевима са свим јапанским трешњама. Вредности које се крећу између 1–1,5 mg/L детектоване су код свих хомео спојева јапанских култивара, спојева култивара ‘Kanzan’ са ‘Colt’, *P. serrulata* и ‘Pyrodwarf’ (2.8., 4.8. и 6.8.). Код спојева јапанске трешње са обичном трешњом и са ‘Colt’, као и споја култивара ‘Kiku-shidare-zakura’ са обичном трешњом и са ‘Colt’ и култивара ‘Kanzan’ са ‘Colt’, бележи се раст цинарозида: спој ‘Kiku-shidare-zakura’ са обичном трешњом (кумулятиван удео цинарозида за ове две врсте је приближно једнак количини у споју; 0,258 и 1,095 mg/L појединачно и 1,453 mg/L у споју). Нешто ниже вредности су забележене у споју са ‘Colt’, али је такође присутно повећање цинарозида и у овом споју. Сличне вредности су и код споја ‘Kanzan’/ ‘Colt’. У најнижим вредностима овај флавоноин је детектован код касне сремзе и обичне трешње, док код хомеоспоја ‘Pyrodwarf’ није детектован. Апигетрин се у свим спојевима јавља у констатним концентрацијама 0,012 и 0,013 mg/L; незнатно повећање на 0,017 (спој 6.8.), 0,019 (3.8.) и 0,25 (3.3.) су једина забележена одступања. Лутеолин је детектован на хомео спојевима 3.3., 7.7 и 9.9. и хетеро спојевима магриве (све осим 3.1), као и спојевима 1.9., 2.8, 2.9., 4.9., 5.7., 5.9. и 6.9. Апигенин се појављује у малим концентрацијама са учешћем у укупном садржају полифенола до 1%. Удео баикалеина, нарингенина (једини флаванонин од флавоноида) и флоризина (дихидрохалкон) се креће од 0,6% до 4,8% учешћа, са максималним садржајем од 0,156 mg/L за баикалеин, 0,197 mg/L за нарингенин и 0,261 mg/L за флоризин.

Од хидроциметних фенолних киселина детектоване су: п-кумаринска киселина, кофеинска, ферулинска, елагинска, синапинска и неофлорогена киселина (5-О-Caffeoylquinic acid). У највећем броју спојева јавља се п-кумаринска киселина са концентрацијама које варирају. У најнижим концентрацијама је има код јапанских трешња - основне форме и два култивара ‘Amanogawa’ и ‘Kanzan’ око 0,06 mg/L, а у спојевима 4.7. и 4.8. ово фенолно једињење није детектовано. На споју са ‘Kiku-shidare-zakura’: 1.9., 2.9., 5.9. и 6.9. концентрација расте на око 0,15. mg/L, а највећи садржај ове киселине забележен је на спојевима са магривом: 3.4., 3.3., 3.7. и 3.9. Кофеинска киселина варира у концентрацијама у малом опсегу (између 0,364 и 0,39 mg/L) у свим спојевима где

је детектована, а нема је у релативно малом броју спојева: таксонима јапанске трешње (4.4., 4.7., 4.8., 4.9.), споју 2.2, 2.4., 2.7., 3.1., 3.9., 6.4., 6.7. и 6.8.

Три фенолне киселине: ферулинска, елагинска и синапинска нису детектоване на хомеоспојевима јапанских трешања осим код култивара ‘Kikushidare-zakura’; елагинска и синапинска ни код магриве и касне сремзе, синапинска код обичне трешње, ферулинска код ‘Colt’. Ипак на неким спојевима, бележи се пораст ових киселина, иако у екстрактима основних врста, киселина није детектована: случај забележен на спојевима 2.7., 2.8, 3.4. Посматрано према спојевима код којих је детектована ферулинска киселина, њен садржај опада у спојевима 1.4., 1.8. и 1.9; код 2.9 благо расте а код спојева са магривом и касном сремзом стагнира осим код 5.7., где се количина дуплира (са 0,047 на 0,11 mg/L). Концентрација синапинске киселина опада у спојевима 6.7., 6.8. и 6.9. Последња у низу детектованих киселина, неохлорогена једино је детектована код култивара ‘Pyrodwarf’ и у спојевима са таксонима јапанских трешања са овом подлогом. У свим спојевима се бележи пад концентрације ове киселине.

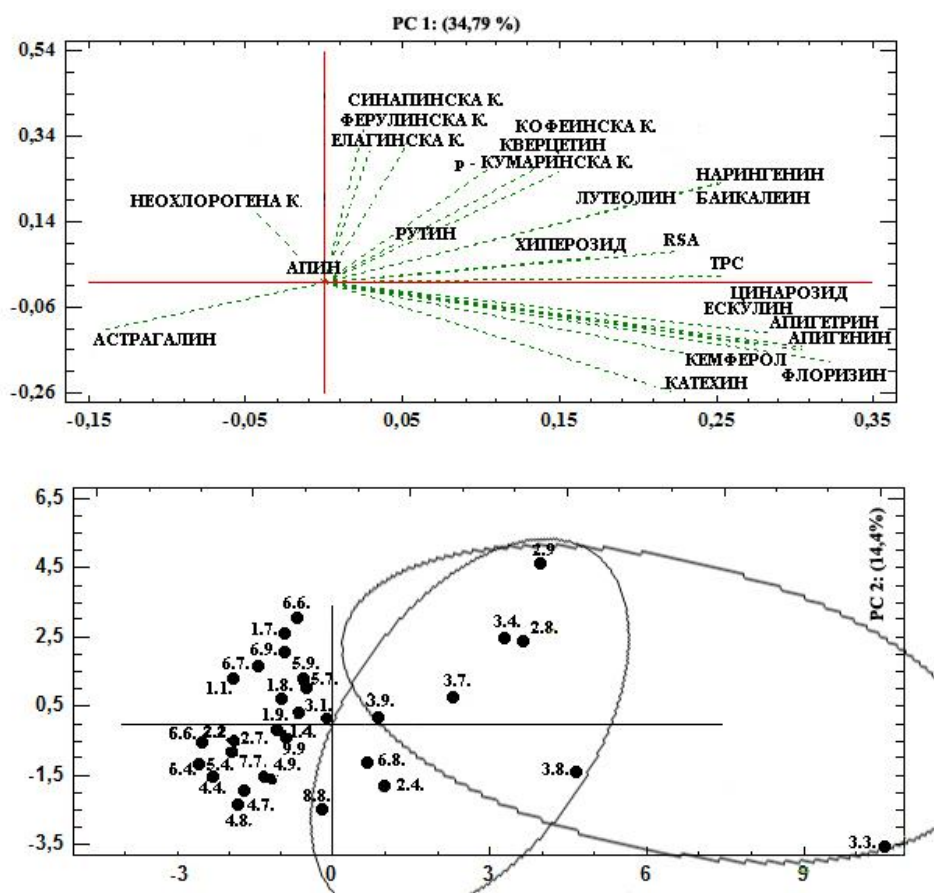
На свим спојевима, процентуално највеће учешће појединачног полифенола, посматрано на свим спојевима је учешће цинарозида. Односно, најзаступљенија фенолна једињења су цинарозид (Luteolin 7-O-glucoside) на споју 3.1. са 65,7 % у односу на све детектоване полифеноле, рутин (Quercetin 3-O-rutinoside) са 22,8 % на споју 2.2., ескулин са 16,5 % на споју 5.4. и 6.4. и хиперозид (Quercetin 3-O-galactoside) са 6,3 % на споју 4.4.

4.5.1. Анализа главних компонената (РСА) хомео и хетеропластичних спојева и фенолних једињења

Анализа главних компонената примењена је у циљу одређивања односа између 33 узорка хомео и хетеропластичних калусних спојева, са циљем одвајања најпогоднијих спојева за испитана три култивара ‘Amanogawa’, ‘Kanzan’ ‘Kikushidare-zakura’. Димензије почетне матрице биле су 33 (број спојева) × 23 (број квантификованих полифенолних једињења и резултати добијени у анализи укупних фенола и антиоксидативне активност), а за обраду података коришћена је матрица коваријансе, уз претходно аутошкалирање. Поменута анализа је показала да првих шест главних компонената описују 82,57% укупне варијансе

(варијабилности података). Прва главна компонента (PC1) је описивала 34,79% варијансе, друга (PC2) 14,44 %, а трећа (PC3) 11,98 %. На слици 80 је приказан график зависности прве две главне компоненте PC1 и PC2. За раздвајање спојева дуж PC1 осе, најјачи утицај имају апигенин, флоризин, апигетрин, цинарозид, кемферол, ескулин, катехин и делом хиперозид, ТРС и RSA. Спојеви на које су поменути полифеноли имали највећи утицај су група која је обухватила у широком опсегу све спојеве са магривом (3.3., 3.4., 3.7., 3.8., 3.9), спојеве 2.8., 6.8 и 8.8. Спојеви код којих се по груписању може говорити о утицају са негативним предзнаком поменутих фенолних једињења су спојеви: 3.1., 1.4, 1.9, 1.8., 5.7., и 5.9, односно варијабле са најзначајнијим доприносом идентификоване помоћу график вектора латентних варијабли указују да су то ниске концентрације катехина, апигетрина (Apigenin 7-O-glucosid), цинаросида (Luteolin 7-O-glucoside), флоризина, ескулина и апигенина (графикон 35).

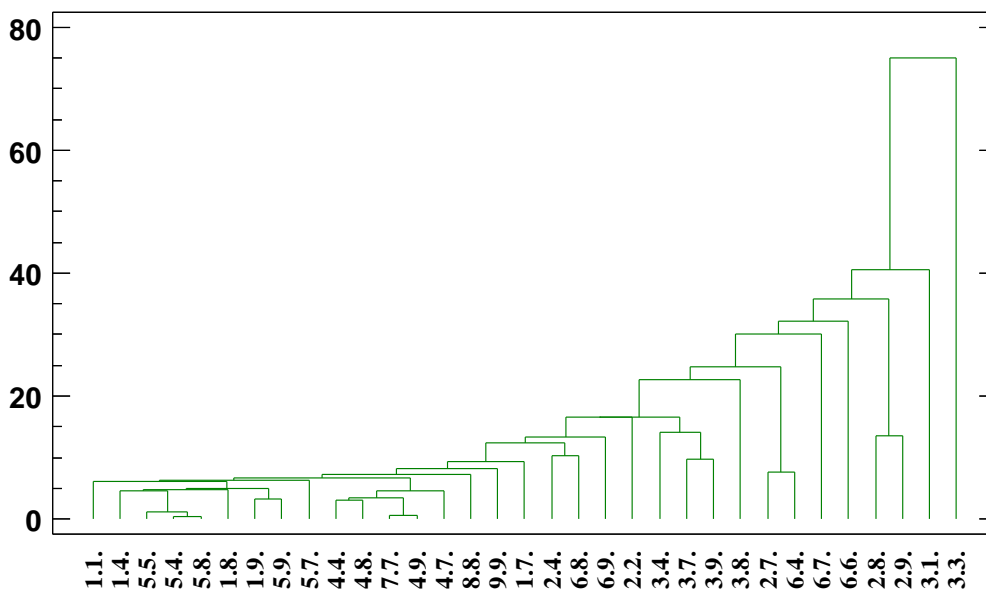
Графикон 35. Анализа главних компоненти, PCA график скорова (означене црне тачке) и вектора латентних варијабли (линије означене зеленом бојом).



Раздвајање према другом фактору код којег се уз јак утицај баикалеина, нарингенина и лутеолина придружује и дејство елагинске киселине, кверцетина, флоризина, RSA и TPC, односи се на све спојеве са магривом (3.3., 3.4., 3.7., 3.8., и 3.9.) као и спојеве 2.8. и 2.9. Насупрот дејству поменутих фенолних група су смештени спојеве 4.7., 4.8., 4.9., 5.4., 5.8. и 5.5. На ове спојеве имале су утицај смањене концентрације астрагалина, рутина, хиперозида, садржај укупних фенола и умањена антиоксидативна активност. Са слике се такође може закључити да су рутин и хиперозид, нарингенин, баикалеин и лутеолин компоненте које имају највише утицаја на способност уклањања DPPH радикала.

У циљу издвајања потенцијално добрих спојева култивара јапанских трешања у коришћених подлога за калемљење, урађен је дендрограм кластер анализе, на основу садржаја појединачних полифенолних једињења код свих анализираних спојева. Резултати су приказани на графикону 36.

Графикон 36. Дендрограм кластер анализе урађен на основу компонента појединачних полифенола у хетеропластичним спојевима



На дендрограму кластер анализе, спојеве јапанских таксона груписали су се на најмањој удаљености: спојеве 4.9. и 7.7. (*Prunus serrulata* / 'Kiku-shidare-zakura' и хомеоспој 'Amanogawa') и 4.4. и 4.8. (хемеоспој *P. serrulata* и *Prunus serrulata* / 'Kanzan') уз које се придружује и спој *Prunus serrulata* 'Amanogawa' (4.7.), и хомеоспојеви 'Kanzan' и 'Kiku-shidare-zakura' (8.8. и 9.9.) у једној хомогеној групи. У другој групи, на такође малој удаљености, груписани су

хомеопластични спојеви обичне трешње и касне сремзе и хетероспојеви поменутих врста са јапанским култиварима. На најмањој удаљености су хомеоспој касне сремзе и спојеви касна сремза/јапанска трешња и касна сремза/култивар 'Kanzan'. Придружени овој групи на такође малој удаљености су хомеоспој обичне трешње (1.1.), спој трешња/јапанска трешња (1.4.) и спојеви култивара 'Kiku-shidare-zakura' са трешњом и касном сремзом (1.9. и 5.9.). Једини спој који се на већој удаљености груписао уз ову групу је спој 1.7. (*Prunus avium*/ 'Amanogawa').

У другом кластеру, најмању дистанцу у груписању показују спојеви 2.7. и 6.4. и овај спој *Prunus* 'Colt'/'Amanogawa' се за јапански култивар показао првим одговарајућим после хомеоспоја (7.7.) и споја са јапанском трешњом (4.7.). Према резултату кластер анализе, на већој удаљености су спојеви 2.8. и 2.9. (*Prunus* 'Colt'/'Kanzan' и *Prunus* 'Colt'/'Kiku-shidare-zakura'). На већим дистанцама груписали су се јапанских култивари са *Pyrus* 'Pyrodwarf' (6.8. и 2.4. уз придружен спој 6.9. и 2.7. и спојевима 6.7. и 6.6.) и спојеви свих култивара са *Prunus mahaleb* (3.7. и 3.9. са 3.8.).

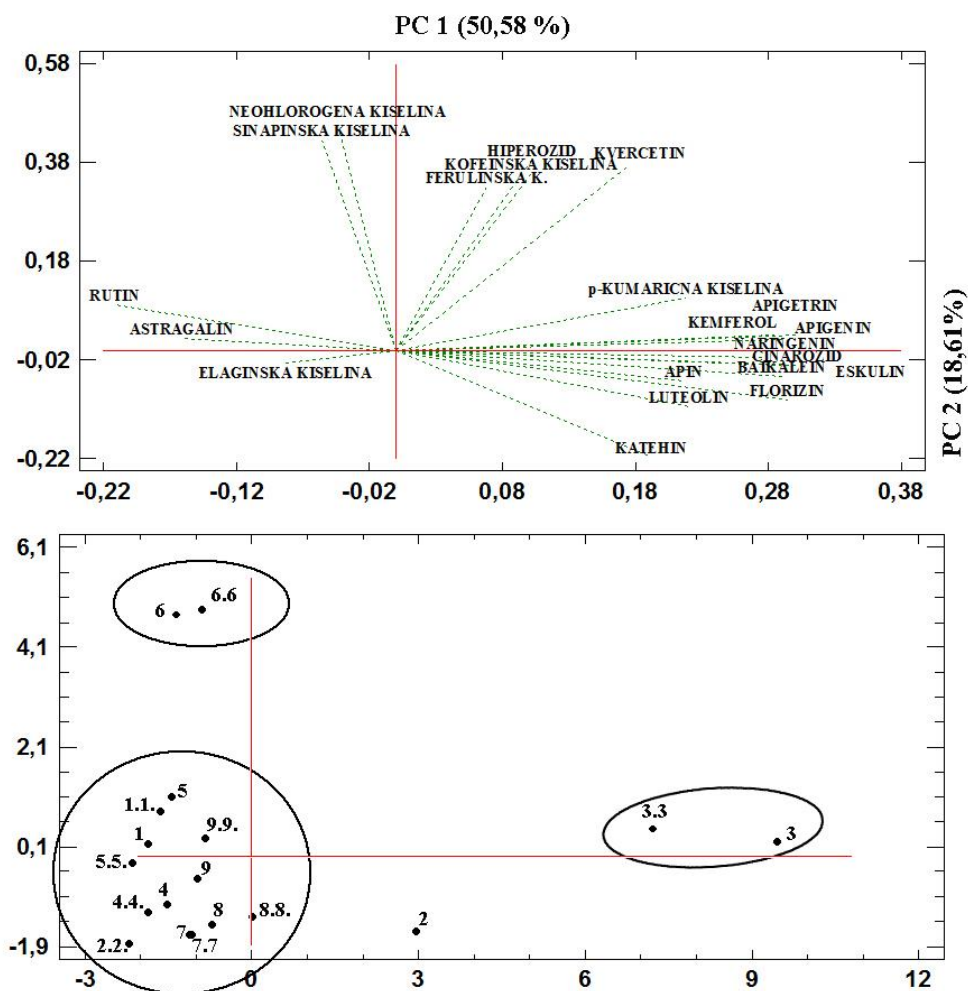
Преко анализе главних компонената и кластер анализе дошло се до варијанти спојева које су одговарајуће за сваки од испитиваних култивара. За *Prunus serrulata* 'Amanogawa' спојеви који су се показали као бољи су 4.7. и 5.7. (спојеви са *Prunus* 'Colt', *Prunus serrulata* и *Prunus serotina*) као и спој 2.7. За уобичајено коришћену подлогу - обичну трешњу (спој 1.7.), резултати указују да за овај култивар то није одговарајућа подлога. Оно што се из резултата показало као могуће решење је коришћење јапанске трешње као посредника у калемљењу између обичне трешње и овог култивара (спој 1.4. се према анализи налази у групи добрих спојева). За култивар 'Kanzan', обична трешња је одговарајућа подлога. Следе спојеви са касном сремзом и јапанском трешњом (спојеви 1.8., 5.8. и 4.8.). Добијени резултати у анализи главних компонената спој 2.8. (са култиваром *Prunus* 'Colt') одвајају као неодговарајући, а врсту као подлогу коју не треба користити за калемљење овог култивара. Неодговарајућа је и веза и са потенцијалним посредником у овом случају - јапанском трешњом. Спој 2.4. се у анализи не распоређује у групу потенцијално добрих спојева. *Prunus serrulata* 'Kiku-shidare-zakura' најбољу везу остварује са јапанском трешњом и обичном

трешњом и као и код претходног култивара, делом са сремзом. За све култиваре, према анализама, спојеви са магривом (3.7., 3.8. и 3.9) се нису показали као потенцијално добри.

4.5.2. Анализа главних компонената (PCA) хомеопластичних спојева старих 21 и 45 дана

Анализа главних компонената примењена за однос хомеопластичних спојева на којима су мерења појединачних фенолних компонената вршена на спојевима после 21. дана (спојеви означени са два броја као нпр. 1.1.) и после 45. дана (означен јеним бројем, нпр. 1) одређивана су у циљу утврђивања односа утицаја старења калуса у спојевима и повећања или смањења количине измерених фенолних једињења (графикон 37).

Графикон 37. Анализа главних компоненти, PCA график скорова (означене црне тачке) и вектора латентних варијабли (линије означене зеленом бојом).

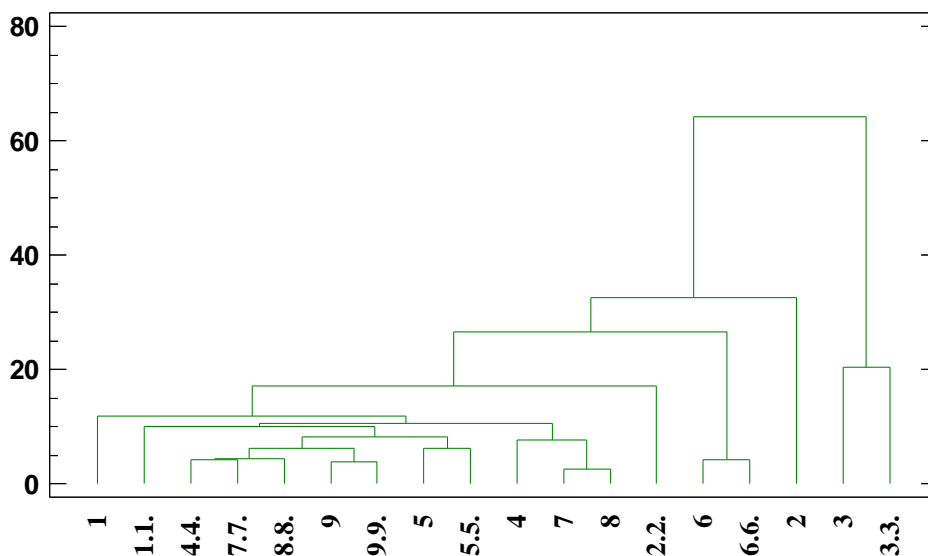


Димензије почетне матрице биле су 18 (број спојева) × 23 (број квантификованих полифенолних једињења и резултати добијени у анализи укупних фенола и антиоксидативне активност). Поменута анализа је показала да првих пет главних компонената описују 90,25 % укупне варијансе (варијабилности података). Прва главна компонента (PC1) је описивала 50,58 % варијансе, друга (PC2) 18,61 %. На графикону 37 су приказане зависности прве две главне компоненте PC1 и PC2.

Раздвајање спојева дуж PC1 осе на две главне групе карактерише прву групу коју чине спојеви 2., 3.3. и 3. (спој 'Colt' стар 45 дана и оба хетеропластична споја магриве) на чије су раздвајање најјачи утицај имали вектори р-кумаричне киселине, апигетрина, апигенина, апина, кемферола, нарингетина, цинарозид, баикалеин, ескулин, флоризин, лутеолин и катехин. Спојеви калуса магриве, груписани су заједно и указују да се старењем калуса утицај фактора испитаних полифенолних једињења не мења. Код калуса култивара 'Colt' (означени са 2. и 2.2.) разлика је евидентна. Са старењем калус мења садржај појединачних компоненти фенолних једињења и од утицаја елеагинске, ферулинске р-кумаричне и кофеинске са негативним предзнаком на млађем калусу у споју 2.2. прелази у јак позитиван утицај катехина, лутеолина, апигетрина, апигенина, апина, кемферола, нарингетина, цинарозид, баикалеин, ескулин, флоризин, и р -кумаричне киселине на споју стаом 45 дана (спој означе са 2.). Другу групу дуж ове осе раздвајања чине спојеви свих јапанских таксона: 4., 4.4.; 7., 7.7.; 8., 8.8.; 9., 9.9. Код ових спојева старењем калуса не долази до значајнијих промена у утицају појединачних фенолних једињења. Значајан допринос за раздвајање ове групе имају најнижи садржаји р-кумаричне киселине, свих флаванона сем хиперозида и кварцетина и флавона, рутина и астрагалина. Исте варијабле имају најјачи утицај и на спојеве касне сремзе и обичне трешње (5., 5.5. и 1., 1.1.) као и калус 'Colt' стар 21 дан (спој означен са 2.2.).

Кластер анализа садржаја појединачних полифенола у хомеопластичним спојевима после 21. и 45. дана указује на јаку повезаност свих таксона јапанске трешње са касном сремзом и обичном трешњом (графикон 38).

Графикон 38. Дендрограм кластер анализе урађен на основу компонената појединачних полифенола у хомеопластичним спојевима старости 21 и 45 дана



На дендрограму добијеном на основу садржаја различитих полифенолних једињења у хомеопластичним спојевима, није дошло до већег разгруписавања између хомеопластичних спојева различите старости, осим код споја калуса култивара ‘Colt’ (спојеви 2, и 2.2.). Спојеви 7. и 8., (‘Amanogawa’ и ‘Kanzan’ стари 45 дана) спојеви 4.4., 7.7., 8.8. (*Prunus serrulata*, ‘Amanogawa’ и ‘Kanzan’ стари 21 дан) као и спојеви 9. и 9.9. (‘Kiku-shidare-zakura’) повезани су на мањој удаљености као и спојеви сремзе 5. и 5.5. Садржај фенола на споју 4 (после 45 дана) на нешто већој удаљености групише се са спојевима исте старости калуса 7 и 8. и са спојевима 1. и 1.1. и 2.2 (обична трешња и клон ‘Colt’) на мањој удаљености чине један кластер. На нешто већој удаљеност истој групи су придружени и спојеви 6. и 6.6. (‘Pyrodwarf’) са спојем 2. Спојеви 3. и 3.3. (*Prunus mahaleb*) се на највећој дистанци повезују са осталим спојевима и чине другу хомогену групу.

5. ДИСКУСИЈА

Фаза успостављања асептичне културе је једна од најосетљивијих и најтежих фаза у процедури микропропагације посебно при раду са експлантима који се узимају из пољских услова, почетком и у току вегетације, при чему је проценат заражености материјала веома велики. С друге стране, како наводи Mihaljević et al. (2013) у припреми експлантата за микропропагацију код дрвенастих врста, јако је тешко контролисати гљивичну и бактеријску контаминацију. За елиминацију контаминација у *in vitro* размножавању развијене су различите методе (Barrett & Casselles, 1994; Ružić et al., 2010, Vujović et al., 2012) међу којима су најчешће у примени етанол, натријум хипохлорит (NaOCl), калцијум хипохлорит [Ca(ClO)₂], натријум дихлоризоцијанурат (DICA), жива хлорид (HgCl₂), сребро нитрат (AgNO₃) и водоник пероксид (H₂O₂). Поред тога, процедура стерилизације варира, зависно од врсте или (дела) експланта узетог за стерилизацију, услова средине у ком расте, физиолошке старости ткива и дела ткива које се узима за микропропагацију, што је разлог тешког утврђивања стандардне процедуре за стерилизацију. Натријум хипохлорит, примењен у експериментима у овом раду се показао ефикасан за већину истраживаних таксона. Третман који се састојао од испирања у проточној води 1,5 до 2 часа, тертирања експланата у 70 % етанолу у трајању од 1' 20'' и стављања у 10 % (v/v) раствор NaOCl (0,4 % w/v NaOCl), уз додатак 2–3 капи TWEEN 20 у трајању од 12 минута на магнетној мешалици дао је задовољавајуће резултате у стерилизацији зимских пупољака (процент асептичних пупољака у култури се кретао од 76,2 до 91,6 %). Сличне резултате са овим средством стерилизације добија и Mihaljević et al. (2013) у раду са облачинском вишњом (око 80%), при чему боље резултате за овај таксон добијају коришћењем AgNO₃ (97,6 %). Као погодно, стандардно средство за стерилизацију ткива NaOCl користе и Hammatt & Grant (1998) при регенерацији изданака из листа код *P. avium* и *P. serotina* и Işikalan et al. (2010) у раду са листовима и деловима избојка код бадема. Овај метод стерилизације у дугогодишњим истраживањима на воћним таксонима из рода *Prunus*, користе Ružić et al. (2010), Vujović et al. (2012), Ružić & Cerović (2001) у Институту за воћарство у Чачку. За успостављање асептичне културе, исто средство у нешто

јачој концентрацији при стерилизацији 9 украсних култивара трешања користе Kalinina & Brown (2007).

За стерилизацију вегетативних делова летораста који су узимани из пољских услова, 4 недеље после цветања, применом ниже концентрације реагенса: 2 % (v/v) раствор комерцијалне NaClO (0,4 % w/v NaClO), али дужег тарајања третмана стерилизације – 2 сата, добијен је веома висок проценат стерилних вегетативних делова летораста, односно здравих експланата за рад. Сличне резултати износе у истраживањима на три сорте брескве Pérez-Jiménez et al. (2013). Са 90 % успешности при стерилизацији, са ниским концентрацијама NaClO и антибиотицима, сличне резултате на пупољцима *Prunus persica* 'Red June' су добили Asaad et al. (2009).

Поред поменуте процедуре за стерилизацију, ради успостављања асептичне културе, често се матичне/донор биљке са којих се узимају експлантати гаје у стакларама, пластеницима или мрежаницима, где се контролисано третирају пестицидима. Међутим, и поред контролисаног гајења таквих биљака, проценат контаминација може бити велики (Ružić et al., 2010). Према Hartmann (1997) постоје екстерни патогени који су присутни на експлантатима, као и интерни патогени који су ендогени и присутни у експлантатима. Екстерна контаминација укључује гљиве, бактерије и др. микроорганизме и они се могу контролисати дезинфекцијом експланата и радног простора, док су интерни патогени присутни у ткиву и теже се одстрањују (ту спадају вируси, организми слични вирусима, гљиве и бактерије). Позната је чињеница да биљке које расту у хумидној атмосфери, омогућавају мицелијама гљива да продру у унутрашњост ткива и тако постају проблем за стерилност експлантата. Генерално, донор биљке које су расле у заштићеном простору у стакларама или мрежаницима су много бољи извор експлантата од оних гајених у пољу (Ružić et al., 2010). Уз чињеницу да нам нису биле на располагању матичне биљке гајене у мрежаницима, задовољавајући резултати су добијени уношењем дормантних летораста у лабораторијске услове. На њима је, уз услове смањене влаге и повишене температуре долазило до покретања пупољака који су после тога увођени у процедуру стерилизације. Процент контаминације је био за око 20 до 30 % мањи код експланата који су пре стерилизације постављани у лабораторијске услове у односу на оне који су

узимани директно са отвореног поља. Према резултатима добијеним на подлогама за калемљење Gisela 5 и Pyrodwarf код којих је постављан компаративни оглед, знатно бољи резултати су добијени са експлантатима пореклом са гранчица из лабораторијских услова. Тако је, код подлоге Gisela 5 добијен највећи % иницираних лисних розета, чак 82,7 % од експланата пореклом из лабораторијских услова (Ružić et al., 2010).

У прелиминарним резултатима који су добијени на мањем делу узорка (три култивара украсних трешања) у односу на целокупна истраживања, испитан је утицај старости експланата на степен контаминације узорака и пропадања експланата. Код сва три култивара јапанских трешања, експланати који су узимани са стабала чија се старост кретала око 20 година, забележена је индукција калуса око 30 % (33,3 % код култивара 'Amanogawa' и 'Kiku-shidare-zakura' и 37,5 % код култивара 'Kanzan') док је преостали део експланата пропадао (контаминиран или некротиран): код *Prunus serrulata* 'Amanogawa' пропадање на четири подлоге је преко 85 %, код култивара 'Kanzan' на три је преко 80 % (MS2, MS3 и MS4) и код постављених пупољака култивара 'Kiku-shidare-zakura' контаминација је од преко 90 % забележена на свим осим једног медијума. Сакупљани у истом временском периоду (период мировања вегетације – јануар, фебруар), припремани на идентичан начин, уз исте услове стерилизације и начина узимања, експланати са јувенилних стабала – до 6 година стари, успоставили су асептичну културу у статистички значајно већем проценту од 67,7 % до 100 %. Код калуса добијеног од пупољака са адултних стабала, промена боје калуса (потамњивање) дешавала се веома интензивно уз спорији раст калуса. Брже потамњивање, подразумевало је и чешћу супкултуру калуса на нове хранљиве медијуме, мада код сва три култивара ова мера није значајно утицала на формирање растреситог калуса потребног за даља истраживања. За разлику од поменутог, калус добијен са јувенилних матичних стабала, повећавао је масу знатно брже у условима климатизоване просторије за раст (мрак, температура 23 ± 2 °C). У периоду од 20-так дана, добијала се маса фибрилног белог калуса код ког је супкултуру било могуће радити у просеку после 4 недеље.

Висок проценат узорака који су узимани са старијих матичних стабала доводила је до потпуног пропадања експланата и у истраживањима на врсти

Uapaca kirkiana Muell Arg. (Mng'omba et al., 2007) што је приписано ендогеним патогенима присутним у адултном ткиву. Поред статистички значајне разлике у проценту контаминираних узорака узетих са адултних и јувенилних матичњака, на калусу који је индукован из ова два типа ткива, биле су изражене и разлике у даљој пролиферацији калуса као и његовој структури. Калус добијен са старијег ткива, растао је веома споро током наредног периода (до супкултуре) и улазио у процес потамњивања јачег интензитета. Истарживањима на калусним културама са јувенилних или адултних ткива, са листа *Hedera helix* Stoutemyer & Britt, (1963, 1969) добијају бржи и јачи раст калуса јувенилних и рејувенилизованих ткива него зрелих ткива. Исти аутори најобимнији раст калуса добијају са младих ткива, док ткива узета са рејувенилизованих изданака дају средње обилан капацитет пролиферације. Уједно култура калуса добијеног из младих ткива била је мање захтевна за хранљивим материјама из подлоге. Културама са јувенилних и адултних ткива код *Prunus serotina*, Caroneti et al. (1971) добија боље резултате на јувенилним ткивима, него на адултним. У овом раду истражена је и способност рејувенилизованог ткива (узетог са калемљених индивидуа) да продукује калус. Наиме, у процесу калемљења, када се у већини случајева адултно ткиво (племка) калеми на јувенилно (подлога), потврђена је рејувенилност ткива племке (Грбић, 2004). На овај начин се могу искористити повољне особине физиолошке јувенилности ткива што је потврђено са огледима на касној сремзи (Caroneti et al., 1971) где је постигнут ефекат интензивније калогенезе код јувенилних и рејувенилних ткива у односу на адултна. У правцу ових доказа су и резултати који су добијени у овом раду са украсним трешњама из групе *Sato-zakura*. Према свим изнетим резултатима, експланте који су узети са младих калемљеих садница, индуковали су калус у значајно већем обиму у односу на експланте са старијих стабала. На истима је забележена и већа маса калуса у супкултурама.

У обимним истраживањима на ткиву *P. avium* Feeney et al. (2007) износе упоредне резултате добијене у циљу органогенезе код три култивара трешње из ткива узетих *ex vitro* (са безвирусних матичних стабала гајених на отвореном) и ткива истих култивара успостављених и гајених у култури *in vitro*. За развој органогеног калуса који се формирао на експлантима *ex vitro*, било је потребно дуже време и већа количина хранљивих материја. Поред тога забележено је и да

се калус са младих *in vitro* експланата делио и развијао брже. Аутори ову појаву објашњавају разликом у процесу деконтаминације ткива са отвореног (коју није потребно вршити на стерилном материјалу из културе) и стресу приликом пребацивања у *in vitro* услове који може да поремети процесе развића ткива.

Могућност коришћења адултног ткива, које у неким случајевима може бити једино којим се може обезбедити ткиво одређеног генотипа, повећава се одређеним методама *in vitro* пропагације. Miguel et al. (1996) су резултатима на бадему, успоставили протокол за рејувенилизацију адултног ткива уз могућност његовог коришћења у каулогенези. И у овом раду је потврђена боља индукција и већа маса пролиферираног калуса јувенилног ткива у односу на адултно. У многим радовима, на кајсијама (Druart, 1990a; Escalettes & Dosba, 1993), трешњама (Druart, 1990b; Hammatt & Grant (1998)), бресквама (Gentile et al., 2002; Declerck & Korban, 1996) и крушкама (Escalettes and Dosba, 1993) фаворизује се коришћење млађих ткива у култури. Проблематиком физиолошке старости ткива које се уноси у културу бавили су се и Pasqual & Marin (2005) који у раду са 4 врста подлоге за калемљање из рода *Prunus*, објављују поступак којим се и старији листови ефикасно користе у органогенези. Они спроводе претретман течном фазом уз 2,4-D којим се повећава стимулација формирања калуса и код старијих ткива.

Поступком примењеним у последње поменутом раду, јасно се указује на улогу регулатора растења на процес пролиферације и органогенезе калуса. Према Nešković et al. (2010) хормонални чиниоци регенерације ткива су ауксини и цитокинини у одређеном балансу: ауксин и цитокинин додати посебно у подлогу за културу, изазивају врло ограничену деобу ћелија, а њихов заједнички ефекат далеко превазилази збир појединачних. Осим тога, перманентно растење калуса се постиже само уз оба хормона. Ниске концентрације ауксина повољно утичу на формирање коренова, док високе инхибирају њихово формирање и утичу на бујање калуса (Bonga & Durzan, 1985; Vinterhalter & Vinterhalter, 1996; Грбић, 2004). Треба имати у виду да ово правило може донекле бити модификовано дејством различитих других чинилаца и да има доста података о ефектима и других хормона, али су они различити од врсте до врсте и тешко се могу извући генерални закључци. Уједно, та чињеница указује на другу могућност, да

ендогени хормони, чији је састав углавном непознат, могу да делују као синергисти или антагонисти цитокининима и ауксинима који се додају у хранљиву подлогу, чиме би се могле објаснити неке разлике у реакцији различитих врста на индуктивне подлоге истог састава.

Применом различитих регулатора растења у индукцији калуса из меристема пупољака у овом раду, дошло се до резултата који указују да је код већине таксона утицај на индукцију зависио од: избора комбинације регулатора растења, избора хранљиве подлоге као и самог генотипа.

Код култивара 'Amanogawa' и 'Kanzan' може се говорити о јачем утицају регулатора растења на индукцију калуса, него типа хранљивог медијума. Код првог, висок проценат индукције се јавља на све три подлоге (MS, WP и SH), а код култивара 'Kanzan' на две (MS и SH). При константном садржају BAP од 0,5 mg/L, NAA као главни извор ауксина у подлогама је утицао на индукцију калуса на преко 80 % експланата, с тим што је код култивара 'Kanzan' на SH подлози и 2,4-D дао висок проценат индукције калуса. И за обичну трешњу, добијени резултати указују да је количина од 2mg/L ауксина 2,4-D, или NAA уз BAP 0,5 mg/L одговарајућа за добијање калуса из пупољака, без обзира на избор MS, SH или WP хранљивог медијума. Сличан резултат добијен је при индукцији пупољака касне сремзе, који су у основи индуковали калус на свим медијумима. Уједно ово је једина врста код које је ауксин 2,4-D дао најбоље резултате на сва три хранљива медијума. За култивар 'Colt', у избору комбинације хормона, не добијају се значајне разлике али се WP медијум показао неодговарајућим.

Што се тиче индукције калуса из вегетативних делова, само се код обичне трешње процес одигравао успешно на свим хранљивим подлогама, а разлика је зависила од изабраних комбинација хормона.

На лисној дршци, ламини листа и делу избојка са пупољком, избор хормона је имао већи утицај на индукцију калуса јер су се свих шест изабраних хранљивих подлога показале одговарајућим за индукцију. Средња вредност индукције код скоро свих подлога и типова експланата је био изнад 75 % а за индукцију калуса, довољно је било учешће само једног ауксина у концентрацији од 2 mg/L (NAA на све три подлоге или 2,4-D на WP подлози). Додавање и ИВА од

0,5 mg/L утицао је на делимично смањење индукције.

Однос ауксина и цитокинина у хранљивим подлогама представља основни параметар при органогенези у свим радовима који се баве овом проблематиком. Што се тиче саме индукције калуса, у раду Vujić et al. (2010), за сорту купине 'Чачанска бестрна' индукција калуса је добијена на свим комбинацијама различитих концентрација ауксина и цитокинина на MS хранљивој подлози у врло високом проценту, од 83,3 % до 100 % експланата. У раду са различитим вегетативним деловима летораста брескве, Perez-Jimenez et al. (2013) добијају такође врло висок проценат индукције калуса (преко 82,3%) на WP и MS подлози, при коришћењу различитих концентрација ауксина (2,4-D) и цитокинина (кинетин и TDZ). Peixe et al. (2004) индукују калус из антера клона кајсије такође у проценту преко 80%. У раду са бадемом (Işikalan et al., 2010), зависно од односа ауксина и цитокинина, добијени су различити проценти индукције калуса који су се кретали до 90 %. У нашим истраживањима изабрани ауксини (2,4-D, NAA и ИВА) и цитокинин ВАР, егзогено су додавани у хранљиву подлогу у односу који није био мањи од 4 : 1 ауксин: цитокинин. Разлог због ког је однос у ком су сви коришћени ауксини били у већим дозама од цитокинина, је реакција коју ћелије при индукцији имају према егзогеним хормонима. Наиме имало се у виду да при индиректној органогенези, дедиференциране ћелије прво почињу да се интензивно деле и образују калус, после чега (зависно од хормонског стимуланса) локализовани меристемски центри настављају да образују калус, или се диференцирају у пупољке или корене.

Према Nešković et al. (2010), утврђено је да се органогенеза састоји од најмање три процеса: стицање компетиције, детерминације и мофролошке диференцијације. Када се листови поставе на било коју подлогу, за првих 10 дана се на пресеченој ивици образује калус. Калусне ћелије су компетентне за регенерацију, али нису детерминисане, јер су способне да формирају и калус и пупољке и коренове. Почев од 10. дана, састав подлоге постаје индуктиван; потребно је да калуси остану на подлози 10 до 14 дана, да би постали детерминисани за специфичан морфогенетски пут. Ако се калуси поставе на индуктивну подлогу са високом концентрацијом цитокинина (изопентенил аденин 7mg/L) и ниску концентрацију ауксина (IAA 0,05 mg/L) они образују пупољке; на

индуктивној подлози која садржи само ауксин (IBA 12 mg/L) образује корен, а неорганизовано калусно ткиво наставља да расте у присуству IAA (3 mg/L) и кинетина (0,3 mg/L). Како се после периода индукције, тип регенерације више не може мењати, на избор за однос ауксина и цитокинина у раду, како је поменуто, је утицала изнета чињеница да само релативно висок однос ауксина и ниског цитокинина омогућава калусном ткиву да настави да расте, што је био основни циљ овог рада. У многим радовима, индукција калуса се обезбеђује и при повећаној дози цитокинина, али је основни циљ ових радова да се из недиференцираног калуса у што краћем року добије органогенеза и то најчешће изданака.

У избору ауксина (у комбинацији са константном концентрацијом изабраног цитокинина (BAP од 0,5mg/L), NAA се код већине испитиваних таксона показала као нејефективнија у индукцији калуса. На процес индукције задовољавајући резултати су добијени и применом 2,4-D, док се IBA није показала одговарајућим ауксином за индукцију. Овај резултат је у сагласности са резултатима добијеним за различите подлоге из рода *Prunus* (Pasqual & Marin, 2005), као и са резултатима на бадему (Işikalan et. al., 2010). Ning et al. (2007) износе опажање да је у оредима са јапанском украсном шљивом, повећање концентрације NAA поред боље индукције утицало и на смањење потамњивања експланата. Ово умањање потамњивања на месту пресека експланата приликом додавања NAA у медијум, потврђено је и у истраживањима Olaya et al. (2000). James (1987) у својим истраживањима на већем броју дрвенастих воћних врста умереног појаса, долази до закључка да су за одређен тип експланта који нису ембрионог порекла, комбинација BAP и NAA добра основа за регенерацију. Према изнетим подацима за брескву (Hammerschlag et al., 1985) током калусне индукције, повећавањем концентрације NAA (у медијуму који садржи BA) повећава се проценат формираног калуса и елиминише секреција фенолних супстанци на резу. Група аутора (Mihaljević et al., 2002) на тиси (*Taxus baccata* L.) добија 100% индукцију делова стабљике користећи MS медијум са 3 mg/L NAA и 0,5 mg/L кинетина.

Што се тиче избора цитокинина, у већини радова његов утицај се везује за индукцију изданака из калуса, индиректном органогенезом или директном из

диференцираних ткива експланта. Група аутора при овом процесу фаворизује TDZ (tidiazuron), друга ВАР. Како је у овом раду циљ била индукција калуса без органогенезе, избор ВАР је био сасвим одговарајући као и однос при којем је количина цитокинина била четвороструко мања од концентрације ауксина.

Други важан фактор који је несумњиво имао утицај на индукцију калуса код испитиваних таксона је избор хранљиве подлоге. Као уопштен крајњи закључак, може се рећи да се подлога MS показала најпогоднијом за већину испитаних врста али се такође, дошло и до различитих резултата у индуковању калуса и на друга два медијума. На подлогама MS, у врло високом проценту индукован је калус *Prunus serrulata* 'Amanogawa' (од 83,3 % до 100 %), без обзира на избор ауксина: 2,4-D, NAA или IBA (2 mg/L) са ВАР од 0,5 mg/L. При коришћењу WP подлога, избор ауксина имао је улогу у индукцији калуса јер су значајно бољи резултати добијени коришћењем 2,4-D и NAA у односу на IBA. На лисној дршци, плочи, и делу изданка са пупољком, иницирана је појава калуса од 73,3 % до 90 % на хранљивој подлози са 2,4-D (WP1), а лисна дршка и лисна плоча на подлози са NAA, индуковале су калус на око 90 % експланата. Код култивара 'Kanzan' хранљива подлога на којој је забележена индукција од 100 % на свим типовима експланата је подлога SH са ауксином 2,4-D. Са истим ауксином, индукција на MS је 96,6 % и на WP 83,3 и 96,7 %. Замена 2,4-D ауксина са NAA, за одређене типове експланата култивара 'Kanzan', није значајно утицала на висок проценат индукције: без статистички значајне разлике за све експланте, индукција је преко 80 %, а на MS4, WP2 и WP4, за лисну основу и лисну плочу је преко 95 %. Ипак, NAA у SH подлози доводи до драстичног опадања индукције испод 20 % код свих типова експланата. За култивар *Prunus serrulata* 'Kiku-shidare-zakura' добијен је најслабији резултати индукције калуса са вегетативних делова летораста. Само на три подлоге (MS са NAA, WP са NAA и 2,4-D) и два типа експланата (на дршци листа и делу изданка), индукција се креће око 70 %. Процент индукције су варирали за различите типове експланата на истим хранљивим подлогама. Према добијеним резултатима, експлантима од вегетативних делова култивара 'Kiku-shidare-zakura' одговарају подлоге са NAA, мада је ово једини култивар код којег се IBA у количини од 2 mg/L показала погодном за индукцију калуса (индукција је била 50 %). На пролиферацију калуса

из пупољака код овог култивара, значај у процесу индукције имао је и избор медијума и врста ауксина. Само на SH подлози проценат индукције је од 60 % до 100% уз коришћење NAA и 2,4-D, са предношћу при коришћењу NAA. За врсту *Prunus serrulata* избор медијума, у овом случају MS хранљива подлога, је такође имао значајан утицај на проценат индукованог калуса. Ауксин NAA у подлози, као основни регулатор растења из групе ауксина, са или без додатка ИВА дао је најбоље резултате. Уопштено говорећи, за индуковање калуса јапанских трешања, MS као хранљиви медијум са додатком NAA од 2mg/Lи ВАР од 0,5 mg/L, се показао одговарајућим за сва четири таксона.

Код магриве, је добијена одређена количина индукованог калуса, али су изабране комбинације и количине регулатора растења у хранљивим подлогама неизбалансиране за ову врсту, па проценат индукције није већи од 50%, што се не може узети као задовољавајући резултат.

У истраживањима (Ning et al., 2007) са *Prunus mume* Sieb. et Zucc индукција калуса се није успостављала на хранљивој подлози без хормона, али је на ½MS подлози са односом 4 : 1 – ауксин NAA или 2,4-D : цитокинин ВАР, индукција калуса била 81,6 % до 97 %. Како наводе аутори рада, добијени резултати су у супротности са подацима добијеним за друге таксоне рода *Prunus*, према којима се као најбоља подлога за индукцију издваја подлога WP. Према резултатима добијеним индукцијом различитих типова експаната *Prunus avium* према наводима Bhagwat & Lane (2004), Neil & Neil (2000), Hammat & Grant (1998) за *P. serotina* и Tang et al. (2000) за *P. cerasus* за индукцију калуса ових генотипова фаворизирана је такође подлога WP.

За резултате добијене у овој докторској дисертацији, може се рећи да нису у колизији ни са једном од изнетих тврдњи. Наиме, за индукцију калуса обичне трешње (која је предмет претходно поменутих радова) у нашим експериментима су добијени високи проценти индукције и на медијуму MS, као и на медијуму WP, код којих је ауксин NAA у подлози имао утицај на висок проценат индукције у обе хранљиве подлоге. Слични резултати су добијени и за касну сремзу (*Prunus serotina*) која је предмет рада Hammat & Grant (1998).

Параметар којим се такође утврђивала успешност индукције калуса била је

брзина индукције, мерена у данима, после постављања експланата у услове *in vitro*. По брзини индуковања калуса из меристема пупољака, најбоље су се показале подлоге MS4 и MS2 (NAA/IBA/BAP и NAA/BAP) код којих максимални број дана када је забележена индукција није прелазило 14 дана, а најлошије подлоге у којима је за извор ауксина IBA (MS3, WP3, SH3) где, на одређеном броју узорака није забележена индукција калуса ни после 30. дана. Појава вишеструких преклапања међу добијеним вредностима указивала је да се појава калуса у основи пупољака код већине подлога дешавала између деветог и четрнаестог дана, што се у општем резултату може изразити као релативно кратко време за које долази до индукције калуса. За брзину индукције калуса из вегетативних делова летораста може се рећи да је била интензивнија у односу на меристеме пупољака, односно, забележено је краће време за које се калус појављивао у основи експланата. У средњем времену појављивања, вредности су се кретале од 6 до 17,2 дана, с тим што је најранија индукција забележена на избојку култивара 'Аманогава' – 3. дан од постављања на хранљиву подлогу. У укупном резултату, на овом типу експланта је најбрже долазило до индукције калуса. Добијени резултати се уклапају у очекиване вредности за процесе калогенезе. Како износе Bhagwat & Lane (2004) за две сорте трешања индукција калуса се успоставља око 7. дана, а цео лист, озлеђен дуж нерва, је најбољи тип експланта. Калус се појављује дуж озледе као и код регенерације из листова дивље јабуке (Saboni et al., 1999). У раду са кајсијом, Pérez Jiménez et al. (2013) бележе средње време индукције калуса изражено у данима од 14,4 до 17,3. Сличне вредности добијају и Işikalan et al. (2010).

За многе таксоне, убрзани протокол за добијање калуса и даље коришћење недифренцираног ткива у правцу дедиференцијације и добијања изданака, корена или ембриона, подразумева коришћење вегетативних делова узиманих са отворног поља. И у овом раду, коришћење вегетативних делова летораста са матичњака гајених на отвореним, незаштићеним површинама, показала се као могућа метода при даљим истраживањима. Индукција калуса из различитих вегетативних делова једногодишњих зелених летораста (дршка листа, основа листа, део лисне ламине и део изданка са пупољком) успешно је изведена код 5 таксона. За *Prunus avium* и *P. serrulata* 'Аманогава', 95,55 % и 75,92 % (по редоследу) калусом индукованих

лисних дршки и 85% и 63 % покривености калусом површине експланта, показује да је лисна дршка веома погодан тип експланта за индукцију калуса. За остале култиваре, 'Kanzan' и 'Kiku-shidare-zakura' проценат се креће око 50 % индукованих експланата са покривеношћу од 32,72 до 53,41 % (по редоследу). Основа листа *Prunus avium* и *P. serrulata* 'Kanzan' прекривена је калусом изнад 80 % површине, а код култивара *P. serrulata* 'Amanogawa' и *Prunus* 'Colt', овај проценат се спушта на око 50 % индукованих експланата са покривношћу калусом од 55,04 и 38,16 %. Најниже вредности су добијене за *P. serrulata* 'Kiku-shidare-zakura', чије основе листа калусирају 30 %, са покривношћу површине од 45,87 %. Лисна плоча има сличан распоред вредности за оба мерена параметра као и основа листа, осим што је степен покривености калусом нижи код свих врста и култивара. Изданак са младим пупољком, као тип експланта једино за дивљу трешњу индукује калус на 90,53 % и ова вредност се статистички значајно одваја у односу на све остале осим за вредност која је забележена за култивар *P. serrulata* 'Amanogawa'. Вредност овог параметра се креће око 50 % за *Prunus serrulata* 'Kanzan' и 'Kiku-shidare-zakura' и за 'Colt' око 33,3 %. Сличан распоред је и за параметар средње покривености калусом. Према изнетим резултатима уочава се, да се зависно од генотипа, успешност одређеног типа експланта за индукцијом мења.

Мада у раду нису статистички обрађени подаци о разлици појављивања калуса на дисталном и проксималном крају реза код сегмената листа или избојка, прегледом је потврђена чињеница да је количина индукованог калуса код истраживаних таксона у овом раду зависила од базипеталног транспортног пута ауксина. У раду са лисним дршкама кајсије (Pérez-Jiménez et al., 2013), добијају проценат покривности калусом од 42,3 до 71,6 %, а на деловима стабљике од 30,17 до 85,6%. Уједно, већу масу калуса добијају на деловима листа без централног нерва, што је приписано већој површини озледе која може да утиче на развој калуса. Претходна истраживања Declerck & Korban (1996) указују на сличан ефекат за брескву и за бадем Ainsley (2000, 2001). У раду са црвенолисним култиваром 'Royal Burgundy' (добијеним фиксирањем особине соматске мутације гране код цветајућег култивара *Prunus serrulata* 'Kanzan') успешна индукција ембриона добијена је такође из калуса листа. При раду са ткивом младих изданака

Taxus baccata калусна индукција је била 100 %, при чему је добијен бели растресит калус. Потврда о обилнијој индукцији калуса проксималних делова експланата добијена је и у многим радовима од којих су издвојени они са резултатима у роду *Prunus*: са култиварима вишања и трешања (Tang et al., 2000), на експлантима шљиве (коришћени су листови и лисне дршке) Yao et al. (1995); на експлантима бадема, цанерике и трношљиве (Pascual & Marin, 2005) и трешње (Matt & Jehle, 2005). Код подлоге за брескву 'Nemaguard' покривеност листа калусом од 100 % постигнута је такође на проксималном крају експланта, петељке листа (Zhou et al., 2010).

Индукција и каснији раст калуса се одвијао у условима мрака сходно резултатима из литературних извора који су узети у обзир током формирања огледа. Поред директног физиолошког одговора на фактор спољашње средине (светлост) морала се узети у обзир и улога генотипа. Наиме, у литератури се може доћи до опречних ставова о утицају светлости на индукцију калуса. У радовима у којима је циљ органогенеза калуса врста у роду *Prunus*, бели растресит калус у обимним количинама се углавном формирао у условима мрака, док се за добијање зеленог компактног калуса, експланти уводе у услове светла које позитивно утиче на формирање изданака (Pérez - Jiménez, 2012, 2013; Fajerska 2006, Blando et al., 2005). Уједно, Declercq & Korban (1996) радећи на индукцији калуса код листова *Prunus persica*, цитокининима у подлози су подстакли развој компактног, зеленог калуса, а са ауксинима белог, растреситог калуса. Давно је утврђен утицај светла на степен ћелијских деоба као и утицај етилена на кауло и ризогенезу (Cornejo-Martin et al., 1979), самим тим и да трајање излагању светлости, игра важну улогу у морфогенези експланта. У раду Mousavi et al. (2012) са *Eustoma grandiflorum* Salisb. аутори помињу да је свежа маса калуса већа у случају раста на светлу него у мраку, односно да светло повећава индукцију, што аутори приписују односу хранљивих материја које постају приступачније за калус у већој мери, него у условима мрака. Насупрот томе у раду са врстом *Azadirachta indica* A. Juss. око 65 % увећања масе калуса се добија растом у мраку, као и код врста *Daucus carota* L., *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh и *Lycopersicon esculentum* Mill. (Hangarter & Stasinopoulos, 1991). У упоредним експериментима са IAA која је разградива под утицајем светлости и NAA која је стабилна, аутори су указали на неке штетне

ефекте које може да изазове бела светлост деградацијом ауксина када је биљном ткиву доступна само IAA, као извор ауксина. Међутим, када је егзогено доступна и NAA, раст такође може да буде значајно умањен под дејством других, светлом индукованих промена у хранљивом медијуму, какав је на пример губитак доступног гвожђа или акумулација формалдехида, који се ствара фотооксидацијом EDTA или другим променама индукованим дејством светла. У радовима у којима је индуковање пупољака примарни циљ, улога односа светло/мрак посебно је изражена. Тако Yao et al. (1995), истичу да услови мрака у првих 14 дана имају утицај на регенерацију петељке листа (83 % индукције); Behbahani et al. (2011) наводе да је ефекат каулогенезе појачан ако се експланти првих 14 дана држе у условима мрака, као и да је светлост имала ефекат на раст калуса. До сличног закључка дошли су и Canli & Tian (2008), у раду са јапанском украсном шљивом. Котиледони су показали бољи индекс регенерације пупољака из калуса индукованог у мраку, а повећање процента регенерације је забележено и код листова *P. serotina* који су у раном периоду развоја, били у условима мрака (Espinosa et al., 2006).

Последња два параметара којим је мерен квалитет индукованог калуса на одређеној хранљивој подлози, односила су се на динамику раста и промену боје (потамњивање). Код анализе калуса који се формирао у основи пупољака, хранљиве подлоге које су се, издвојиле као најпогодније, су на првом месту подлога MS4 и са нешто слабијим резултатима подлоге MS2, SH2 и SH5. Три од четири поменуте хранљиве подлоге (MS4, MS2, SH2) садрже NAA као главни извор ауксина који се и показао као најпогоднији од регулатора растења за већину изабраних таксона. Уз највећу масу, боја калуса на овим подлогама код већине врста остаје бела и калус задржава растреситу структуру. Код култивара 'Amanogawa', на подлози SH5 калус тамни интензивно, а за остала два генотипа јапанских трешања све четири поменуте подлоге су одговарајуће.

За остале истраживане таксоне, поменуте хранљиве подлоге су се такође показале повољним, осим код таксона 'Colt' и *Prunus mahaleb* за које је препорука да се користи само MS2 (подлога са NAA али без додатног ауксина IBA). Исти параметри мерени на калусу добијеном из вегетативних делова летораста, издвајају такође као најпогоднију хранљиву подлогу MS за већи број врста и

култивара. За *Prunus avium* и *Prunus serrulata* 'Kanzan' обе хранљиве подлоге, у две комбинације односа регулатора растења: MS2 (2 mg/L NAA и 0,5 mg/L BAP) и MS4 (2 mg/L NAA, 0,5 mg/L IBA и 0,5 mg/L BAP) су се показале одговарајућим, с тим што је динамика раста код обичне трешње јача него код култивара 'Kanzan' што је условило потребу супкултивисања калуса обичне трешње после 30 дана, а јапанског култивара са могућношћу и до 2 месеца.

Генотип 'Colt', поред медијума MS2, даје калус који добро расте и на WP1 и SH1 (извор ауксина је 2,4-D) мада је после одређеног броја супкултура, долазило до потамњивања и пропадања калуса. Како појава није забележена на MS2 подлози, и за култивар 'Colt' ово је била изабрана подлога за даља истраживања, али је супкултура рађена на сваких двадесетак дана. И за преостале таксоне: *Prunus serotina* и *Prunus serrulata*, *Prunus serrulata* 'Amanogawa' и 'Kikushidare-zakura', ова хранљива подлога се показала одговарајућом, осим што је због динамике раста калуса и промене боје приликом старења, супкултура рађена у различитим интервалима: на 20 дана код касне сремзе, до највише 60 дана код јапанских трешања (*Prunus serrulata*, *Prunus serrulata* 'Amanogawa' и *Prunus serrulata* 'Kanzan').

Како наводи Fajerska (2006), радова о дугом чувању растреситог, белог калуса врста рода *Prunus* у условима *in vitro* нема много. У њеном раду на шљиви, најбоље резултате дугог супкултурирања дала је MS подлога, а наводи и резултате различитих аутора са *Prunus persica* и *Prunus armeniaca* на истој хранљивој подлози. Код белог бора (Laukkanen et al., 1999) на MS измењеној подлози, свежа маса калуса расте као и сува маса. У првој и другој недељи маса се повећа у просеку 2,6 пута, док се у 6. и 7. недељи, своди приближно почетној. И код калуса тисе (Mihaljević et al., 2002) најинтензивнији пораст калуса забележен је између 13. и 20. дана и калус индукован из јувенилних ткива ембриона имао је најбржи процес индукције и пролиферације, као и повећање масе. Наводећи резултате рада и других аутора, Moore (1991) износи податак да код већине врста из рода *Prunus*, сенесценција калуса настаје око 40 дана раста на истом хранљивом медијуму.

Уједначен раст до приближно пола грама и задржавање белог калуса на

MS подлогама, показује да се ова подлога, уз одређен однос ауксина и цитокинина (2 mg/L NAA и 0,5 mg/L BAP или 2 mg/L NAA, 0,5 mg/L IBA и 0,5 mg/L BAP), могла за већину таксона издвојити као погодан медијум за раст калуса. Добијени високи проценат индукције у мраку, код већине испитиваних таксона са задовољавајућим коефицијентом пораста масе у супкултури, као и дугим одржавањем у култури (неких таксона и дуже од 2 године) говоре у прилог избору услова раста, умножавања и одржавања калусних култура истраживаних таксона.

Ипак, од свих таксона, калус магриве (*P. mahaleb*) на изабраним медијумима није дао очекивану реакцију раста после индукције. Друга појава која је забележена код магриве је интензивно потамњивање калуса. За ову појаву се може рећи да је најизраженија код експаната магриве, као и да променом медијума и чешћом супкултуром није добијен беложути растресит калус. Калус се развијао спорије у односу на друге, уз интензивно мењање боје ка смеђој. Промена боје калуса је забележена и на култивару 'Colt' али у много мањој мери. За разлику од калуса магриве, коме је појава тамне боје присутна од почетка индукције и интензивира се током супкултура, код таксона 'Colt' потамњивање се појављивало местимично у средини масе калуса а честом супкултуром (на сваких 20 дана) потамњивање код овог таксона је потпуно нестајало.

Многи до сада објављени радови се баве проблематиком „потамњивања ткива“: Tóth et al. (1994) помињу смеђе полимере фенола који онемогућавају културу *in vitro* код врста рода *Quercus* или *Pinus* (Laukkanen et al., 1999); у раду са *Uapaca kirkiana* Mng'omba et al. (2007), аутори описују повећано потамњивање и пропадање ткива, посебно код калуса који је добијен са адултних садница. У истраживањима са тисом (Mihaljević et al., 2002) забележена је екскреција пигмената или фенолних једињења у хранљиви медијум, што је имало штетан ефекат на раст и вијабилност калуса. Како наводи Sukanto (2011) потамњивање експаната у култури код неких врста може да изазове озбиљну инхибицију и престанак развоја ткива. Феноли танини или оксидовани полифеноли, ако их има у великој мери у ткивима неких биљака, имају улогу инхибитора и могу проузроковати потамњивање експаната, које може довести и до промене боје хранљивог медијума (Preece & Compton 1991). Повећање продукције фенолних

једињења изазива појачану активности неких важних ензима као што су полифенол оксидаза и пероксидаза, које конвертују феноле у токсична једињења (Wu & Lin 2002), посмеђавањем ткива. Овај феномен сматра се озбиљном препреком приликом масовне продукције секундарних метаболита кроз биопроцесе, пошто потамњивање ткива укључује многе токсичне супстанце које доводе на крају до некрозе ћелија (Wu & Lin 2002). Потамњивање или тамњење ткива проузроковано је оксидацијом фенола која је често резултат деградације ћелијских мембрана које су проузроковане токсичним формама кисеоника. Кисеоник као есенцијалан елемент за аеробан начин живота, може бити и веома штетан уколико се образују активне кисоничне форме – ROS (reactive oxygen species) које могу, за разлику од молекуларног кисеоника, да изазову неконтролисану оксидацију и деструкцију различитих компонената и једињења у ћелијама биљака (оксидативни стрес). Тај тзв. парадокс аеробиозе (да O_2 који је есенцијални елемент за живот, може имати и штетне ефекте на живе организме) могу изазвати бројни примарни стресни фактори (суша, екстремне температуре, велики интензитет светлости, соли у земљишту, изложеност озону, хербициди (пакват) и напад патогена (Stikić & Jovanović, 2012). Потамњивање спречава раст и развој експланта али се у неким случајевима може умањити додавањем антиоксиданата у хранљиви медијум (лимунске и аскорбинске киселине, тиоурејом, итд.). Поред тога пошто се посмеђивање појачава при фотоактивацији, спречавање ове појаве може се постићи држањем експланата у мраку или у условим смањене количине светлости (Pierik, 1987). Један од начина заштите биљака од оксидативног оштећења (образовања активне кисоничне форме тзв. ROS) је одржавање транспорта електрона преко фотосинтетског електрон транспортног система у условима фотоинхибиције (Stikić & Jovanović, 2012). У радовима Long et al. (1995) и Payghamzadeh & Kazemitabar (2011), чешћим супкултурама калуса на одговарајући медијумима и гајењем калуса у мраку, одложено је потамњивање калуса. У раду са експлантима и калусом магриве, примењена је чешћа супкултура као и гајење калуса у мраку, али добијени резултати нису задовољавајући.

Како је напоменуто у поглављу РЕЗУЛТАТИ РАДА, једини од истраживаних таксона чији калус има нијансе црвене боје је 'Kiku-shidare-zakura'.

Од потпуно светле, беле боје, током времена калус постаје црвен. Између 3. и 4. недеље, ако се калус не премести на нов медијум, боја постаје браон до тамно мрка после чега је наступало пропадање. Калус овог култивара није губио на маси, али се боја мењала на читавој површини (у нијансама црвене боје) и на подлогама на којима је забележен највећи пораст масе. Промена боје се може довести у везу са антоцијанима, секундарним метаболитима у ћелијама (Grotewold et al. 1998). Када су антоцијани у вакуолама, тада је боја ткива црвена. Ако се акумулирају у цитоплазми, подвргнути су оксидацији и полимеризацији и продукт оксидације постаје браон. С обзиром да су антоцијани такође и цитотоксични и генотоксични, могу да врше оксидацију протеина и уметањем у ланац DNA доводе до пропадања ћелија. Овакве промене у боји калуса наговештавају промене у метаболизму антоцијана који је у тесној вези са метаболичким стањем ћелије. У раду Zhou et al. (2002), црвени калус *Prunus incisa* Thunb. прелази у смеђу боју после 4 недеље и пропада ако се остави на истој хранљивој подлози. Феномен указује да је црвени калус под оксидативним стресом због токсичних акумулација утروшених материја из хранљиве подлоге, или због секундарних метаболита синтетисаних у ћелијама.

Добијене калусне културе свих таксона, одржаване на одговарајућим медијумима и супкултуриране у временским интервалима који су обезбеђивали задржавање форме белог, фиброзног (растреситог) калуса, употребљене су у другом делу истраживања који се односио на утврђивање компатибилности калемљења трешања *Sato-zakura* групе са домаћим подлогама, уз коришћење технике фузије калуса у условима *in vitro*. Током формирања споја калуса два таксона, потребно је нагласити да техника извођења захтева прецизност, као и да се у раду са растреситим типом калуса мора обратити посебна пажња на чињеницу да се калусне гомиле лако распадају, да их је тешко сећи и добијати жељене облике за спајање у циљу анализе самог споја. Поред тога, по формирању споја калуса у полиетиленским прстеновима, свака даља манипулација (посебно припрема спојева за анатомску и хистолошку анализу) такође се морала изводити веома пажљиво, због добијања препарата помоћу којих је било могуће објективно оценити однос два калусна ткива у споју. Самим тим, спровођење технике припреме ткива за фиксацију за анатомске анализе спојева, захтевало је извесне

модификације током самог извођења. При постављању узорака (калусни спојеви у полиетиленским прстеновима) у припремне калупе за фиксацију, неопходно је било прстен обложити филтер папиром који је онемогућавао расипање калуса у фиксативу, као и његово уклањање при наливању парафина.

Добијени резултати анатомских анализа спојева делимично су, преко анализе пектинских, фенолних и липидних једињења дали одговоре о компатибилности одабраних спојева:

Идентификацију инкомпатибилности коришћењем технике спајања калуса (методама микрокалемљења делова интернодија или самог калуса), користили су за већи број воћних врста Fujii & Nito (1972), за врсте рода *Prunus* и *Citrus* Jonard et al. (1990), за род *Prunus* Errea et al., (2001), Pina & Errea (2005), за разне врсте рода *Citrus* Nito et al. (2005) и за врло експлоатисану врсту са афричког континента *Uapaca kirkiana*, Mng'omba et al. (2007). Ранија истраживања базирала су се на испитивању јачине споја визуелним методама, да би скорија истраживања обухватила, како анатомске, тако и биохемијске анализе калуса и спојева. С обзиром да је циљ примене све три методе (визуелне оцене јачине споја, методе анатомских анализа пресека спојева и биохемијских анализа) у овом раду био утврђивање компатибилности јапанских украсних трешања и наших подлога за калемљење, дискусијом ће се обухватити најбитнији добијени резултати.

Како формирање успешног споја укључује многе процесе у које се убраја и препознавање ћелија као први корак ка компатибилности (Pina & Errea, 2005), у првом реду ће се отворити разматрање питања везаних за улогу пектинских полисахарида у процесу препознавања два различита ткива компонената калемљења.

Према распореду пектинских полисахарида на анатомским пресецима спојева калуса сва три култивара јапанских трешања, може се уочити правилност у локализацији ових једињења у спојевима са обичном трешњом, јапанском трешњом, подлогом 'Colt' и касном сремзом. Пектини су распоређени или у ћелијским зидовима (као компонента гел матрикса) или у облику неправилних, расутих површина у екстрацелуларном простору (на читавој површини анатомског пресека или спорадично). Код поменутих комбинација, разлика у

ширини слоја пектина у ћелијским зидовима није забележена ни на пресецима код којих су се калуси одвајали. Разлика је забележена у локализацији пектина у међућелијском простору између ћелија исте врсте на мањој површини у односу на ону између ћелија калуса различитих ткива. Иста појава је забележена и код успешних и код неуспешних спојева. Пектински полисахариди акумулирани су између ћелија споја у неправилним површинама дуж читавог пресека и у близини спојева и ка периферији. Код споја култивара 'Amanogawa' са подлогом 'Colt' слабије је изражено присуство пектина у ћелијским зидовима у односу на исту појаву на споју са остала два култивара. С друге стране, на анатомским пресецима споја калуса култивара 'Kiku-shidare-zakura' са касном сремзом, забележена је најобимнија количина разливених пектинских полисахарида у међућелијском простору.

Код споја са магривом, у ћелијским зидовима подлоге (калус магриве) количина пектина је већа од оне која је присутна у ћелијским зидовима племки. Поред тога није приметно нагомилавање пектина у међућелијском простору карактеристично за остале анализирание спојеве, осим код пресека култивара 'Kanzan' са овом подлогом, где су разливени пектински полисахариди присутни и јасно уочљиви на пресеку. Код друга два култивара ове површине се не јављају у међућелијском простору исте врсте калуса, а између ћелија различитих врста, јављају се ретко и спорадично.

Сличан распоред се примећује и на пресецима припреманим и бојеним за анализу пектина код друге негативне контроле (споју са крушком). У ћелијама подлоге *Pyrus communis* 'Rugodwarf' пектини су присутнији у већој количини у ћелијским зидовима и покривају мање неправилне површине између тесно збијених ћелија. С друге стране, ћелијски зидови калуса култивара су тањи, покривеност неправилних површина пектинима је мања, а њихова појава у међућелијском простору на целом пресеку је незнатна.

О улози пектинских полисахарида у спајању повређених ткива, расправе у истраживањима трају дужи низ година. Како наводе Miller & Barnett (1993) пектинске ексудате из ћелијских зидова у међућелијском простору, први пут помиње још давне 1893. године Mangin, који их успешно боји рутенијум црвеном

бојом у ткиву нарциса и диње. У наредних сто година бележи се још радова у којима се за локализацију пектина употребљава иста боја, а међу њима је посебно важно истаћи рад Yeoman et al., (1978) који постављају теорију да ексудати из ћелијских зидова могу имати важну улогу у ћелијском препознавању између ткива компатибилних или инкомпатибилних спојева код калемљења. Ексудати који садрже разложене ензиме, пектинске материје, протеине и др. отпуштају се на месту контакта различитих ћелија два ткива код калемљења, проузрокујући тањење ћелијских зидова и стварање плазмодезми *de novo* (Yeoman, 1984). Групи истраживача који подржавају теорију о ћелијском систему препознавања као прдуслову компатибилности калемљења (Jeffrey & Yeoman, 1983, Juniper & Jeffrey, 1983) супротстављају своје становиште Moore & Walker (1981), који износе претпоставку да је тек при формирању спроводних судова, могуће да ксилемски елементи и плазмодезме захтевају неки вид ћелијског препознавања и комуникације и да транслокација сигналних молекула, као што су полипептиди у флоему, може бити значајна за ћелијско препознавање и компатибилност два ткива јер до деградације долази у флоему, на самом споју. Moore (1984a) износи чињенице да у раној фази развоја калема, свакако долази до спајања ткива, јер је то пасиван процес који не захтева препознавање ћелија. Спој два ткива он објашњава као резултат нагомилавања и накнадне полимеризације материјала из ћелијског зида који се јављају као одговор на повреду ткива. Поред тога, пролиферација калусних ћелија је уобичајена реакција биљних ткива на озледу, која се јавља не само код калемљења, већ и код једноставног озлеђивања ткива, што подразумева да се као процес дешава и код компатибилних и код инкомпатибилних спојева, односно да за процес пролиферације калуса није потребан предуслов ћелијског препознавања. У истраживањима Moore & Walker (1981) механизам инкомпатибилности упоређују са основним ћелијским механизмом одбране код биљака, износећи тада хипотезу да инкомпатибилност има везе са токсичним одговором биљке. Ове тврдње Moore (1984b) потврђује у радовима са крушком и дуњом, као компонентама калемљења, наводећи да је инкомпатибилност највероватније детерминисана ослобађањем цијанида током хидролитичке активности β -гликозидазе, посебно обилног у ћелијама крушке, као одговор на присуство пруназина из ћелија дуње.

Eberhard et al. (1989) указују да фрагменти пектина имају улогу сигналних молекула у индукцији одговора на озлеђено ткиво, а Mohnen et al. (1990) раде огледе у којима додавањем пектина калусном ткиву, мењају процес формирања органа и тиме указује на улогу пектина у развићу биљака. О могућност да су пектини укључени као сигнални молекули између супротних ткива калуса код калемљења, спекулишу и Barnett & Weatherhead (1988) као и Miller & Barnett (1993) у раду са *Picea sitchensis* (Bong.) Carr. Како се на зидовима паренхимских ћелија калуса нагомилавају формације које садрже пектине, протеине, угљене хидрате и масне киселине, аутори наводе да је могуће да ове формације имају већу улогу у ћелијском препознавању и спајању ткива код калемљења. Густина ових наслага се повећава са старењем калуса и површине постају спојене и формирају неправилне површине. Ипак, и поред враћања на чињеницу да су суседне ћелије у биљном ткиву способне да комуницирају уз помоћ ћелијских лиганата и екстрацелуларних рецептора (Clark, 2001), степен међућелијске комуникације преко плазмодезми између ћелија је у релативно малом броју радова и квантификован, све до појаве истраживања Martens et al. (2006) и Pina et al. (2009, 2011). Према Pina et al. (2011) бојење паренхимских ћелија рутенијум црвеном бојом на споју калемљења даје позитивну реакцију, указујући на присуство растворљивих угљених хидрата и пектинских полисахарида у току прве недеље од формирања споја. Уједно применом неинвазивне технике FRAP (fluorescence redistribution after photobleaching) примењеном у циљу истраживања симпластичког транспорта у биљним ткивима, потврђено је да је међућелијска комуникација израженија код компатибилних него код инкомпатибилних спојева, а овај резултат је потврђен и у радовима са врстама рода *Prunus* Pina et al., 2009; и другим ткивима и типовима ћелија Martens et al., 2006).

Према изнетим спекулацијама о улози пектинских полисахарида у процесу спајања два ткива код калемљења, може се рећи да су анатомски пресеци спојева калуса култивара трешње, указали на чињеницу да се ови ексудати појављују као одговор ткива на повреду (јер су присутни и на деловима пресека где се два калуса не додирују). Али појава на коју у даљим истраживањима треба обратити пажњу, односи се на приметно мању или незнатну локализацију ексудата у међућелијском простору код пресека спојева који се нису показали успешним,

што може ићи у прилог објашњењу улоге пектинских полисахарида у раном откривању компатибилних односно инкомпатибилних спојева.

Даља оцена подударности калусних ткива, обухватила је анализу фенолних једињења уз помоћ сталних и привремених препарата и визуелну оцену спојева калуса. Од две коришћене методе за идентификацију фенолних једињења на анатомским пресецима спојева калуса, бојењем препарата толуидин плавим, добијени пресеци су давали јаснији приказ локализације ових једињења. Применом друге методе, где су привремени препарати сечени на криомикротому, дебљина сечења и раздвајање ћелија калуса током сечења, резултирали су слабијом аутофлуоресценцијом и нејасним приказом пресека односно тешким уочавањем локализације фенола на нивоу појединачних ћелија. У даљим радовима применом ове методологије потребно је превазићи проблеме који су настајали током рада.

Према добијеним резултатима анатомских пресека спојева калуса култивара јапанских трешања са калусом подлогом обичне трешње, на трајним препаратима (бојеним толуидин плавим) код култивара 'Amanogawa' фенолна једињења су локализована само при периферији спојева, при чему се може спекулисати да се ова реакција накупљања фенола у периферним ћелијама калуса може везати за старење калуса које са собом носи акумулацију фенола. На местима спајања два типа калуса, није уочена локализација фенола унутар ћелија, већ само уз ивицу ћелијског зида код калуса подлоге (обична трешња). Сличну манифестацију са овом подлогом показују и друга два култивара, осим што је код 'Kiku-shidare-zakura' интензивнија појава фенола на споју два ткива мада јаче аутофлуоресцирају површине уз ћелијски зид, без појаве јаче рефлексије светлости у линији споја калуса. Добијени резултати се за два култивара подударају са визуелном оценом спојева калуса. Обична трешња и култивар 'Kanzan' показују висок степен компатибилности и у споју калуса и на анатомским пресецима, као што оцена споја култивара 'Kiku-shidare-zakura' са обичном трешњом и анализа анатомских пресека говори о непостојању задовољавајуће подударности ова два таксона. При визуелизацији споја калуса култивара 'Amanogawa' и обичне трешње, може се говорити о нешто бољем, али не идеалном споју.

Анатомски пресеци спојева јапанске трешње (*Prunus serrulata*) са испитиваним култиварима, показали су код свих култивара, потпуну компатибилност спојева калуса. Није забележена локализација фенола у ћелијама, а визуелна оцена јачине споја је врло висока и потврђује потпуну компатибилност ових таксона, што је и разумљиво с обзиром на њихову високу сродност.

Код фузије калуса племки са калусом култивара 'Colt' уочава се интензивније обојење ткива, делимично на спојевима, а интензивније на периферним деловима калусног ткива. Ово приметно старење калуса подлоге и мењање боје, није утицало на јачину споја калуса. Појава је забележена на спојевима са сва три култивара, мада је на пресецима споја 'Kiku-shidare-zakura' и 'Colt', обојење толуидин плавом најслабијег интензитета и уочено у најмањем броју пресека. И при визуелној оцени спојева, за ову комбинацију се може рећи да је погоднија од споја са обичном трешњом. У истраживањима у пољским условима, Świerczyński & Stachowiak (2007) добијају 82,7 % успешност примања калема овог култивара на 'Colt'.

Калус култивара 'Colt' интензивније је старио и у супкултури, што се јасно показало и на анатомском нивоу у појави нагомилавања фенола у ћелијама периферног појаса. Како наводи Moore (1991), један од видова одбране унутрашњих слојева калуса је десикација и примарно пропадање спољашњих, периферних слојева калуса која је евидентна и у гајењу калуса у култури *in vitro*. Уједно, сенесценција ћелија праћена је нагомилавањем фенола (Ermel et al., 1999) што је евидентирано на пресецима бојеним толуидин плавом.

Количина присутних фенолних једињења код споја са магривом, код обе методе цитолошке анализе фенола, дала је позитиван одговор код свих спојева испитиваних таксона. На одређеним местима на пресеку код комбинације 'Kanzan'/магрива забележена је слабија аутофлуоресценција, мада је бојење толуидин плавом указивало на присуство фенола у спојевима. Код спојева култивара 'Amanogawa' и 'Kiku-shidare-zakura' са магривом, јача аутофлуоресценција наспрам тамног видног поља, издвојила је површине уз ћелијски зид код ћелија подлоге, док су код ћелија племке ове површине уочене и унутар ћелија. Бојење толуидин плавим указао је на присуство већих површина са

ћелијама код којих је целом површином ћелије боја локализовала фенолна једињења. За калус магриве, потамњивање калуса може се приписати и генотипској специфичности.

Како је већ напоменуто у претходним разматрањима, распрострањеност посмеђавања биљних ткива варира од врсте до врсте и физиолошко стање биљака понекад може драстично да смањи могућности манипулације како биљним ткивом тако и контроле процеса раста и развоја (Jones & Saxena, 2013). Мада су феноли у великој мери заступљени у здравом ткиву биљака), њихова оксидација посебно се огледа кроз одбрамбени одговор биљака на озледе или други вид стреса (Beckman, 2000. Како култура ткива подразумева рез (одвајањем експланта са матичне биљке) и постављање биљке у стресне услове раста, ово је обично окидач за производњу веће количине фенола. Слични услови се стварају и током калемљења - на племци и подлози се озлеђује ткиво чиме се оба ткива доводе у стање стреса.

Бојењем калусног ткива толуидин плавом Errea et al. (2001) разлику у обојењу фенола који се локализују уз ћелијски зид или унутар ћелија, објашњавају процесима оксидације којима феноли подлежу када се нађу слободни у цитоплазми ћелије, што доводи до токсичности ових једињења и могућности утицаја на околне ћелије и ткива. Разматрању присуства фенола код инкомпатибилних и компатибилних спојева бавили су се Mng'omba et al. (2008) испитујући калусне спојеве врста *Uapaca kirkiana*, *Uapaca nitida* Mull. Arg. и *Jatropha curcas* L. Врсту *Uapaca kirkiana* карактерише велика продукција фенола и ексудати у медијуму у великим количинама су утицали на успех огледа у фузији калуса. С друге стране у раду је разматрано да ли је накупљање фенола у калусном ткиву споја индикатор инкомпатибилности. Природа и квантитет фенолних једињења на споју, према Errea et al. (1994b) могу бити важан фактор у дететрминацији компатибилности калемљења, а присуство фенола у ћелијама може указати на потенцијалну инкомпатибилност споја (Errea et al., 2001). У истраживањима на пољу међусобне инкомпатибилности дуње и крушке (Ermel et al., 1999), наводе да се граница између ткива подлоге и племке, боји толуидин плавом различитим интензитетом, што је резултат измењене количине полифенолног садржаја у ткиву племке и ћелијама које су лоциране близу споја.

Акумулација флаванола непосредно изнад споја код инкомпатибилних спојева кајсија/шљива, такође указује на типичан симптом локалног типа инкомпатибилности (Errea et al., 1994b). До сличног закључка долазе и Nito et al. (2005) анализирајући компатибилне и некомпатибилне спојеве врста у роду *Citrus*: код спајања калуса таксономски удаљених врста, ивицом споја после бојења сафранином, идентификована је сенесценција ћелија, уз напомену да је биохемијска природа акумулираних супстанци у ћелијама остала неидентификована.

Добијени резултати анализе спојева три култивара украсних трешњи и магриве, указују да се спојеви могу сврстати у инкомпатибилне, посебно спој 'Amanogawa'/*Prunus mahaleb*. Делимичан успех постоји код спајања друга два култивара са истом подлогом, али ако се проценат успешности у лабораторијским условима креће око 44 %, комбинација се не може сматрати компатибилном, поготово што низак проценат срастања обично не искључује каснија одбацивања, односно појаву одложене инкомпатибилности која је за струку посебно значајан проблем. Према наводима Krusmann et al. (1981) магрива се није показала као одговарајућа подлога за јапанске трешње.

Анатомска анализа спојева који су у експерименту коришћени као негативна (инкомпатибилна) контрола обухватила је спојеве калуса јапанских украсних трешања са таксонима *Prunus serotina* и *Pyrus communis* 'Pyrodwarf'. Са ткивом касне сремзе, сва три култивара украсних трешања показују одређен степен компатибилности. На спојевима ћелија, осим спорадичних места на пресеку, нема знакова нагомилавања фенолних једињења. Обе методе за идентификацију фенола (аутофлуоресценција и бојење толуидин плавом, нису дале резултате којим би се могла потврдити инкомпатибилност ових таксона. Ако томе придодемо и визуелну анализу спојева која се такође показала позитивна за ове спојеве, долази се до закључка да би за будућа истраживања било значајно испитати евентуално могућност коришћења ове врсте као потенцијалне подлоге за калемљење јапанских култивара. У пољским условима ова спекулација би се могла јасно потврдити или одбацити.

За калус *Pyrus communis* 'Pyrodwarf' преко анализе анатомских пресека,

одређена обојења потврђују присуство фенола у спојевима калуса и по њима би се могло рећи да се ради о инкомпатибилним комбинацијама (конкретно бојење толуидин плавом), али аутофлуоресценција калусног ткива није код ових спојева била интензивна. На спојевма култивара 'Amanogawa' и 'Kanzan' са крушком, процес бојења фенола резултирао је издвајањем јасно обојених зона на површинама између споја две врсте калуса. Најјасније издвојене површине уочавају се и код пресека бојених сафранином и алцијан плавом, али се и код бојења толуидин плавом, могу издвојити ћелије у којима има веће количине фенолних једињења. На спојевима 'Kiku-shidare-zakura' / *Pyrus communis* 'Rugodwarf' феноли су локализовани на рубним деловима групација ћелија без формираног споја калуса различитих таксона. С обзиром да је слаб степен потамњивања калуса, на пресецима нема ни јачих обојења зона у којима се види старење калуса. Једини јасан знак инкомпатибилности култивара крушке и култивара јапанских трешања добијен је визуелном оценом спојева калуса. Без обзира што калус ниједне од спојених комбинација није мењао боју на споју, они су остајали неспојени код свих узорака.

Према објашњењима Moore (1984b) токсини који су одговорни за инкомпатибилност не морају индуковати некрозу на споју, мада се појава некрозног слоја евидентира као одговор код инкомпатибилних спојева. Врло често ови токсини имају улогу да калусне ћелије онемогуће да реагују на морфоген (најчешће ауксин) који промовише формирање успешног споја. Сходно томе, не долази до редиференцијације, ћелије се неисхрањују, долази до десикације и пропадања споја калема. И у раду Moing & Carde (1988) при калемљењу бресква на миробалану, није долазило до формирања некрозног слоја на споју, иако је спој био инкомпатибилан.

Сличне податке у визуелној анализи раздвајања спојених калуса добили су и Jonard et al. (1990). Приликом оцене спојева калуса, код инкомпатибилних комбинација, калус је настављао да расте, без спајања. За компатибилне спојеве ово се дешавало у око 33 % случаја. Појава некрозе између калуса забележена је на 69 % код инкомпатибилних и на 29 % код компатибилних спојева, док је потпуна фузија (без појаве некрозе калуса) забележена код хомеопластичних спојева (72 %). Аутори истичу и појаву да је код инкомпатибилних *in vivo* спојева,

долазило у мањем проценту до формирања успешних спојева у *in vitro* условима. У пољским условима спојеви су такође опстајали, али су били слабији и врло подложни пуцању при јаким ударима ветра. Ови подаци се, како наводе Jonard et al. (1990), слажу и са претходним истраживањима Fuji & Nito (1972) и Yeoman (1984). У анализи фузије калуса два култивара кајсије са три подлоге, Errea et al. (2001) добијају сличан одговор компатибилних и инкомпатибилних спојева после 7 дана, али су разлике евидентне после 14. и 21. дана. Око 60 % успешних компатибилних спојева у односу на потпуно неуспешно формирање спојева код инкомпатибилних је забележено после две недеље, а 70 % у односу на 25 % после 21. дана.

За приказане резултате и методе може се рећи да указују на постојање подударности између ткива калуса спојених у условима *in vitro*. Анатоомски пресеци, уз одређене модификације методе фиксације калусних спојева, могу се користити за локализацију једињења која имају значајну улогу у процесу калемљења и спајања ткива подлоге и племке. Али, непотврђени резултати добијени кроз поменуте анализе као и немогућност квантификације свих мерних параметара у поменутим анализама, наметнули су потребу за додатним биохемијским анализама одређених једињења (на првом месту полифенолних). Њиховом квантификацијом омогућено је да се подробније анализирају и провере већ добијени резултати хистолошких и визуелних анализа спојева. Поред тога, прегледом скорије литературе, приметан је све већи број извора у којима је акценат истраживања пребачен на поље различитих биохемијских анализа.

Већ је поменуто да биљне врсте имају карактеристичан генетско наслеђени фенолни профил који је настао као последица еволуције, односно промена које су биле нужне за опстанак одређене биљне врсте. Заправо, полифеноли су присутни у свим врстама биљног ткива и не утичу на нормалан раст и развој биљке, али поред тога што имају више функција (нпр, заштита од екстремних температура, суше, алкалитета, салинитета и UV зрачења), према (War et al., 2012) ова једињења смањују осетљивост биљака на штеточине. Биљке дакле, приликом различитих услова стреса, продукују већу количину секундарних биљних метаболита што указује на одбрамбену улогу фенолних једињења у биљци и упућује на одговор биљке на стрес (Fotirić Akšić et al., 2015). Слично поменутим

реакцијама, приликом озледе ткива током калемљења, биљка на изазване услове стреса одговара такође повећаном продукцијом фенолних једињења.

Анализом укупних фенола у спојевима калуса, забележен је пораст у количини ових једињења на већини хетеропластичних у односу на хомеопластичне спојеве: код спојева са касном сремзом, где су забележене најниже концентрације укупних фенола до спојева са магривом, на којима је забележен вишеструко повећање у односу на све остале спојеве. Добијени резултати у складу су са појавом посмеђавања калуса која је забележена код магриве и подлоге 'Colt'. Код ова два таксона измерене су и највише вредности за садржај укупних фенола. Како се анализом укупне количине фенола не добија јасна слика утицаја појединачних, или групе полифенолних једињења, урађена анализа појединачних полифенола, појаснила је значај улоге одређених једињења при спајању калуса различитих подлога и племки.

У екстрактима калуса хомео и хетеропластичних спојева добијених помоћу киселог ацетона, на 9 анализираних таксона идентитиковано је 21 једињење из различитих фенолних класа. Од присутних флавонола: ескулина, катехина, кверцетина, рутина, хиперозида, астрагалина и кемферола, на свим спојевима у различитим концентрацијама детектовани су ескулин, рутин и хиперозид. Од ова три поменута једињења ниједно не показује значајно повећање концентрације на спојевима, сем хиперозида који на спојевима украсних трешања са касном сремзом и култиваром 'Colt' бележи повећање до максималних 0,056 јединица. За катехин, најчешћи показатељ инкомпатибилности калемљења (Treutter & Feucht, 1991; Errea, 1998; Usenk et al., 2006), осим код спојева јапанских трешања са магривом, анализом није детектовано присуство у другим спојевима. Катехин се не јавља у калусу ниједне врсте подлоге, а у калусу племки је заступљен у количинама: 'Amanogawa' – 1,269 mg/L, 'Kanzan' – 2,519 mg/L и 'Kiku-shidarezakura' – 1,173 mg/L. У спојевима, количина која се детектује, мање је концентрације од оне забележене у појединачном калусу. Од преосталих једињења из ове групе, повећање концентрације на споју забележено је за кверцетин на спојевима култивара 'Amanogawa'/*P. avium*, и 'Amanogawa'/'Pyrodwarf'; и благо повећање концентрације на споју 'Amanogawa'/*P. serotina* и 'Kanzan'/*P. avium*.

Од детектованих флавонола: цинарозид, апигетрин, апин, лутеолин, посматрано у односу на процентуално учешће у односу на све детектоване полифеноле, цинарозид (Luteolin 7-O-glucoside), на неким спојевима има учешће и око 60 % у односу на укупан садржај свих полифенола. Код магриве је детектован у највећим концентрацијама – на хомео споју (3.3.) у вредности од 9,743 mg/L али и за ово једињење важи да на спојевима са другим врстама, концентрација опада: скоро 5 пута на споју магриве и обичне трешње (3.1.), а 2 пута на спојевима са свим јапанским трешњама. Спојеви код којих се концентрација цинарозида повећава су спојеви 'Kiku-shidare-zakura'/*P. avium*, *P. serrulata*/*P. avium*, 'Kanzan'/'Colt' и 'Kiku-shidare-zakura'/'Colt'. За остале флавононе незнатна је разлика у количини учешћа у спојевима – апигетрин се у свим спојевима јавља у константним концентрацијама 0,012 и 0,013 mg/L; лутеолин или није детектован у свакој од компоненти споја, или га нема у самом споју; апигенин се појављује у малим концентрацијама са учешћем у укупном садржају полифенола до 1%, а кемферол и апин скоро да нису детектовани, осим – првог у калусу магриве (без појаве на спојевима) и апина у споју обична трешња/магрива (0,061 mg/L).

Већи број аутора врши квантификацију полифенола и анализира разлику у количинама које се појављују у спојевима калуса две компоненте калемљења, због могућности да она може бити узрок метаболичке дисфункције на споју (Errea et al., 1994b; Errea, 1998; Pina & Errea, 2005; Usenik et al., 2000, Aloni et al., 2006; Koeperke & Dhingra, 2013). Према резултатима истраживања Usenik et al. (2006) висока концентрација катехина и епикатехина има значајну улогу у инкомпатибилности код дуње, а мање компатибилне комбинације кајсије показују висок ниво флавонола, катехина и епикатехина (Musacchi et al., 2000). Peer et al. (2001) указују да флавоноиди највероватније могу да функционишу као ендогени регулатори поларног транспорта ауксина, јер се агликони флавоноида надмећу за везујућа места на мембранама где су концентрисани ефлукс носачи. Кверцетин, апигенин и кемферол могу надмашити ауксин у везивању за места на плазма мембрани (Jacobs & Rubery, 1988). Од поменутих једињења из групе флавонола, за које је потврђена негативна улога у формирању споја, у истраживањима фузијом калуса са јапанским трешњама у самом споју, повећање концентрације је

забележено за кемферол (на поменутиим спојевима) и кверцетин, док за катехин није детектовано повећање концентрације ни код једне комбинације (и код спојева са магривом, у чијем калусу је забележена највећа концентрација катехина, долази до смањења концентрације овог фенола у споју). Иако се акумулација катехина изнад споја калема, према радовима Errea et. al. (1992), De Cooman et al. (1996), Musacchi et al. (2000) и Usenik et al. (2006) може узети као биохемијски маркер за инкомпатибилност калемљења, у огледима са фузијом калуса у помемутим комбинацијама ова поставка није потврђена, што може указати или на компатибилност калуса, или потребу за детаљнијим истраживањима применом поменуте методе. Треба имати у виду да се концентрација флавонола (катехина и проантоцијанида) повећава врло брзо као резултат стреса индукованог озлеђивањем ткива после калемљења. Појавом прекида на мембрани вакуола, феноли који су ослобођени из вакуоле прелазе у цитоплазматични матрикс где долази до оксидације пероксидазом и фенол оксидазом (Hartmann et al., 1997) што проузрокује дисфункцију у расту и утиче на синтезу лигнина или индукује хормонски дисбаланс (Gainza et al., 2013). Све ове манифестације забележене су у горепоменутиим радовима директно на ткиву подлоге и племке, док се фузијом калуса у условима *in vitro*, спајају ткива код којих је много мањи ефекат реакције озлеђеног ткива.

Удео баикалеина и нарингенина (једини флаванонин од флавоноида) и флоризина (дихидрохалкон) се креће са максималним садржајем од 0,156 mg/L за баикалеин, 0,197 mg/L за нарингенин и 0,261 mg/L за флоризин. Према добијеним односима мерења баикалеина и нарингенина у спојевима јапанских трешања и домаћих подлога, забележена је потпуно идентична матрица односа повећања или смањења ова два једињења. Повећање се јавља код сва три култивара у спојевима са култиваром 'Colt'/*P. serotina*, 'Amanogawa'/*P. serotina*, 'Kanzan'/'Pyrodwarf' и 'Kiku-shidare-zakura'/*P. avium*, 'Kiku-shidare-zakura'/*P. serotina* и 'Kiku-shidare-zakura'/'Pyrodwarf'. Као последица инхибиције ауксинског транспорта, постављање биљака на нарингенин доводи до појаве гравитропизма и инхибиције раста (Jacobs & Rubery, 1988). Међутим, како гликозилација омета везивање, само су агликони активни инхибитори ауксинског транспорта (Bernasconi, 1996). У ткиву ксилема, прунин и нарингенин, који се акумулирају на хетеропласичном

споју, могу утицати на затварање места озледе. Према истраживањима (Feucht et al. (1988) утврђена је улога нарингенина као инхибитора раста који промоцијом активности гиберелина стимулише IAA оксидазу. Ако се узме у обзир да чак и релативно мала количина фенола може бити довољна да изазове дисфункцију споја код калемљења (Errea, 1998), потребно је у даљим истраживањима детаљније утврдити утицај баикалеина и нарингенина на поменуте комбинације спојева.

Од хидроциметних фенолних киселина у испитиваним комбинацијама спојених калуса, детектоване су: р-кумаринска киселина, кофеинска, ферулинска, елагинска, синапинска и неохлорогена киселина (5-O-Caffeoylquinic acid). У највећем броју спојева јавља се р-кумаринска киселина са концентрацијама које варирају. У најнижим концентрацијама је има у свим таксонима јапанских трешања, а у спојевима 'Amanogawa'/*P. serrulata* и 'Kanzan'/*P. serrulata* ово једињење није детектовано (иако се јавља у калусима који чине спој, када се гаје изоловано). Пад у садржају овог једињења бележи се на спојевима могућих посредника при калемљењу - спојевима *P. avium*/*P. serrulata*, 'Colt'/*P. serrulata*, *P. avium*/*P. mahaleb* и споју 'Kanzan' /*P. mahaleb*. Комбинације спојева у којима је забележена незнатна, блага промена р-кумаринске киселине су спојеви 'Kanzan'/'Colt', 'Kanzan'/*P. avium*, 'Kiku-shidare-zakura'/*P. avium*, 'Kanzan'/*P. serotina* и 'Amanogawa'/'Pyrodwarf'. На крају, спојеви у којима је детектован скоро два пута већи пораст концентрације су: 'Amanogawa'/*P. avium*, 'Kiku-shidare-zakura'/'Colt', *P. mahaleb* /*P. serrulata*, 'Amanogawa'/*P. serotina*, 'Kiku-shidare-zakura'/*P. serotina* и 'Kiku-shidare-zakura'/'Pyrodwarf'.

У истраживањима у култури *in vitro*, микрокалемљењем са врстом *Eucalyptus gunnii* Hook. De Cooman et al. (1996) добијају поред осталог и статистички значајне разлике у садржају р-кумаринске киселине код инкомпатибилних спојева. Двадесет дана после калемљења, поред катехина, повећан је садржај р-кумаринске киселине. Насупрот повећању концентрације овог фенолног једињења код инкомпатибилних спојева, у истом раду наводе и смањење концентрације у компатибилним спојевима. И у радовима са инкомпатибилним врстама из рода *Prunus*, забележен је пораст р-кумаринске киселине (Schmidt & Feucht, 1982; Gebhardt & Feucht, 1982; Usenik et al., 2006).

Потврду значаја утицаја ове хидроциметне фенолне киселине у формирању успешног споја код калемљења Usenik et al. (2006) истичу уз напомену, да поред ове, посебно треба обратити пажњу на концентрације других, идентификованих и неидентификованих фенолних једињења чија је матрица понашања у споју слична катехину и р-кумаринској киселини.

Давно је доказано да је једна од најважнијих супстанци која је укључена у развој компатибилног споја, ауксин (IAA) који се ослобађа из спроводних судова подлоге и племке и индукује диференцијацију васкуларног ткива (Moore, 1984a; Mattson et al., 2003). Поред ауксина и остала једињења као што су полифеноли, имају важну улогу у формирању споја. У биљним ткивима деградација IAA се врши декарбоксилацијом помоћу ензима IAA оксидазе, а како су монофеноли (на пример р-кумаринска киселина) кофактори односно активатори ових ензима, њиховим учешћем се смањује ниво IAA у ткивима (Nešković et al., 2010). Још шездесетих година прошлог века доказано је да је В-прстен флавоноида укључен у деградацију IAA, док су флавоноиди са дихидрокси В-прстеном инхибирали IAA деградацију: дакле, р-кумаринска киселина је антагонист или кофактор ауксин оксидазе (Stenlid, 1976; Lockard & Schneider, 1981). На основу одговарајућег математичког модела примењеног за обраду флуоресцентних микроскопских слика, пронађено је да у биљкама које су изложене механичком стресу, постоји пораст у количини р-кумаринских јединица, што повећава механичку крутост, преко паралелног паковања дугачких ланаца наизменичних С-С и С=С веза (Đikanović-Golubović, 2013).

Од осталих хидроциметних киселина, кофеинска киселина варира у концентрацијама у малом опсегу (између 0,364 и 0,39 mg/L) у свим спојевима где је детектована. Ферулинска, елагинска и синапинска нису детектоване на хомеоспојевима јапанских трешања осим код култивара 'Kiku-shidare-zakura'; елагинска и синапинска ни код магриве и касне сремзе, синапинска ни код обичне трешње, а ферулинска ни код 'Colt'.

Ферулинска киселина није детектована код култивара 'Colt', ни на хомеоспојевима јапанских трешања осим код култивара 'Kiku-shidare-zakura'; елагинска киселина ни на хомеоспојевима јапанских трешања ни на ткиву

магриве и сремзе, а појаве синапинске киселине нема код обичне трешње и хомеоспојева јапанских украсних трешања. Ипак на спојевима сва три култивара јапанских трешања са култиваром 'Colt', споју 'Amanogawa'/*P. avium* и *P. mahaleb*/*P. avium* бележи се пораст синапинске киселине иако у екстрактима основних врста, киселина није детектована. Слична појава забележена је и са ферулинском киселином на нешто мањем броју спојева. Уједно на спојевима 'Kiku-shidare-zakura'/*P. avium* 'Kanzan'/*P. avium* концентрација ове киселине опада, а на споју 'Amanogawa'/*P. serotina* количина са 0,047 расте на 0,11 mg/L.

Према резултатима објављеним у раду са таксонима рода *Vitis* spp. Canas et al. (2013) наводе да је синапинска киселина у мањој количини заступљена у инкомпатибилним него у компатибилним спојевима, мада према Musacchi et al. (2000) висока концентрација ферулинске и синапинске киселине на калусном споју највероватније је у вези са биосинтезом лигнина. Наиме, у биљкама је ферулинска киселина присутна знатно мање од кониферил алкохола, отприлике у односу 9:1 у нормалним физиолошким условима и има улогу у стварању ковалентних веза у лигнинским структурама, што омогућава неопходну чврстину ћелијског зида (Anterola & Lewis 2002). Како је познато да је еколошка и физиолошка адаптација током еволуције биљака, праћена специфичним променама у структури лигнина, из овога следи, да се може направити шири закључак - да биљке под стресом производе лигнин са дужим коњугованим структурама да би повећале јачину и крутост ћелијских зидова (Đikanović-Golubović, 2013).

Canas et al. (2013), такође потврђују да су компоненте које су потенцијално означене као индикатори инкомпатибилности: катехин, епикатехин, ферулинска и кафеинска киселина јер је забележена њихова већа акумулација изнад споја, мада треба имати у виду да је кафеинска киселина инхибитор ензима IAA оксидазе и да отуда повећава ниво IAA у ткивима (Kebert 2014). Све недоумице на овом пољу истраживања указују да је често узрок оваквих догађаја комбинација метаболита, пре него присуство само једног једињења (Hall, 2006; Hardy & Hall, 2012) и да је комплекс физиолошких поремећаја у вези са присуством, или одсуством, или интеракцијом специфичних комбинација метаболита.

На основу прикупљених резултата визуелних, анатомских и биохемијских анализа спојева калуса између јапанских трешања и домаћих подлога добијени резултати указују на потенцијално добре (компатибилне) спојеве и оне за које се може рећи да указују на одређен облик неподударности (инкомпатибилности) између ткива калуса две врсте.

Према резултатима свих анализа, за сва три култивара најпогоднија подлога је *P. serrulata*. Спајањем калусног ткива добијени су резултати који ниједним оцењиваним параметром не указују на дилему компатибилности ове подлоге и три истраживана таксона. Код спојева са осталим таксонима, који су коришћени као подлога, појављују се вредности у различитим анализама које могу указати на постојање одређеног степена неподударности. Спајањем калуса култивара 'Аманогава' са калусом обичне трешње (*Prunus avium*), која је код нас у комерцијалној производњи украсних биљака најчешће коришћена подлога за калемљење јапанских украсних трешања, детаљи анатомских пресека са локализацијом фенола, визуелна анализа при којој је забележено око 70 % јаких спојева и повећање концентрације фенолних једињења на споју, упућују на закључак да се и у пољским условима може очекивати одређени проценат неуспешно формираних спојева. Сличан резултат се добија и при спајању калуса 'Kiku-shidare-zakura' са *Prunus avium*, односно, ова подлога се према добијеним резултатима, може сматрати потпуно одговарајућом само за култивар 'Kanzan'.

За култивар 'Colt' може се рећи да је погоднија подлога од обичне трешње за култивар 'Аманогава', док се према резултатима спроведених анализа за остала два култивара мора рачунати на одређен степен могуће инкомпатибилности. За култивар 'Kanzan', поред визуелне успешности споја од 64,2 %; локализацију фенола у цитолошким анализама и повећање садржаја већине појединачних полифенола у споју, треба рачунати и на чињеницу да ова, мање бујна подлога од обичне трешње, можда не би ни по хабитусу одговарала жељеној форми овог култивара. 'Kanzan' се често користи у дрворедној садњи где се рачуна са добрим, дугим деблом, чистим од грана на висини преко 2,2 m, особином која се остварује калемљењем на обичној трешњи. За спојеве жалосне форме култивара 'Kiku-shidare-zakura' са култиваром 'Colt', резултати визуелног прегледа спојева (са око 90% успешних) као и анатомске анализе указују на висок

степен компатибилности. Ипак, повишене концентрације појединачних полифенола, упућују да треба рачунати са могућом појавом инкомпатибилности ова два таксона.

За магриву као потенцијално погодну подлогу за калемљење ових култивара нису добијени потврђујући позитивни резултати. Велика количина фенолних ексудата која је потврђена у анализи укупних фенола и мали проценат спојених калуса (само 8,9 % успешних спојева са култиваром 'Amanogawa', 44,4 % за друга два) указују на овакав закључак. Једина недоумица која се јавља односи се на резултате анализа појединачних полифенола при којој није забележен раст вредности на спојевима која превазилази оне добијене код појединачних калуса који чине спој. Ипак треба имати у виду да су за калус магриве читаване значајно више вредности (2 до 4 пута веће у односу на вредности добијене за култивар, односно спој). Оно што се свакако мора узети у обзир то је да су једино узорци калуса магриве имали знатно јачи степен потамњивања клауса приликом свих анализа. Сходно томе, за доношење потврђујућих оцена да се ова врста не препоручује као подлога за калемљење ова три генотипа јапанских украсних трешања, потребно је поновити неке од урађених анализа.

Код споја са касном сремзом, с обзиром да је калус ове врсте коришћен као негативна контрола, добијени резултати указују на потенцијално постојање одређеног степена компатибилности ове врсте са три таксона украсних јапанских трешања. Параметри визуелне оцене споја (успех спајања са култиварима 'Kanzan' и 'Kiku-shidare-zakura' се креће око 60 %, а са 'Amanogawa' само 22,2 %) и анализе анатомских пресека, подржане су и резултатима за укупне и појединачне феноле код хемијских анализа. Количина укупних фенола даје најниже вредности за калус касне сремзе, а у анализи појединачних фенола, пораст који се јавља на спојевима код пет полифенолних једињења је у вредности од 0,02 јединице (mg/L). Повећање вредности за р-кумаринску киселину у спојевима касне сремзе са култиварима 'Amanogawa' и 'Kiku-shidare-zakura', указује на опрез при тумачењу. С обзиром да је ово једна од потврђених хидроциметних фенолних киселина која указује на знаке инкомпатибилности, сремза се не би могла предложити као потенцијално одговарајућа подлога,

посебно не за култивар 'Amanogawa'. За култивар 'Kanzan', разлика није забележена ни код једног мерења (ни за р-кумаринску киселинину) и за овај култивар постоји највећа могућност коришћења касне сремзе као потенцијалне подлоге за калемљење. Ако се узму у обзир позитивне особине касне сремзе као дрвенасте врсте и њену могућност прилагођавања различитим условима средине, потребно је у даљим истраживањима потврдити (или одбацити) ове спекулације постављањем пољских огледа.

За потврду инкомпатибилности фузије калуса истраживана три култивара и култивара крушке, најјача потврда је добијена визуелном оценом успешности, која је у свим случајевима са свим култиварима износила 0 %. Хистохемијске анализе указале су на одређене симптоме инкомпатибилности али анализа појединачних и укупних фенола није тако јасно одредила култивар *Pyrus communis* 'Pyrodwarf' као инкомпатибилну подлогу. Наиме, вредност садржаја укупних фенола и вредности појединачних полифенола код калуса овог култивара су релативно ниске у односу на калусе осталих таксона. Поред тога, код анализе појединачних полифенола, мада су спајани калуси генетски удаљених таксона, где би се очекивао раст у концентрацији полифенолних једињења, добијен је одговор у доста ниским вредностима. Узрок можда треба тражити и у пореклу калуса *Pyrus communis* 'Pyrodwarf' који је коришћен у анализи. С обзиром да је индукован из биљчица које су гајене у култури, а чија је физиолошка старост (односно јувенилност) потпуно другачија од ткива осталих таксона, претпоставка је да је на добијене резултате могла утицати старост ткива. Како наводе аутори Preece & Compton, 1991; Feeney et al., 2007; Mng'omba, et al., 2007; Wu et al., 2010; Sukanto, 2011) садржај полифенола, самим тим и потамњивање ткива, значајно је мање код јувенилних ткива. У правцу тих тврдњи могу се коментарисати и добијени резултати у овој тези. Да би се потврдиле ове недоумице, у наредним огледима у фузији калуса, потребно је уједначити све параметре који могу да имају утицај на анализу, односно за индукцију калуса култивара *Pyrus communis* 'Pyrodwarf' експланте је потребно узимати са нешто старијих матичних стабала (већ аклиматизованих у расту у условима *in vivo*).

6. ЗАКЉУЧЦИ

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

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

- Матична стабла таксона са којих се узимају експланте за индукцију калуса за утврђивање компатибилности, треба да буду приближно исте физиолошке старости (оптимално је да су у јувениланој доби – до 6 година старости или да је извршена рејувенилизација ткива, која се остварује резивањем и калемљењем).
- Одрвењени летораста са којих се узимају пупољци за културу, треба да су у периоду дубоког мировања када се урањају основом у воду и уносе у заштићени део лабораторије са просечном температуром око 20 °C. Током наредног периода (између 10 и 15 дана) када дође до размицања спољних љуспи пупољака, одсецају се сегменти летораста са једним бочним пупољком и уводе у процедуру стерилизације.
- За успостављање стерилне *in vitro* културе калуса, из меристемима бочних пупољака са успехом је примењен третман површинске стерилизације испирањем пупољака у проточној води 1,5 до 2 часа, 70 % етанолу у трајању од 1' 20'' и 10 % (v/v) раствору NaOCl у трајању од 12 минута.

- Вегетативни делови летораста, ламина листа, дршка и део избојка са пупољком, сакупљени са матичњака 4 недеље после цветања, су се показали одговарајућим извором експланата за убрзану индукцију калуса у *in vitro* условима.
- Успешна стерилизација вегетативних делова извршена је када су стерилисани нижом концентрацијом реагенса: 2 % (v/v) NaClO (0,4 % w/v NaClO) али дужег тарајања третмана стерилизације – 2 сата.
- На избор најпогодније хранљиве подлоге за индукцију калуса, поред генотипа највише је утицао однос ауксина и цитокинина у подлози, али се за сваки генотип показало да је неопходно присуство хормона. За већину генотипова, одговарајући однос ауксин:citoкинин је 4 : 1.
- Од три коришћена ауксина (NAA, 2,4-D и IBA) најпогоднији за индукцију и раст калуса у супкултури је NAA у концентрацији 2mg/L. За неке генотипове могуће је користити 2,4-D у истој концентрацији, као замену (*P. avium*, 'Colt', *P. serotinu* и 'Kanzan'), док се у поменутиим концентрацијама и као једини извор ауксина, IBA показао неодговарајућим за индукцију калуса код истраживаних таксона. IBA је дао добар одговор као додатна количина ауксина од 0,5mg/L уз NAA. Одговарајућа концентрација цитокинина (BAP) је била 0,5mg/L.
- За највећи број таксона, од три коришћене хранљиве подлоге (MS, SH и WP), најпогоднија у процесу индукције калуса се показала хранљива подлога MS са 30 gL⁻¹ сахарозе, 6,5 gL⁻¹ агара, 100 mg/L иносола, рН вредности од 5,7 – 5,8. За обичну трешњу и култиваре 'Kanzan' и 'Colt' у процесу индукције калуса из пупољака или вегетативних делова летораста, одговарајућом се може сматрати и SH подлога, а за врсту *Prunus mahaleb* као најпогоднији медијум за процес индукције и раст калуса се издвојио WP.
- Од већег броја медијума и њихових формулација најпогоднијим за успешну индукцију, одржавање и умножавање калуса за највећи број

таксона: *P. avium*, *Prunus* 'Colt', *P. serrulata* и *P. serrulata* 'Kanzan' показала се MS2 (NAA 2 mg/L, BAP 0,5 mg/L) и MS4 (NAA 2 mg/L, IBA 0,5 mg/L и BAP 0,5 mg/L) подлога; само MS2 подлога за *P. serotina* и *P. serrulata* 'Amanogawa' и на MS4 – *P. mahaleb* и *P. serrulata* 'Kiku-shidare-zakura'.

- Време између две супкултуре зависло је од брзине старења калуса и евентуалне промене боје (потамњивање калуса). У најкраћем временском периоду (20 дана) вршена је супкултура калуса *P. serotina* и *Prunus* 'Colt', 20 до 30 дана премештана је калусна култура *P. serrulata* 'Kiku-shidare-zakura', *P. avium* и *P. mahaleb*, док се за *P. serrulata*, *P. serrulata* 'Kanzan' и *P. serrulata* 'Amanogawa' супкултура могла обављати у интервалима од два месеца.
- Услови мрака, температура од $23 \pm 2^\circ\text{C}$ и избор одговарајућег хранљивог медијума за већи број таксона могу се сматрати одговарајућим за културу калуса, што је потврђено коефицијентом пораста масе калуса у супкултури, као и дугим одржавањем калуса у култури (неких таксона и дуже од 2 године).
- Калус магриве карактерише јако посмеђивање, од момента индуковања калуса из експланта и без значајније промене у интензитету боје и после супкултуре. Калус култивара 'Kiku-shidare-zakura' временом поприма црвену боју која се интензивира у периоду до 20. дана, али и слаби по премештању на свежу хранљиву подлогу (супкултуром), што се није показало правилом и за калус магриве.
- Калус магриве (*P. mahaleb*) на изабраним медијумима није дао очекиван и задовољавајући одговор, ни кроз калогенезу ни кроз раст калуса после индукције.

Применом методе спајања калуса (фузијом калуса) у *in vitro* условима, визуелном оценом спојева калуса два таксона и хистохемијским анализама, добијени резултати су указали на постојање компатибилности између култивара

јапанских цветајућих трешања из групе *Sato-zakura* и наших домаћих подлога, као и назнаке које од њих не треба користити приликом калемљења ове групе украсних дрвенастих врста:

- Метод визуелне оцене јачине споја калуса две компоненте калемљења (кроз проценат успешно спојених делова калуса и степена јачине самог споја) може се сматрати применљивом методом за овај вид анализе подударности две различите компоненте калемљења, не само код испитиваних таксона него и шире. Добијањем довољне количине калуса после индукције, метода спајања калуса за визуелну оцену споја је знатно једноставнија за извођење од методе формирања споја за анатомску анализу.
- Спојеви који су визуелном анализом сврстани у јаке (*P. serrulata/P. serrulata* 'Amanogawa', *P. serrulata/P. serrulata* 'Kanzan', *P. serrulata/P. serrulata* 'Kiku-shidare-zakura', *P. avium/P. serrulata* 'Kanzan') добили су потврду компатибилности и у хистохемијским анализама.
- Насупрот томе, спојеви код којих хистохемијским анализама није поуздано утврђена инкомпатибилност (спојеви сва три култивара јапанских украсних трешања са култиваром *Pyrus communis* 'Pyrodwarf') у визуелној оцени јачине споја показали су јасне знаке неподударности – ткива калуса су се лаким одвајала и после 20 дана од спајања.
- За врсте спојева који су у визуелним оценама указали на компатибилност, али су било кроз анатомске или хемијске анализе доведени у сумњу (спојеви култивара јапанских трешања са подлогом *Prunus* 'Colt'), предлаже се успостављање пољских огледа путем којих би се потврдили или одбацили резултати добијени спајањем калуса *in vitro*.
- После коришћења различитих метода анатомских анализа пресека калусних спојева може се донети закључак да је за потврду неких резултата добијених применом ове методе, неопходна и препоручљива додатна хемијска и визуелна анализа спојева калуса.

- Прецизнији пресеци, самим тим и одговори су добијени на трајним у односу на привремене препарате. Иако једноставност извођења технике припреме калуса и прављење привремених препарата, фаворизују криомикротомску методу, немогућност добијања танких пресека и успешно избегавање растурања калуса током фиксирања и калупљења ледом, нису у потпуности превазиђени у овом раду.
- Анатомске анализе су међутим указале на значајне манифестације на ткиву спојева калуса, као што је присуство веће количине пектинских полисахарида код потенцијално компатибилних спојева, на супрот мањој количини ових једињења код инкомпатибилних, а бојење рутенијум црвеном бојом се показало врло ефикасним у локализацији пектина у паренхимским ћелијама калуса.
- Бојењем толуидин плавом и алцијан плавом и сафранином су доста прецизно локализовани феноли, као и сенесценција ткива, што може да укаже на ране знаке неподударности калуса две врсте. Поменуте појаве јасно су забележене код спојева култивара *P. serrulata* са магривом и патуљастом крушком ('Pyrodwarf') и местимично са култиваром 'Colt'; обичном трешњом (*P. avium/P. serrulata* 'Amanogawa' и *P. avium/P. serrulata* 'Kiku-shidare-zakura') и са касном сремзом.
- Хемијским анализама спојева, употпуњена је слика о односу испитиваних подударних и неподударних таксона. Потврђена је компатибилност из претходне две анализе као и постојање одређеног броја неподударних спојева.
- Детекција неких полифенола који су у литератури означени као показатељи инкомпатибилности калемљења, потврдила је на још један, посредан начин, потенцијални инкомпатибилан spoj (p-кумаринска киселина, кемферол, кверцетин, ферулинска киселина, нарингенин и баикалеин).

- Код магриве је и кроз хемијске анализе укупних и појединачних полифенола потврђено њихово нагомилавање што је јасно манифестовано потамњивањем ткива.
- На спојевима са обичном трешњом, (која се наводи као најподеснија подлога за калемљење јапанских украсних трешања), хемијске анализе потврдиле су постојање одређених сметњи у споју ове врсте са култиварима 'Amanogawa' и 'Kiku-shidare-zakura'. Односно, према добијеним резултатима у овом раду може се донети закључак да ова подлога није најбољи избор за ове култиваре. Према свим анализама, боља подлога је свакако *P. serrulata*, а треба покушати и комбинације 'Colt'/'Amanogawa' и 'Colt'/'Kiku-shidare-zakura'.

Генерално се може закључити да се примењена метода фузије калуса у *in vitro* условима може сматрати ефикасним начином добијања релативно брзог и ефективног одговора о потенцијалној подударности ткива две компоненте калемљења и да је метода применљива и за друге таксоне. Применом ове технике могли би се, избећи скупи, пољски огледи у којима се одговор о подударности калемљења може чекати дужи низ година као и насумични избор подлога у пракси који може да доведе до губитка у комерцијалној производњи.

У будућим истраживањима која би обухватила проблематику компатибилности поменутих таксона, применом пољских огледа за истраживане таксоне, добијени резултати у овом раду потврдили би се или оповргли. Три добијена резултата би требало проверити кроз пољске огледе:

1. Могућност коришћења култивара 'Colt' као подлоге код калемљења *P. serrulata* 'Amanogawa' (као замену за обичну трешњу).
2. Потврдити потенцијалну компатибилност јапанских украсних трешања и касне сремзе.
3. Користити основни таксон *Prunus serrulata* као посредник између наших подлога и јапанских украсних трешања. Тиме би се

превазишла неподударност између саме подлоге и племке (конкретно код спојева *Prunus avium/P. serrulata* 'Amanogawa' и *Prunus avium/P. serrulata* 'Kiku-shidare-zakura') а уједно и избегла алтернатива набавке семена и производња генеративних подлога *Prunus serrulata*, као и спречила појава фенотипске неуједначености калемљених култивара због хетерозиготности подлога.

7. ЛІТЕРАТУРА

1. Ainsley P.J., Collins G.G., Sedgley M. (2001): *In vitro* rooting of almond (*Prunus dulcis* Mill.), In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant 37(6): 778–785
2. Ainsley P.J., Collins G.G., Sedgley M. (2000): *Adventitious shoot regeneration from leaf explants of almond (Prunus dulcis Mill.)*, In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant 36(6): 470–474
3. Akita M., Negishi K., Kitano A., Iwasaki M., Komae R., Ohta Y., Kuriu T., Takii T. (2006): *Mass propagation of cherry (Cerasus 9 yedoensis Matsum.) through shoot primordia*, Acta Horticulturae 725: 579–584
4. Aloni R. (1995): *The induction of vascular tissues by auxin and cytokinin*, Plant hormones. Davis et al. (ed.). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 531–546
5. Aloni R. (2001): *Foliar and axial aspects of vascular differentiation hypothesis and evidence*, Journal of Plant Growth Regulation 20: 22–24
6. Aloni R., Aloni E., Langhans M., Ullrich C.I. (2006): *Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: Regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism*, Annals of Botany 97(5): 883–893
7. Aloni R., Cohen R., Karni L., Aktas H., Edelstein M. (2010): *Hormonal signaling in rootstock-scion interactions*, Scientia Horticulturae 127: 119–126
8. Argles G.K. (1937): *A review of the literature on stock-scion incompatibility in fruit trees, with particular reference to pome and stone fruits*, Imperial Bureau of Fruit Production Nr.9, East Malling, Kent (113)
9. Asaad M.M., Duhoky M.M.S., Salman A.M. (2009): *In Vitro propagation of peach (Prunus persica L.) cv. “Red June”*, J. Duhok University 12(11): 67–73
10. Atta, R., Laurens, L., Boucheron-Dubuisson, E., Guivarc’h, A., Carnero, E., Giraudat-Pautot, V., Rech, P., and Chriqui, D. (2009): *Pluripotency of Arabidopsis xylem pericycle underlies shoot regeneration from root and hypocotyl explants grown in vitro*, Plant J. 57: 626–644

11. Badenes M.L., Parfitt D.E. (1995): *Phylogenetic relationship of cultivated Prunus species from an analysis of chloroplast DNA variation*, Theoretical and Applied Genetics 90(7–8): 1035–1041
12. Barnett J.R., Weatherhead I. (1988): *Graft formation in Sitka spruce: A scanning electron microscopy study*, Annals of Botany 61(5): 581–587
13. Bartholomew B., Li C.L. (2003): *Genus Cerasus*, In: Wu Z.Y., Raven P.H., Hong D.Y. (Eds.), Flora of China, Vol.9. Science Press, Beijing, and Missouri Botanical Garden Press, Saint Louis: 404–420
14. Bean W. J. (1950): *Trees & Shrubs hardy in the British Isles*, 7th edition, John Murray, London (703)
15. Beckman C.H. (2000): *Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants*, Physiological and Molecular Plant Pathology 57(3): 101–110
16. Behbahani M., Shanehsazzadeh M., Hessami M. J. (2011): *Optimization of callus and cell suspension cultures of Barringtonia racemosa (Lecythidaceae family) for lycopene production*, Scientia Agricola 68(1): 69–76
17. Berckmans B., Vassileva V., Schmid S.P., Maes S., Parizot B., Naramoto S., Magyar Z., Alvim Kamei C.L., Koncz C., Bögre L., Persiau G., De Jaeger G., Friml J., Simon R., Beeckman T., De Veylder L. (2011). *Auxin-dependent cell cycle reactivation through transcriptional regulation of Arabidopsis E2Fa by lateral organ boundary proteins*, Plant Cell 23: 3671–3683
18. Bernasconi P. (1996): *Effect of synthetic and natural protein tyrosine kinase inhibitors on auxin efflux in zucchini (Cucurbita pepo) hypocotyls*, Physiol Plant. 96:205–210
19. Bhagwat B., David Lane W., (2004): *In vitro shoot regeneration from leaves of sweet cherry (Prunus avium) ‘Lapins’ and ‘Sweetheart’*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture 78(2): 173–181
20. Blando F, Scardino A.P., De Bellis L., Nicoletti I., Giovinazzo G. (2005): *Characterization of in vitro anthocyanin-producing sour cherry (Prunus cerasus L.) callus cultures*, Food Research International 38(8): 937–942

21. Bonga J. M., Durzan D.J. (Eds.) (1985): *Tissue culture in Forestry*, Martinus Nijhof / Dr. Junk Publishers, Hague (420)
22. Bortiri E, Oh S.H., Jiang J.G., Baggett S., Granger A., Weeks C., Buckingham M., Potter D., Parfitt D.E. (2001): *Phylogeny and systematics of Prunus (Rosaceae) as determined by sequence analysis of ITS and the chloroplast trnL-trnF spacer DNA*, Systematic Botany 26(4): 797–807
23. Bostock R.M, Stermer B.A. (1989): *Perspectives on Wound Healing in Resistance to Pathogens*, Annual Review of Phytopathology, Vol. 27: 343–371 DOI: 10.1146/annurev.py.27.090189.002015
24. Botanic Garden and Botanical Museum Berlin-Dahlem (2006): Euro+Med PlantBase—the information resource for Euro-Mediterranean plant diversity. Available online: <http://ww2.bgbm.org/EuroPlusMed/>
25. Boudet A.M. (2007): *Evolution and current status of research in phenolic compounds*, Phytochemistry 68 (22–24):2722–35
26. Bourgaud F., Gravot A., Milesi S., Gontier E. (2001). *Production of plant secondary metabolites: A historical perspective*, Plant Sci. 161: 839–851
27. Caboni E., Lauri P., D'Angeli S. (2000): *In vitro plant regeneration from callus of shoot apices in apple shoot culture*, Plant Cell Reports 19(8): 755–760
28. Camara Macado A., Puschman, M., Puringer H., Kremen R., Katinger H., Lamier da Camara Machado M. (1995): *Somatic embryogenesis of Prunus subhirtella autumnosa and regeneration of transgenic plants after Agrobacterium-mediated transformation*, Plant Cell Reports 14: 335–340
29. Canas S., Assunção M., Brazão J., Zanola G., Eduardo J., Diasa E. (2013): *Phenolic Compounds Involved in Grafting Incompatibility of Vitis spp: Development and Validation of an Analytical Method for their Quantification*, Phytochem. Anal. 26: 1–7
30. Canli F.A., Tian L. (2008): *In vitro shoot regeneration from stored mature cotyledons of sweet cherry (Prunus avium L.) cultivars*, Scientia Horticulturae 116(1): 34–40

31. Caponetti J.D., Hall G.C., Farmer, Jr.R.E. (1971): *In vitro Growth of Black Cherry Callus: Effects of Medium, Environment, and Clone*, Botanical Gazette, 132(4): 313–318
32. Cerović R., Ružić Đ. (1987): *Micropropagation of sour cherry (Prunus cerasus L.) cv. Šumadinka*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture 9: 151–157
33. Chang K-S, Chang C-S, Park T.Y. Roh M.S. (2007): *Reconsideration of the Prunus serrulata complex (Rosaceae) and related taxa in eastern Asia*, Botanical Journal of the Linnean Society 154(1): 35–54
34. Charkevicz S.S. (Ed.) (1996): *Сосудистые растения советского дальнего востока (Plantae Vasculares Orientis Extremi Sovietici)*, Tomus 8, Nauka, Saint Petersburg
35. Cheong E.J. (2000): *A study on mass propagation of Prunus yedoensis Matsumura from Cheju using in vitro culture techniques*, PhD Thesis, Kangwon National University, Korea (104)
36. Cheong E.J., Kim C.S. (2000): *Differentiation of winter bud of Prunus yedoensis Matsumura from Jeju Island from depending on the collection time and media conditions*, Journal of The Korean Society for Applied Biological Chemistry 89(4): 522–526
37. Cheong E.J., Pooler M. (2004): *Factors affecting somatic embryogenesis in Prunus incisa 'February Pink'*, Plant Cell Reports 22(11): 810–815
38. Chin S.W., Wen J., Johnson G., Potter D. (2010): *Merging Maddenia with the morphologically diverse Prunus (Rosaceae)*, Biological Journal of the Linnean Society 164(3): 236–245
39. Clark S.E. (2001): *Meristems: start your signaling*, Current Opinion in Plant Biology 4(1): 28–32
40. Cline M. N., Neely D. (1983): *The histology and histochemistry of the wound healing process in geranium cuttings*, Journal of the American Society for Horticultural Science 108: 496–502

41. Coenen C., Lomax T.L. (1997): *Auxin-cytokinin interactions in higher plants: old problems and new tools*, Trends Plant Sci. 2(9): 351–356
42. Cornejo Martin M.J., Mingo-Castel A.M., Primo-Millo E. (1979): *Organ Redifferentiation in Rice Callus: Effects of C₂H₄, CO₂ and Cytokinins*, Zeitschrift für Pflanzenphysiologie, vol. 94: 117–123
43. De Cooman L., Everaert E., Curir P., Dolcis M. (1996): *The Possible Role of Phenolics in Incompatibility Expression in Eucalyptus gunnii Micrografts*, Phytochemical Analysis 7(2): 92–96
44. Declerck V., Korban S.S. (1996): *Influence of growth regulators and carbon sources on callus induction, growth and morphogenesis from leaf tissues of peach (Prunus persica L. Batsch)*, The Journal of Horticultural Science and Biotechnology 71(1): 49–55
45. Dengler N.G., Tsukaya H. (2001): *Leaf morphogenesis in dicotyledons: current issues*, Int. Journal Plant Sci. 162: 459–464
46. Ding B., Itaya A., Woo Y.M. (1999): *Plasmodesmata and cell-to-cell communication in plants*, International Review of Cytology 190: 251–316
47. Dickson E.E., Arumuganathan K., Kresovich S., Doyle J.J. (1992): *Nuclear DNA content variation within the Rosaceae*, Am J Bot 79: 1081–1086
48. Dorić D., Ognjanov V., Ljubojević M., Barać G., Dulić J., Pranjić A., Dugalić K. (2014): *Rapid propagation of sweet and sour cherry rootstocks*, Not Bot Horti Agrobi 42: 488–494
49. Druart P. (1990): *Effect of culture conditions and leaf selection on organogenesis of Malus domestica cv. McIntosh “Wijcik” and Prunus canescens Bois GM79*, Acta Horticulturae 280: 117–124
50. Druart P. (2013): *Micropropagation of Prunus Species Relevant to Cherry Fruit Production*, Methods in molecular biology, 11013:119–36, doi: 10.1007/978-1-62703-074-8_9
51. Dradi G., Vito G., Standardi A. (1996). *In vitro mass propagation of eleven Prunus mahaleb ecotypes*, Acta Hort 410: 477–484.

52. Đikanović Golubović, D. (2013): *Strukturna ispitivanja ćelijskog zida i lignina različitog porekla*, Doktorska disertacija, Fakultet za Fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu, Beograd (149)
53. Duta M., Oprea M.I., Concioiu M.E. (2007): *Prunus serrulata var. Kanzan Behaviour Regarding In Vitro Rooting and Acclimatization*, Scientific Papers of the R.I.F.G. Pitesti. XXV: 202–206
54. Ehlers K., Kollmann R. (1996): *Formation of branched plasmodesmata in regenerating Solanum nigrum-protoplasts*, Planta 199(1): 126–138
55. Ehlers K., Kollmann R. (2001): *Primary and secondary plasmodesmata: structure, origin, and functioning*, Protoplasma 216(1–2): 1–30
56. Ermel F.F., Kervella J., Catesson A.M., Poessel J.L. (1999): *Localized graft incompatibility in pear/quince (Pyrus communis/Cydonia oblonga) combinations: multivariate analysis of histological data from 5-month-old grafts*, Tree Physiology 19(10): 645–654
57. Ermel F.F., Poessel J.L., Faurobert M., Catesson A.M. (1997): *Early scion/stock junction in compatible and incompatible pear/pear and pear/quince grafts: A histocytological study*, Annals of Botany 79(5): 505–515
58. Errea P., Felipe A., Herrero M. (1994a): *Graft establishment between compatible and incompatible Prunus spp*, Journal of Experimental Botany 45 (272), 393–401
59. Errea P., Garay L., Marin J.A. (2001): *Early detection of graft incompatibility in apricot (Prunus armeniaca) using in vitro techniques*, Physiologia Plantarum 112(1): 135–141
60. Errea P., Treutter D., Feucht W. (1992): *Specificity of individual flavan 3-ols interfering with the grafting stress of apricots*, Angewandte Botanik 66: 21–24
61. Errea P., Treutter D., Feucht W. (1994b): *Characterization of flavanol-type polyphenols in apricot cultivar and rootstocks*, Advances in Horticultural Sciences 3: 165–169
62. Errea P. (1998): *Implications of phenolic compounds in graft incompatibility in fruit tree species*, Scientia Horticulturae 74(3): 195–205

63. Escalettes V., Dosba F. (1993): *In vitro adventitious shoot regeneration from leaves of Prunus spp*, Plant Science 90(2): 201–209
64. Espen L., Cocucci M., Sacchi G.A. (2005): *Differentiation and functional connection of vascular elements in compatible and incompatible pear/quince internode micrografts*, Tree Physiology 25(11): 1419–1425
65. Fajerska E.H. (2006): *Improveent of growth parameters of prune callus cultures destined to initiata cell suspensions*, Acta Societatis Botanicorum Poloniae 75(1): 5–9
66. Faust M., Suranyi D. (1997): *Origin and dissemination of cherry*, Hod. Rev. (Amer. Soc. Hod. Sci.) 19: 263–317
67. Feeney M., Bhagwat B., Mitchell J.S., David Lane W. (2007): *Shoot regeneration from organogenic callus of sweet cherry (Prunus avium L.)*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture 90(2): 201–214
68. Fernandez-Garcia N., Carvajal M., Olmos E. (2003): *Graft union formation in tomato plants, peroxidase and catalase involvemen*, Annals of Botany 93: 53–60
69. Feucht W., Treutter D., Schmid P.P.S. (1988): *Inhibition of Growth and Xylogenesis and Promotion of Vacuolation in Prunus Callus by the Flavanone Prunin*, Plant Cell Reports 7(3): 189–192
70. Fogle H.W. (1975): *Cherries*. In: Janick J., Moore J.N. (Eds.), Advances in Fruit Breeding, Purdue University Pres, West Lafayette: 348–366
71. Fotirić Akšić M., Dabić D., Gašić U., Zec G., Vulić T., Tešić Z., Natić M. (2015): *Polyphenolic Profile of Pear Leaves with Different Resistance to Pear Psylla (Cacopsylla pyri)*, J. Agric. Food Chem. 63 (34): 7476–7486
72. Frank M., Rupp H.M., Prinsen E., Motyka V., Van Onckelen H., Schmülling T. (2000): *Hormone autotrophic growth and differentiation identifies mutant lines of Arabidopsis with altered cytokinin and auxin content or signaling*. Plant Physiol. 122: 721–729
73. Fry S.C. (1988): *The growing plant cell wall. Chemical and Metabolic Analysis*, Logman, London (333)

74. Fuji T., Nito N. (1972): *Studies on the compatibility of grafting fruit trees. I. Callus fusion between the rootstock and scion*, Journal of the Japanese Society for Horticultural Science 41(1): 1–10
75. Gainza F., Opazo I., Muñoz C.. (2013): *Graft incompatibility in plants: Metabolic changes during formation and establishment of the rootstock/scion union with emphasis on Prunus species*, Chilean journal of agricultural research 75 (Suppl. 1): 28–34
76. Gašić U., Kečkeš S., Dabić D., Trifković J., Milojković - Opsenica D., Natić M., Tešić Ž. (2014): *Phenolic profile and antioxidant activity of Serbian polyfloral honeys*, Food Chem. 145: 599–607
77. Gašić U., Natić M., Mišić D., Lušić D., Milojković – Opsenica D., Tešić Ž., Lušić D. (2015): *Chemical markers for the authentication of unifloral Salvia officinalis L. honey*, Journal of Food Composition and Analysis 44: 128–138
78. Gautheret R. (1939): *Sur la possibilité de réaliser la culture indéfinie des tissus de tubercules de carotte*, C. R. Soc. Biol. Paris 208: 118–120
79. Gebhardt K., Feucht W. (1982): *Polyphenol Changes at the Union of Prunus-Avium Prunus-Cerasus Grafts*, Journal of Horticultural Science 57(3): 253–258
80. Gentile A., Monticelli S., Damiano C. (2002): *Adventitious shoot regeneration in peach [Prunus persica (L.) Batsch]*, Plant Cell Reports 20(11): 1011–1016
81. George E.F., Sherrington P.D. (Eds.) (1988): *Plant Propagation by Tissue Culture*, Vol.I, Springer, Dordrecht (502)
82. Грбић М. (2004): *Вегетативно размножавање украсног дрвећа и жбуња*, Не & Во Трагови, Београд, (488)
83. Grotewold E., Chamberlin M., Snook M., Siame B., Butler L., Swenson J., Madock S., Clair G.S., Bowen B. (1998): *Engineering secondary metabolism in maize cells by ectopic expression of transcription factors*, The Plant Cell, 10(5): 721–740
84. Gulen H., Arora R., Kuden A., Krebs S.L., Postman J. (2002): *Peroxidase isozyme profiles in compatible and incompatible pear-quince graft combinations*, Journal

of the American Society for Horticultural Science 127(2): 152–157

85. Gur A., Blum A. (1973): *Role of Cyanogenic Glycoside in Incompatibility between Peach Scions and Almond Rootstocks*, Horticultural Research 13(1): 1–10
86. Hall R.D. (2006): *Plant metabolomics: From holistic hope, to hype, to hot topic*, New Phytologist 169: 453–468
87. Hammatt N., Grant N. J. (1998): *Shoot regeneration from leaves of Prunus serotina Ehrh. (black cherry) and P. avium L. (wild cherry)*, Plant Cell Reports 17(6–7): 526–530
88. Hammerschlag F.A., Bauchan G., Scorza R. (1985): *Regeneration of peach plants from callus derived from immature embryos*, Theoretical and Applied Genetics 70(3): 248–251
89. Hangarter R.P., Stasinopoulos T.C. (1991): *Repression of plant tissue culture growth by light caused by photochemical change in the culture medium*, Plant Science 79(2): 253–257
90. Hardy N.W., Hall R.D. (2012): *Practical applications of metabolomics in plant biology*, In *Plant metabolomics*, Methods and protocols. Methods in Molecular Biology 860: 1–10. doi:10.1007/978-1-61779-594-7
91. Hartmann H.T., Kester D.E., Davies Jr.F.T., Geneve R.L. (1997): *Plant Propagation: Principles and Practices*, Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey (647)
92. Herrero J. (1951): *Studies of compatible and incompatible graft combinations with special reference to hardy fruit trees*, The Journal of Horticultural Science and Biotechnology 26 (3): 186–237
93. Heuser C.W. (1972): *Response of callus culture of Prunus persica, Prunus tomentosa and Prunus besseyi to cyanide*, Canadian Journal of Botany 50(11): 2149–2152
94. Hillier J., Coombes A. (2002): *The Hillier manual of trees and shrubs*, David & Charles, Davon (512)

95. Hossein D.G., Farajollah S., Hassanpour H. (2008): *Identification of graft incompatibility of pear cultivars on quince rootstock by using isozymes banding pattern and starch*, Asian Journal of Plant Sciences 7: 109–112.
96. Hu Y., Bao F., Li J. (2000): *Promotive effect of brassinosteroids on cell division involves a distinct CycD3-induction pathway in Arabidopsis*, Plant J. 24: 693–701
97. Hussey G. (1983): *In vitro production of horticultural and agricultural crops* In: Mantell SH, Smith H (eds) Plant biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge London New York Rochelle Melbourne Sidney, 111–138
98. Ikeuchi M, Sugimoto K, Iwase A. (2013): *Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression*, The Plant Cell, Vol. 25: 3159–3173
99. Ingram C. (1945): *Notes on Japanese cherries. Part III*. Journal of the Royal Horticultural Society 70: 10–18
100. Ishikura N. (1994): *Prunus x yedoensis: in vitro culture and the production of flavonoids*, Medicinal and Aromatic Plants VI, Biotechnology in Agriculture and Forestry 6: 283–298
101. Işikalan Ç., Akbaş F., Namli S., Başaran D. (2010): *Adventitious shoot development from leaf and stem explants of Amygdalus communis L. cv. Yaltinski*, Plant Omics Journal 3(3): 92–96
102. Iwase A., Mitsuda N., Koyama T., Hiratsu K., Kojima M., Arai T., Inoue Y., Seki M., Sakakibara H., Sugimoto K., Ohme-Takagi M. (2011): *The AP2/ERF transcription factor WIND1 controls cell dedifferentiation in Arabidopsis*, Curr. Biol. 21: 508–514
103. Jacobs K.A., Johnson G.R. (1996): *Ornamental cherry tolerance of flooding and Phytophthora root rot*, Hortic. Sci. 31: 988–991
104. Jacobs M., Rubery P. H. (1988): *Naturally occurring auxin transport regulators*, Science 241: 346–349
105. James D. J., Mackenzie K. A. D., Malhotra S. B. (1987): *The induction of hexaploidy in cherry rootstocks using in vitro regeneration techniques*, Theoretical and applied genetics 73(4): 589–594

106. James D.J. (1987): *Cell and tissue culture technology for the genetic manipulation of temperate fruit trees*, Biotechnology and genetic engineering reviews 5(1), 33–80
107. Janečková M.M., Čapková D. (1995): *In vitro shoot organogenesis of a rootstock for cherries from leaf discs*, Zahradnictvi 22: 15–16
108. Jefferson R. M., Wain K.K. (1984): *The Nomenclature of Cultivated Japanese Flowering Cherries (Prunus): The Sato-Zakura Group*, US National Arboretum Contribution No.5, U.S. Dept. of Agriculture, Agricultural Research Service, Washington D.C. (70)
109. Jeffree C.E., Gordon F., Yeoman M.M. (1989): *Pectinaceous beads and pectinase on callus cell surfaces in graft unions and in culture*, In: Osborne D.J., Jackson M.B. (Eds.), Cell separation in plants. Physiology, biochemistry and molecular biology, NATO ASI Series, Cell Biology, H: Vol.35, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg: 287–299
110. Jeffree C.E., Yeoman M.M. (1983). *Development of intercellular connections between opposing cells in a graft union*. New Phytologist 93(4): 491–509
111. Jonard R., Lukman D., Schall F., Villemur P. (1990): *Early testing of graft incompatibilities in apricot and lemon trees using in vitro callus techniques*, Scientia horticultrae 43(1): 117–128
112. Jones A.M.P., Saxena P.K. (2013): *Inhibition of Phenylpropanoid Biosynthesis in Artemisia annua L.: a Novel approach to reduce oxidative browning in plant tissue culture*, PloS one 8(10). Dostupno na <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0076802> (pristupljeno 8. oktobra 2015).
113. Jordan, M. (1974): *Multicellular pollen in Prunus avium after culture in vitro*, Z. Pflanzenzuchtung 71: 358–363
114. Jordan M., Iturriaga L., Feucht W. (1980): *Inhibition of root formation in Prunus avium hypocotyls by chlorogenic acid in vitro / Hemmung der Wurzelbildung an Prunus avium-Hypokotylen durch Chlorogensäure in vitro*, Gartenbauwissenschaft 45(1): 15–17

115. Јовановић Б. (1967): *Дендрологија са основама фитоценологије*, Научна књига, Универзитет у Београду (576)
116. Juárez J., Arregui J.M., Camarasa E., Cambra M., Llácer G., Ortega C., Ortega V., Navarro L. (1988): *Recovery of virus-free peach trees from selected clones by shoot-tip grafting in vitro*, Acta Horticulturae 235, 77–83
117. Juárez J., Camarasa E., Ortega C., Ortega V., Arregui J.M., Cambra M., Llácer G., Navarro L. (1992): *Recovery of virus-free almond plants by shoot-tip grafting in vitro*, Acta Horticulturae 309: 393–400
118. Juniper B.E., Jeffree C.E. (1983): *The wound response, grafting and chimeras*, In: Juniper B.E., Jeffree C.E. (Eds.), *Plant Surfaces*, Edward Arnold, London: 77–83
119. Kalinina A., Brown, C.W.D. (2007): *Micropropagation of ornamental Prunus spp. and GF305 peach, a Prunus viral indicator*, Cell Biology and Morphogenesis, Plant Cell Reports 26(7): 927–935
120. Kato S., Matsumoto A., Yoshimura K., Katsuki T., Iwamoto K., Tsuda Y., Ishio S., Nakamura K., Moriwaki K., Shiroishi T., Gojobori T., Yoshimaru H. (2012): *Clone identification in Japanese flowering cherry (Prunus subgenus Cerasus) cultivars using nuclear SSR markers*, Breeding Science 62(3): 248–255
121. Katano M, Irie R. (1991): *Shoot-tip culture of Japanese flowering cherry (Prunus yedoensis Matsum.) and possible cryopreservation of shoot-tip in liquid nitrogen*, In: *Proceedings of Faculty of Agriculture, Kyushu Tokai University, Vol.10*: 17–27
122. Kebert M. (2014): *Biohemijaska i fiziološka karakterizacija klonova topole (Populus spp.) u procesu fitoekstrakcije bakra, nikla i kadmijuma*, Doktorska disertacija, Departman za hemiju, Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Novom Sadu (249)
123. Kim C.S., Kho J.K., Cho R.M. (1993): *Effects of media, growth regulators and dark treatment on in vitro propagation using vegetative buds of Prunus yedoensis Matsumura*, Korean Journal of Plant Tissue Culture 20: 213–219
124. Klagges C., Campoy J. A., Quero-García J., Guzmán A., Mansur L., Gratacós E., Dirlewanger, E. (2013): *Construction and Comparative Analyses of Highly Dense*

Linkage Maps of Two Sweet Cherry Intra-Specific Progenies of Commercial Cultivars, PLoS ONE 8(1), e54743. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0054743>

125. Klee H., Estelle M. (1991): *Molecular genetic approaches to plant hormone biology*, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42: 529–551
126. Koh J.K., Oh S.J., Kim E.S., Kim M.H., Kho S.C. (1998): *Plant regeneration through direct somatic embryogenesis from immature zygotic embryo of Prunus yedoensis in Mt Halla*, Korean Journal of Plant Resources 11: 9–14
127. Kobayashi Y. (1992): *Flowering cherry cultivars*, (In Japanese), Puranta 20: 9–14
Flowering
128. Koepke T., Dhingra A. (2013): *Rootstock scion somatogenetic interactions in perennial composite plants*, Plant Cell Report 32: 1321–1337
129. Kollmann R., Glockmann C. (1985): *Studies on Graft Unions, I, Plasmodesmata between cells of plants belonging to different unrelated taxa*, Protoplasma 124(3): 224–235
130. Kollmann R., Glockmann C. (1991): *Studies on graft unions, III, On the mechanism of secondary formation of plasmodesmata at the graft interface*. Protoplasma 165: 71–85
131. Krüssmann G., Wennemuth G., Thon H.E. (1981): *Die Baumschule*, Parey Verlag, Berlin und Hamburg (656).
132. Kuitert W., Peterse A. (1999): *Japanese Flowering Cherries*, Timber Press, Portland (395)
133. Lamb J. G. D., Kelly J.C., Bowbrick P. (1975): *Nursery stock manual*, London, Grower Books (298)
134. Laukkanen H., Häggman H, Kontunen-Soppela S., Hohtola A. (1999): *Tissue browning of in vitro cultures of Scots pine: role of peroxidase and polyphenol oxidase*, Physiologia Plantarum 106(3): 337–343
135. Layne R.E.C., Bailey C.H., Hough F. (1996): *Apricots*, In: Janick J., Moore J.N. (Eds.), *Fruit Breeding, Vol.1, Tree and Tropical fruits*, John Wiley & Sons, New York: 79–109

136. Lee S.T., Wen J. (2001): *A phylogenetic analysis of Prunus and the Amygdaloidea (Rosaceae) using ITS sequences of nuclear ribosomal DNA*, American Journal of Botany 88(1): 150–160.
137. Li R., Mock R. (2005): *An improved reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay for the detection of two cherry flexiviruses in Prunus spp.*, Journal of virological methods, 129(2): 162–169.
138. Lloyd G., McCown B. (1980): *Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, Kalmia latifolia, by use of shoot-tip culture*, Combined Proceedings International Plant Propagators' Society 30: 421–427
139. Lockard R. G., Schneider G. W. (1981): *Stock and scion growth relationships and the dwarfing mechanism in apple*, Hort. Rev. 3: 315–375
140. Lucas W.J., Ding B., Van der Schoot C. (1993): *Plasmodesmata and the supracellular nature of plants*, New Phytologist 125(3): 435–476.
141. Lucas W.J. (1999): *Plasmodesmata and the cell-to-cell transport of proteins and nucleoprotein complexes*, Journal of Experimental Botany 50: 979–987
142. Macdonald B. (2006): *Practical woody plant propagation for nursery growers*, Timber Press, Portland (660)
143. Mahdavian M., Bouzarl N., Abdollahi H. (2011): *Effect of media and plant growth regulators on micropropagation of a dwarfing cherry rootstocks (PHL-A)* Biharean Biologist 5 (2), 86–90
144. Makino T. (1901): *Observations on the Flora of Japan*, Fasciculus 1, Reprinted from the Botanical magazine, Tokyo, Vol. XV (76)
145. Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Remesy, C.; Jimenez, L. (2004): *Polyphenols: food sources and bioavailability*, Am. J. Clin. Nutr., 79: 727–747
146. Mandić B., Matić S., Al Rwahnih M., Jelkmann W., Myrta A. (2007): *Viruses of sweet and sour cherry in Serbia*, Journal of Plant Pathology, 89(1): 103–108
147. Марковић, М. (2012): *Проучавање паразитских гљива на дивљој трешњи (Prunus avium l.) са посебним освртом на биокологију Daedaleopsis confragosa (Bilt.: Fr.) J. Schroet*, Докторска дисертација Београд, 2012 (196)

148. Matic S., Minafra A., Sánchez-Navarro J.A., Pallás V., Myrta A., Martelli G.P. (2009): '*Kwanzan Stunting*' syndrome: *Detection and molecular characterization of an Italian isolate of Little cherry virus*, *Virus Research* 143: 61–67
149. Martens H.J., Roberts A.G., Oparka K., Schulz A. (2006): *Quantification of plasmodesmatal ER coupling between sieve elements and companion cells using fluorescence redistribution after photobleaching*, *Plant Physiology* 142(2), 471–480
150. Martínez-Gómez P., Sánchez-Pérez R., Rubio M., Dicenta F., Gradziel T.M., Sozzi G.O. (2005): *Application of recent biotechnologies to Prunus tree crop genetic improvement*, *Ciencia Investigación Agraria* 32: 73–96
151. Matt A., Jehle J.A. (2005): *In vitro plant regeneration from leaves and internode sections of sweet cherry cultivars (Prunus avium L.)*, *Plant Cell Reports* 24(8): 468–476
152. Mattsson J., Ckurshumovaand W., Berleth T. (2003): *Auxin signaling in Arabidopsis leaf vascular development*, *Plant Physiology* 131: 1327–1339
153. Miguel C.M., Druart P., Oliveira M.M. (1996): *Shoot regeneration from adventitious buds induced on juvenile and adult almond (Prunus dulcis Mill) explants*, *Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 32(3): 148–153
154. Mihaljević I., Dugalić K., Tomaš V., Viljevac M., Pranjić A., Čmelik Z., Puškar B., Jurković Z. (2013): *In vitro sterilization procedures for micropropagation of 'Oblačinska' sour cherry*, *Journal of Agricultural Sciences* 58(2): 117–126
155. Mihaljević S., Bjedov I., Kovač M., Leljak Levanić D., L Jelaska S. (2002): *Effect of Explant Source and Growth Regulators on in vitro Callus Growth of Taxus baccata L. Washingtonii*, *Food Technology and Biotechnology* 40 (4): 299–303
156. Milatović D., Nikolić M., Miletić N. (2015): *Trešnja i višnja*, drugo dopunjeno izdanje, Naučno voćarsko društvo Srbije (560)
157. Miletić R., Žikić M, Mitić N, Nikolić R (2008): *Identification and in vitro propagation of 6 promising 'Oblačinska' sour cherry selections in eastern Serbia*, *Acta Hort* 795: 159–162

158. Miller H, Barnett J.R. (1993): *The structure and composition of Bead-like projections on Sitka spruce callus cells formed during grafting and in culture*, Annals of Botany 72(5): 441–448
159. Miyoshi M. (1916): *Japansche Berkirschen, ihre Wildformen und Kulturrassen*, Journal of the College of Science of the Imperial University of Tokyo 34: 1–175
160. Mng'omba S. A., du Toit E. S., Akinnifesi F.K. (2008): *Early recognition of graft compatibility in Uapaca kirkiana Muell Arg. clones, provenances and species*, Agroforestry Systems 74(2): 173–183
161. Mng'omba S.A., du Toit E.S., Akinnifesi F.K., Venter H.M. (2007): *Histological evaluation of early graft compatibility of Uapaca kirkiana Müell Arg. scion/stock combinations*, Hort.Science 42(3): 732–736
162. Moing A., Carde J.P. (1988): *Growth, cambial activity and phloem structure in compatible and incompatible peach/plum grafts*, Tree Physiology 4(4): 347–359
163. Moore R. (1981): *Graft Compatibility and Incompatibility in Higher-Plants*, Developmental & Comparative Immunology 5(3): 377–389
164. Moore R. (1984a). *A model for graft compatibility-incompatibility in higher plants*, American Journal of Botany 71: 752–758.
165. Moore R. (1984b): *Ultrastructural aspects of graft incompatibility between pear and quince invitro*, Annals of Botany 53(3): 447–451
166. Moore, R. (1991): *Graft compatibilities in vitro*, High-Tech and Micropropagation I, Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol.17: 71–84
167. Moore R., Walker D.B. (1981): *Studies of vegetative compatibility-incompatibility in higher plants. II. A structural study of an incompatible heterograft between Sedum telefoides (Crassulaceae) and Solanum pennelli (Solanaceae)*, American Journal of Botany 68: 831–842
168. Moreno M. A., Tabuenca M. C., Cambra R. (1994): *Performance of Adafuel and Adarcias as peach rootstocks*. HortScience 29(11):1271-1273.
169. Morgan,D. R., Soltis D.E., Robertson K.R. (1994): *Systematic and evolutionary implications of rbcL sequence variation in Rosaceae*, American Journal of Botany

81: 890–903

170. Mosse B. (1962): *Graft incompatibility in fruit trees*, Agr. Bur. England Tech. Commun. 28: 1–36
171. Mousavi E. S., Behbahani M., Hadavi E., Miri S. M., Karimi N. (2012): *Plant regeneration in Eustoma grandiflorum from axillaries buds (Gentianaceae)*, Trakia Journal of Sciences, Vol. 10 Issue 2: 75–78
172. Mowrey BD, DI Warner, DH Bryne (1990): *Isoenzyme survey of various species of Prunus in the subgenus amygdalus*, Scientia Horticulturae 44: 251–260
173. Murashige T., Skoog F. (1962): *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture*, Physiologia Plantarum 15(3): 473–497
174. Musacchi S., Pagliuca G., Kindt M., Piretti M.V., Sansavini S. (2000): *Flavonoids as markers for pear-quince graft incompatibility*, Journal of Applied Botany 74(5–6): 206–211
175. Ning G.G., Fan X.L., Huang W.J., Bao M.Z., Zhang J.B. (2007): *Micropropagation of six Prunus mume cultivars through axillary shoot proliferation, and ISSR analysis of cloned plants*, Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica 49(1): 25–31
176. Navarro I., Llacer G., Cambra M., Arregui J.M., Juárez J. (1982): *Shoottip grafting in vitro for elimination of viruses in peach plants (Prunus persica Batsch)*, XII International Symposium on Fruit Tree Virus Diseases, Acta Horticulturae 130: 185–192
177. Navarro L., Pina J.A., Juárez J., Ballester-Olmos J.F., Arregui J.M., Ortega C., Navarro A., (2002): *The Citrus variety Improvement program in Spain in the period 1975–2001*, In: Durán-Vila N., Milne R.G., da Graça, J.V. (Eds.), Proceedings of the 15th Conference of the International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Riverside: 306–316
178. Navarro L., Roistacher C.N., Murashige T. (1975): *Improvement of shoot-tip grafting in vitro for virus-free citrus*, Journal of the American Society for Horticultural Science 100(5), 471–479

179. Neil J.G., Neil H. (2000): *Adventitious shoot development from wild cherry (*Prunus avium* L.) leaves*, New For. 20: 287–295
180. Nemeth M., Nyerges K., Hangyal R., Kosa G. (2010): *Surveying viruses on ornamental trees and shrubs in two Hungarian botanical gardens and an arboretum*, 21th International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops, *Julius-Kühn-Archiv* (427): 293–299
181. Nešković M. (1985): *Vegetativno razmnožavanje belošljive (*Prunus domestica* L.) u kulturi in vitro*, Arhiv za poljoprivredne nauke 46, 375–380
182. Nešković M., Čulafić Lj., Konjević R. (2010): *Fiziologija biljaka*, drugo dopunjeno izdanje, NNN International, ISBN 978–86–83635–92–4 (335)
183. Nito N., Han S.H., Katayama Y. (2005): *Evaluation of graft compatibility for taxonomically relationships among species of the orange subfamily*, Acta Horticulturae 692: 85–90
184. Nobecourt, P (1939): *Sur les radicules naissant des cultures de tissus du tubercule de carotte*, C.R.Soc .Biol., 130: 1271–1272
185. Nordström A., Tarkowski P., Tarkowska D., Norbaek R., Åstot C., Dolezal K., Sandberg G. (2004): *Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in Arabidopsis thaliana: A factor of potential importance for auxin-cytokinin-regulated development*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 8039–8044
186. Ochatt S.J., Cocking E.C., Power J.B. (1987): *Isolation, culture and plant regeneration of Colt cherry (*Prunus avium* x *pseuocerasus*) protoplasts*, Plant Science 50(2): 139–143
187. Огњанов В., Огашановић Д., Милатовић Д., Пауновић Г., Милинковић В., Радичевић С. (2007): *Перспективне сорте и подлоге коштничавих врста воћака*. Саветовање „Перспективне сорте и подлоге воћака“, 40 година часописа 15–32
188. Ognjanov V., Vujanić Varga D. (1989): *Vegetative propagation of peach in vitro*, Jugoslovensko Vocabrstvo 23: 429–431
189. Ohba H. (1992): *Japanese cherry trees under the genus Cerasus*, Journal of

Japanese Botany 67(5): 276–281

190. Ohta S., Yamamoto T., Nishitani C., Katsuki T., Iketani H., Omura M. (2007): *Phylogenetic relationships among Japanese flowering cherries (Prunus subgenus Cerasus) based on nucleotide sequences of chloroplast DNA*, Plant Systematics and Evolution, 263(3–4): 209–225
191. Ohwi, J. (1973): *Flowering cherries of Japan*, Heibonsha Publisher, Tokyo Olden E.J., Nybom N. (1968): *On the origin of Prunus cerasus L*, Hereditas, 59(2-3): 327–345
192. Olaya P.T., Jose E., Alicia V., Lorenzo B. (2000): *Assessment of factors affecting adventitious shoot regeneration from in vitro cultured leaves of apricot*, Plant Sci. 158: 61–70
193. Pascual L., Marin J.A. (2005): *A liquid 2,4-D pulse increased shoot and root regeneration from leaf explants of adult Prunus rootstocks*, Scientia Horticulturae 106(4): 582–592
194. Pavlović A., Dabić D., Momirović N., Dojčinović B., Milojković-Opsenica D., Tešić Ž., Natić, M.(2013): *Chemical composition of two different extracts of berries harvested in Serbia*, J. Agric. Food Chem., 61: 4188–4194
195. Payghamzadeh K., Kazemitabar S.K. (2011): *In vitro propagation of walnut-A review*, African Journal of Biotechnology 10(3): 290–311
196. Peer W.A., Murphy A.S., Brown D.E., Tague B.W., Muday G.K., Taiz L. (2001): *Flavonoid accumulation patterns of transparent testa mutants of Arabidopsis*, Plant Physiol. 126: 536–548
197. Peixe A., Barroso J., Potes A., Pais M.S. (2004): *Induction of haploid morphogenic calluses from in vitro cultured anthers of Prunus armeniaca cv. 'Harcot'*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture 77(1): 35–41
198. Pérez-Jiménez M., López-Soto M. B, Cos-Terrer J. (2013): *In vitro callus induction from adult tissues of peach (Prunus persica L. Batsch)*, In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant 49(1): 79–84
199. Pérez-Jiménez M., Carrillo-Navarro A., Cos-Terrer J. (2012): *Regeneration of*

- peach (Prunus persica L. Batsch) cultivars and Prunus persica × Prunus dulcis rootstocks via organogenesis*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture 108(1): 55–62
200. Pierik R.L.M. (1987): *In Vitro Culture of Higher Plants*, Springer Netherlands, Dordrecht (348)
201. Pina A., Errea P. (2005): *A review of new advances in mechanism of graft compatibility – incompatibility*, Scientia Horticulturae 106(1): 1–11
202. Pina A., Errea P., Schulz A., Martens H.J. (2009): *Cell-to-cell transport through plasmodesmata in tree callus cultures*, Tree Physiol. 29: 809–818.
203. Pina A., Errea, P. (2008): *Differential induction of phenylalanine ammonia-lyase gene expression in response to in vitro callus unions of Prunus spp.*, J. Plant Physiol. 165: 705–714.
204. Pina A, Errea P., Martens H.J. (2012): *Graft union formation and cell-to-cell communication via plasmodesmata in compatible and incompatible stem unions of Prunus spp*, Scientia Horticulturae 143: 144–150
205. Potter D., Eriksson T., Evans R. C., Oh S., Smedmark J. E. E., Morgan D. R., Kerr M., Robertson K. R., Arsenault M., Dickinson T. A., Campbell C. S. (2007): *Phylogeny and classification of Rosaceae*, Plant systematics and evolution 266(1–2): 5–43
206. Preece J.E., Compton M.E. (1991): *Problems with explant exudation in micropropagation*, High-Tech and Micropropagation I, Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 17: 168–189
207. Pruski K.W., Astatkie T., Nowak J. (2005): *Tissue culture propagation of Mongolian cherry (Prunus fruticosa) and Nanking cherry (Prunus tomentosa)*, Plant Cell Tissue and Organ Culture 82(2): 207–211
208. Pruski K.W., Lewis T., Astatkie T., Nowak J. (2000): *Micropropagation of chokecherry and pincherry cultivars*, Plant Cell Tissue and Organ Culture 63(2): 93–100
209. Quoirin M., Lepoivre P. (1977): *Etude de milieux adaptes aus cultures in vitro de Prunus*, Acta Horticulturae 78: 437–442

210. Ranjit M., Kester D.E., Micke W.C. (1988): *Micropropagation of cherry rootstocks. I. Response to culture*, Journal of the American Society for Horticultural Science 113: 146–149
211. Rehder A. (1940): *Manual of Cultivated Trees and Shrubs Hardy in North America. Exclusive of the Subtropical and Warner Temperate Reigions*, MacMillan Publishing, New York (930)
212. Rice-Evans C.A., Miller N.J., Bolwell P.G., Bramley P.M., Pridham J.B. (1995): *The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids*, Free Radic Res. 22(4): 375–83
213. Robbins, R.J. (2003): *Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology*, Journal of Agricultural and Food Chemistry 51: 2866–2887
214. Rowhani A., Uyemoto J. K., Golino D. A., Martelli G. P. (2005): *Pathogen testing and certification of vitis and prunus species*. Annual Revue of Phytopathology 43: 261–278
215. Ručić Đ., Sarić M., Cerović R., Čulafić Lj. (2001): *Changes in macroelement content of the media and in sweet cherry Inmil GM9 shoots during in vitro culture*, Journal of Horticultural Science & Biotechnology, 76(3): 295–299
216. Russell K. (2003): *EUFORGEN technical guidelines for genetic conservation and use for wild cherry (Prunus avium)*, International Plant Genetic Resources Institute, Rome (6)
217. Russell P. (issued 1934, revised 1938): *The Oriental Flowering Cherry*, Circular No.113, US Department of Agriculture, Washington, D.C. Dostupno na: <https://www.keele.ac.uk/media/keeleuniversity/arboretum/downloads/Russell%20Oriental%20Flowering%20Cherries.pdf> (pristupljeno 21. januara 2016)
218. Ruzin, S. E. (1999): *Plant Microtechnique and Microscopy*, Oxford University Press, Oxford, New York (322)
219. Ružić Đ., Cerović R. (1987): *Radiazione di "Colt" micropropagato in vitro e in vivo*, Rivista di Frutticoltura e di Ortofloricoltura, 12: 73–75
220. Ružić, Đ., Cerović, R. (2001): *Rastenje i multiplikacija podloge za trešnju Gisele*

- 5 in vitro u zavisnosti od mineralnog sastava medijuma*, Jugoslovensko voćarstvo, 35 (133/134): 11–20
221. Ružić Đ., Cerović R. (2003): *Primena in vitro metoda kod koštićavih vrsta voćaka*, Jugoslovensko voćarstvo 37 (1/2): 37–49
222. Ružić Đ., Cerović R., Bošković R. (1991): *The assessment of somaclonal variation in sour cherry Šumadinka regenerated from leaf explants*, Fruit Science Report, 18/4: 155–162
223. Ružić Đ., Cerović R., Vujović T. (2010): *Uspostavljanje aseptične kulture in vitro novih vegetativnih podloga za trešnju, krušku i šljivu*, Voćarstvo 44 (169/170): 35–41
224. Ružić Đ., Rosati P., Mariano G. (1984): *Effeto dei fitoregolatori nella micropropagazione dell ibrido pesco x mandorlo GF 677*. Riv. Ortoflorofruitt. It., 5: 413–422
225. Ružić, Đ., Sarić M., Cerović R., Čulafić Lj. (2000): *Relationship between the concentration of macroelements, their uptake and multiplication of cherry rootstock Gisela 5 in vitro*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture 63(1): 9–14
226. Santamour Jr. F.S., McArdle A.J., Jaynes R.A., (1986): *Cambial isoperoxidase patterns in Castanea*, Journal of Environmental Horticulture 4: 14–16.
227. Savidge R.A. (2000): *Biochemistry of seasonal cambial growth and wood formation: an overview of the challenges*, Cell and molecular biology of wood formation, Oxford: BIOS Scientific Publishers, 1–30
228. Schenk R.U., Hildebrandt A.C. (1972): *Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures*, Canadian Journal of Botany 50(1): 199–204
229. Schmidt P. P. S., Feucht W. (1981): *Differentiation of sieve tubes in compatible and incompatible Prunus graftings*, Scientia Horticulturae 15(4): 349–354
230. Schmidt P. P. S., Feucht W. (1982): *Changes of peroxidases in the phloem of Prunus avium/Prunus cerasus graftings during the initial stages of the union formation*, Angewandte Botanik 56: 93–98

231. Seagull R.W.(1983): *Differences in the frequency and disposition of plasmodesmata resulting from root cell elongation*, *Planta* 159: 497–504
232. Shi S., Li J., Sun J., Yu J., Zhou S. (2013): *Phylogeny and Classification of Prunus sensu lato (Rosaceae)*, *Journal of Integrative Plant Biology* 55 (11): 1069–1079
233. Singh M.B., Bhalla P.L. (2006): *Plant stem cells carve their own niche*, *Trends Plant Sci.* 11, 241–246
234. Skoog F., Miller C. (1957): *Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured. In vitro*. Symposia of the Society for Experimental Biology 11: 118–131
235. Soumelidou K., Morris D. A., Battey N. H., Barnett J. R., John P. (1994): *Auxin transport capacity in relation to the dwarfing effect of apple rootstocks*, *J. Hort. Sci.* 69: 719–25
236. Stanisavljević N. (2015): *Karakterizacija i in vitro biološke aktivnosti fenolnih jedinjenja graška (Pisum sativum L.)*, Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet (143)
237. Stenlid G. (1976): *Effect of flavonoids on the polar transport of auxins*, *Physiologia Plantarum* 38 (4): 262–266
238. Stevenson D., Hurst R. (2007): *Polyphenolic phytochemicals – Just antioxidants or much more?*, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64, 2900–2916. doi:10.1007/s00018–007–7237–1
239. Steward F.C., Mapes M.O., Mears K. (1958): *Growth and organized development of cultured cells, II. Organization in cultures grown from freely suspended cells*, *Am. J. Bot.* 45: 705–708
240. Stikić R., Jovanović Z. (2012): *Fiziologija stresa biljaka*, Poljoprivredni Fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd (216)
241. Stobbe H., Schmitt U., Eckstein D., Dujesiefken D. (2002): *Developmental stages on fine structure of surface callus formed after debarking of living lime trees (Tilia sp.)*, *Annals of Botany* 89(6): 773–782

242. Stoddard F.L., Mc Cully M.E. (1979): *Histology of the development of the graft union in pea roots*, Canadian Journal of Botany 57(14): 1486–1501
243. Stoutemyve V.T., Britt O.K. (1963): *Tissue culture of juvenile and adult specimens of ivy*, Nature 199: 397–398
244. Stoutemyve R.T., Britt O.K. (1969): *Growth and habituation in tissue cultures of English ivy, Hedera helix*, American Journal of Botany 56(2): 222–226
245. Street H.E. (1973): *Plant tissue and cell culture*, Blackwell Scientific Publications
246. Sugimoto K., Jiao Y., Meyerowitz E.M. (2010): *Arabidopsis regeneration from multiple tissues occurs via a root development pathway*, Dev. Cell 18: 463–471
247. Sukanto L.A. (2011): *Effect of physiological age and growth regulators on callus browning of coconut endosperm in vitro culture*, Biotropia 18(1): 31 – 41
248. Świerczyński S., Stachowiak A. (2007): *Propagation efficiency of four cultivars of Prunus serrulata (Lindl.) on two rootstocks*, Nauka Przyroda Technologie 1(3). Dostupno na: http://www.npt.up-poznan.net/pub/art_1_45.pdf (pristupljeno 2. februara 2016)
249. Takashina T., Nakano H., Kato R. (2003): *Efficient Plant regeneration culture from leaf explants of in vitro grown sweet cherry (Prunus avium)*, Acta Horticulturae 622: 123–127
250. Takhtajan, A. (1997): *Diversity and Classification of Flowering Plants*, Columbia University Press, New York (620)
251. Tang H., Ren Z., Krczal G. (2000): *Somatic embryogenesis and organogenesis from immature embryocotyledons of three sour cherry cultivars (Prunus cerasus L.)*, Scientia Horticulturae 83(2): 109–126
252. Tiedemann R. (1989): *Graft union development and symplastic phloem contact in the heterograft Cucumis sativus on Curcubita ficifolia*, Journal of Plant Physiology 134(4): 427– 440
253. Todić S., Bešlić Z., Kuljančić I. (2005): *Varying degree of grafting compatibility between cv. Chardonnay, Merlot and different grapevine rootstocks*, Journal Central European Agriculture 6 (2): 115–120

254. Tóth K., Haapala T., Hohtola A. (1994): *Alleviation of browning in oak explants by chemical pretreatments*, *Biologia Plantarum* 36(4): 511–517
255. Treutter D., Feucht W. (1991): *Accumulation of Phenolic-Compounds above the Graft Union of Cherry Trees*, *Gartenbauwissenschaft* 56(3): 134–137
256. Treutter D., Feucht W., Schmid P.P.S. (1986): *Polyphenols of the phloem in relation to incompatibility of interspecific prunus graftings (Prunus-avium L., Prunus cerasus L): I. Flavanones and Flavanols above the Graft Union*, *Gartenbauwissenschaft* 51(2): 77–84
257. Tubbs F.R. (1973): *Research fields in the interaction of rootstocks and scions in woody perennials*, Part 2, *Horticultural Abstracts* 43 (6): 325–335
258. Usenik V., Krška B., Vičan M., Štampar F. (2006): *Early detection of graft incompatibility in apricot (Prunus armeniaca L.) using phenol analyses*, *Scientia Horticulturae* 109(4): 332–338
259. Usenik V., Štampar F. (2000): *Influence of various rootstocks for cherries on p-coumaric acid, genistein and prunin content and their involvement in the incompatibility process*, *Gartenbauwissenschaft* 65(6): 245–50
260. Vavilov N.I. (1949–1951): *Phytogeographic basis of plant breeding. The Origin, Variation, Immunity and Breeding of Cultivated Plants*, *Chronica Botanica* 13: 1–366
261. Verdeil J.L., Alemanno L., Niemenak N., Tranbarger T.J. (2007): *Pluripotent versus totipotent plant stem cells: Dependence versus autonomy?*, *Trends Plant Sci* 12: 245–252
262. Vinterhalter D., Mišić P., Todorović R. (1982): *Mikropropagacija podloge za šljivu (piksi). Praktični aspekti kulture biljnih ćelija organa i tkiva*, I Seminar JDFB, Novi Sad, 87–88
263. Vinterhalter D., Vinterhalter B. (1996): *Kultura in vitro i mikropropagacija biljaka*, Axial, P.O., Beograd (131)
264. Vujović T, Ružić Đ, Cerović R. (2009): *The influence of imidazole fungicide on 4 multiplication in vitro of low-vigorous sweet cherry rootstock Gisela 6*, *Journal of*

265. Vujović T, Ružić Đ, Cerović R. (2012): *In vitro* multiplication as influenced by repeated 7 subculturing of shoots of contemporary fruit rootstocks, Horticulture Sci 39: 101–107
266. Vujović T., Ružić Đ., Cerović R., Šurlan Momirović G. (2010): *Adventitious regeneration in blackberry (Rubus fruticosus L.) and assessment of genetic stability in regenerants*, Plant Growth Regul. 61: 265–275
267. Wang Y., Kollmann R. (1996): *Vascular differentiation in the graft union of in vitro grafts with different compatibility. Structural and functional aspects*, Journal of Plant Physiology 147(5): 521–533
268. War A. R., Paulraj M. G., Ahmad T., Buhroo A. A., Hussain B., Ignacimuthu S., Sharma H. C. (2012): *Mechanisms of plant defense against insect herbivores*, Plant Signaling Behav. 7: 1306–1320
269. Watkins R. (1976): *Cherry, plum, peach, apricot and almond*. In: Simmonds N.W. (Ed.), *Evolution of Crop Plants*, Longman, London: 242–246
270. Wu J., Lin L. (2002): *Ultrasound-induced stress responses of Panax ginseng cells: enzymatic browning and phenolics production*, Biotechnology Progress, 18(4), 862–866
271. Wu Q.Y., Xu L.Y., Gong L.G. (2010): *Qing Qian Liu different explants on tissue culture and the prevention of browning*. Dostupno na: <http://eng.hi138.com/?i131358> (pristupljeno 26. decembra 2015)
272. Yao J.L., Atkinson D., Richardson R., Morris K. (1995): *Regeneration of transgenic plants from the commercial apple cultivar Royal Gala*, Plant Cell Rpt. 14: 407–412
273. Yeoman M.M., Kilpatrick D.C., Miedzybrodzka M.B., Gould A.R. (1978): *Cellular interactions during graft formation in plants, a recognition phenomenon?*, Symposia of the Society for Experimental Biology 32: 139–160
274. Yeoman M.M. (1984): *Cellular recognition systems in grafting*, In: Linskens H.F., Heslop Harrison J. (Eds.), *Cellular interactions*, Encyclopedia of Plant

Physiology, Vol.11, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo: 453–472

275. Yin H., Yan B., Sun J., Jia P.F., Zhang Z.J., Yan X.S., Chai J., Ren Z.Z., Zheng G.C., Liu H. (2012): *Graft-union development: a delicate process that involves cell–cell communication between scion and stock for local auxin accumulation*, Journal of Experimental Botany 63: 4219–4232
276. Zarrouk O., Testillano P.S., Risueño M.C., Moreno M. Á., Gogorcena Y. (2010): *Changes in cell/tissue organization and peroxidase activity as markers for early detection of graft incompatibility in peach/plum combinations*, Journal of American Society for Horticultural Science 135(1): 9–17
277. Zhou H., Ming L., Zhao X., Fan X., Guo A. (2010): *Plant regeneration from in vitro leaves of the peach rootstock 'Nemaguard' (Prunus persica x P. davidiana)*, Plant Cell Tissue and Organ Culture 101(1): 79–87
278. Zhou S., Sauve R. J., Howard E. F. (2002): *Identification of a cell wall peroxidase in red calli of Prunus incisa Thunb. Physiology and biochemistry*, Plant Cell Reports 21: 380–384
279. Zilkah S., Faingersh E., Rotbaum A., Spiegel S., Stein A. (1995): *Symptoms of prunus necrotic ringspot virus on micrografted Prunus serrulata cv. Shirofugen shoot cultures*, Acta Horticulturae 386: 183–186
280. Zimmerman J.L. (1993): *Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants*, Plant Cell 5: 1411–142

ИНТЕРНЕТ ИЗВОРИ:

1. <http://ww2.bgbm.org/EuroPlusMed/> (посећено 15.02.2015. године)
2. <http://esp.cr.usgs.gov/data/little/prunsero.pdf> (посећено 13.08.2013. године)
3. <http://eol.org/pages/632451/names> (посећено 01.05.2015. године)
4. http://eol.org/pages/632451/hierarchy_entries/52830573/names/synonyms (посећено 09.11.2014. године)

Матична стабла домаћих трешања

Prunus avium L.



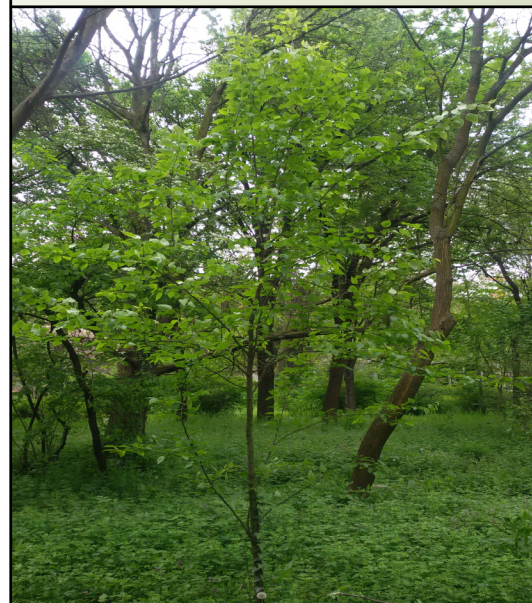
Prunus 'Colt'
(*P. avium* x *P. pseudocerasus*)



Prunus mahaleb L.



Prunus serotina Ehrh.



Матична стабла јапанских трешања

Prunus serrulata Lindl.



Prunus serrulata
'Amanogawa'



Prunus serrulata
'Kanzan'



Prunus serrulata 'Kiku-shidare-zakura'



Изглед младих гранчица домаћих трешања

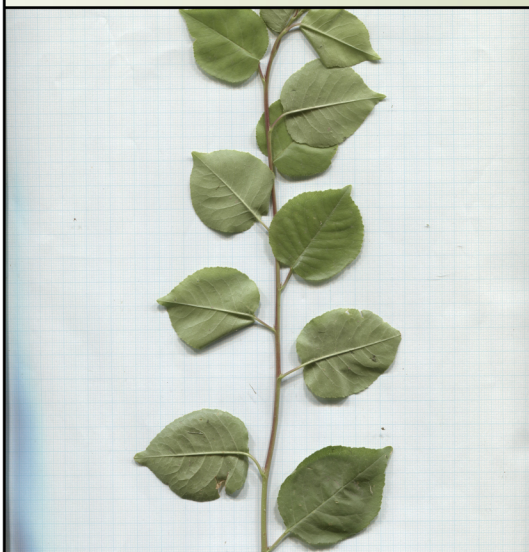
Prunus avium L.



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



Prunus mahaleb L.



Prunus serotina Ehrh.



Изглед младих гранчица јапанских трешања

Prunus serrulata Lindl.



https://sjgbloom2012.files.wordpress.com/2013/04/img_0299.jpg

Prunus serrulata
'Amanogawa'



Prunus serrulata
'Kanzan'



Prunus serrulata 'Kiku-shidare-zakura'



Изглед листова домаћих трешања

Prunus avium L.



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



Prunus mahaleb L.



Prunus serotina Ehrh.



Изглед листова јапанских трешања

Prunus serrulata Lindl.



Prunus serrulata
'Amanogawa'



Prunus serrulata
'Kanzan'



Prunus serrulata 'Kiku-shidare-zakura'

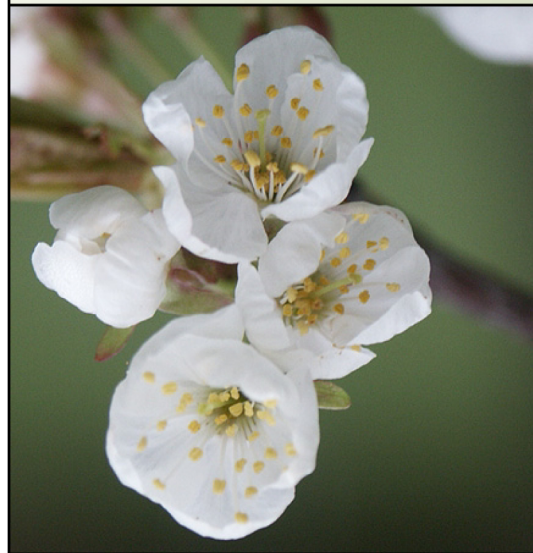


Изглед цветова домаћих трешања

Prunus avium L.



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



Prunus mahaleb L.



Prunus serotina Ehrh.



Изглед цветова јапанских трешања

Prunus serrulata Lindl.



Prunus serrulata
'Amanogawa'



Prunus serrulata
'Kanzan'

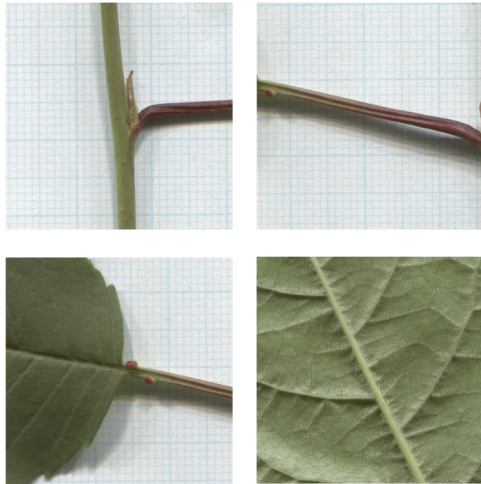


Prunus serrulata 'Kiku-shidare-zakura'



Типови експаната

Prunus avium L.



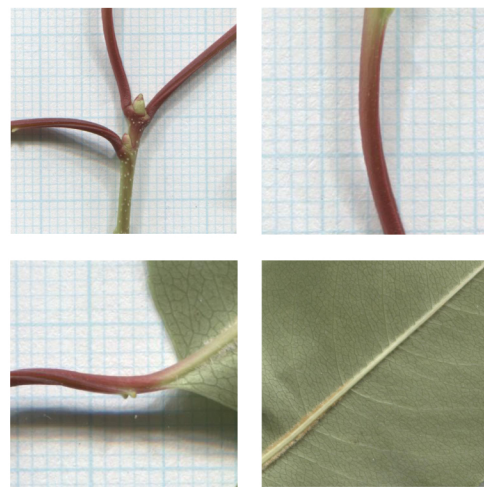
Prunus 'Colt'
(*P. avium* x *P. pseudocerasus*)



Prunus mahaleb L.



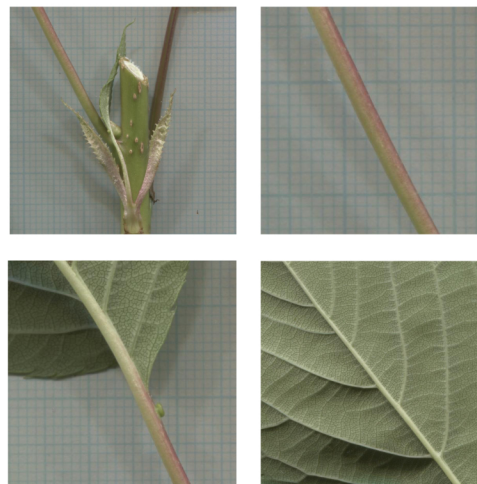
Prunus serotina Ehrh.



Prunus serrulata Lindl.



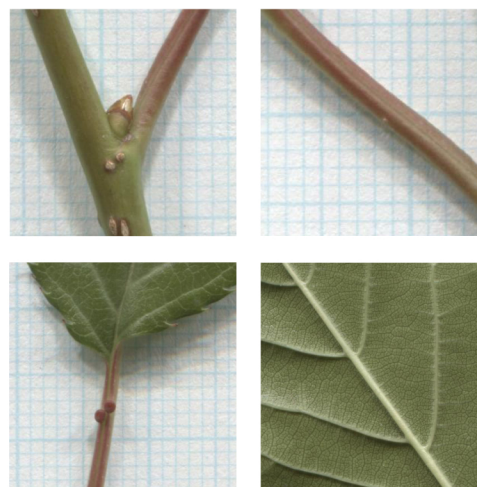
Prunus serrulata
'Amanogawa'



Prunus serrulata
'Kanzan'



Prunus serrulata
'Kiku-shidare-zakura'



БИОГРАФИЈА

Драгана Скочајић је рођена 24.01.1971. године у Београду. Основну и средњу школу завршила је у Лазаревцу а на Шумарском факултету у Београду дипломирала је на Одсеку за Пејзажну архитектуру и децембра 1996. Године. Задовољивши услове конкурса Министарства за науку и технологију, постала је њихов стипендиста а последипломске студије уписује школске 1996/97. године на којима полаже све предвиђене испите са просечном оценом 10 (десет). У звање и на радно место асистента-приправника на предмету Производња садног материјала примљена је 19.04.2001. године (научна област Производња украсних биљака). Магистарски рад под називом: "Утврђивање степена дормантности и оптималних предсетвених третмана семена врста рода *Sorbus*" одбранила је 14.11.2005. године и стекла звање магистра шумарских наука из области пејзажне архитектуре. Од 2001. год. до 2004. учествује на Националном пројекту под називом "Производња шумског садног материјала" а у периоду од 2004. до 2008. године на Националном пројекту "Унапређење наменске производње шумског и украсног садног материјала". У реализацију програма TEMPUS Joint European project- LENNE - Landscape Education for a New Neighbourhood of Europe, Curriculum development for Master Programme in Landscape Planning And Management била је укључена 2005 године. Од 2008. до 2010. као истраживач, ангажована је на пројекту Министарства науке Србије: Екологија, мониторинг и технолошки поступци за контролу инвазивних биљака у биотопима Београда, а од 2011. до 2015. на пројекту Истраживање климатских промена и њиховог утицаја на животну средину – праћење утицаја, адаптација и ублажавање, подпројекат Украсне и инвазивне биљке у условима климатских промена- утицаји и адаптације (ЕВБ 43007/21.), на потпројекту бр. 12 који финансира Министарство за просвету и науку Републике Србије. До сада је објавила укупно 76 научних и стручних радова. Активан је члан Удружења за пејзажну хортикултуру Србије и у организационом одбору стручног семинара "Пејзажна хортикултура" који се традиционално одржава сваке године.

БИБЛИОГРАФИЈА мр Драгана Скочајић

СПИСАК ОБЈАВЉЕНИХ НАУЧНИХ И СТРУЧНИХ РАДОВА

Магистарски рад (М73)

Скочајић, Д. (2005): "Утврђивање степена дормантности и предсетвених третмана за отклањање дормантности семена врста рода *Sorbus*", Магистарски рад (одбрањен 14.11.2005.), Шумарски факултет, Београд.

М21 – 1

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

М23 – 4

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

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

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

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

М51 – 20

Ђукић, М., Ђунисијевић, Д., Грбић, М., **Скочајић, Д.** (2004): Утицај прихрањивања на раст једногодишњих садница смрче у различитим супстратима. *Гласник Шумарског факултета* 89, Београд, 103-113.

Грбић, М., **Скочајић, Д.**, Ђукић, М., Ђунисијевић, Д., Николић, А., (2005): Утицај гиберелинске киселине на клијање семена *Chionanthus virginicus* L. *Гласник Шумарског факултета* бр. 91, Београд, 89-96.

Грбић, М., **Скочајић, Д.**, Ђукић, М., & Ђунисијевић, Д. (2006): Предсетвени третмани за отклањање дормантности семена *Hovenia dulcis* Thunb. Гласник Шумарског факултета 93, Београд: 49-57;

Грбић, М., **Скочајић, Д.**, Ђукић, М., Ђунисијевић, Д. (2006): Утицај парцијалне серотиније код алепског бора, обичног и аризонског чемпреса на клијавост семена. Гласник Шумарског факултета бр. 94, стр. 123-134

Ђукић, М., Грбић, М., **Скочајић, Д.**, & Ђунисијевић, Д. (2006): Спонтане промене као основа за добијање нових култивара украсних садница. Гласник Шумарског факултета 93, Београд: 71-81;

Марковић, М., Грбић, М., **Скочајић, Д.**, Ђунисијевић, Д. (2007): Утицај баланса фитохормона на мултипликацију изданака и оживљавање врсте *Dianthus serotinus* Waldst. & Kit. Гласник Шумарског факултета 95, Београд 83-94

Радуловић С., **Скочајић, Д.**, Бједов И., Ђунисијевић-Бојовић Д., (2008): *Amorpha fruticosa* L. на влажним стаништима Београда, Гласник Шумарског факултета 96, Београд: 221-234;

Скочајић, Д., Грбић М., Томићевић Ј., Ђунисијевић-Бојовић Д., Ђукић М., (2008): *Elaeagnus umbellata* Thunb. као потенцијално инвазивна врста на подручју Београда, Гласник Шумарског факултета 97, Београд: 177-188.

Обратов-Петковић, Д., Бједов, И., Радуловић С., **Скочајић, Д.**, Ђунисијевић-Бојовић Д., Ђукић М. (2009): Екологија и распрострањење инвазивне врсте *Aster lanceolatus* Willd. на влажним стаништима Београда. Гласник Шумарског факултета 2009, бр. 100, стр. 159-178.

Ђукић, М., Ђунисијевић-Бојовић, Д., Грбић, М., **Скочајић, Д.**, Лакићевић, М. (2011): Утицај NaCl и скарификације на клијање семена багренца. *Acta herbologica*. Vol.19. No.2: 71-80. UDK 632.51:581.142

Грбић М., **Скочајић, Д.**, Обратов Петковић Д., Бједов И., Ђукић М., Ђунисијевић Бојовић Д. (2011): Предсетвени третмани за отклањање дормантности семена *Pterocarya stenoptera* C. DC. као индикатора потенцијалне инвазивности, *Glasnik Šumarskog fakulteta* 103, Univerzitet u Beogradu - Šumarski fakultet, Beograd (29-40), DOI:10.2298/GSF1103029GM51-2

<http://glasnik.sfb.bg.ac.rs/pdf/103/02.pdf>

Обратов-Петковић Д., Бједов И., **Скочајић, Д.**, Ђунисијевић-Бојовић Д., Ђукић М., Грбић М. (2011): *Aster lanceolatus* - ксеноспонтана заједница на влажним и приобалним стаништима, *Glasnik Šumarskog fakulteta* 103, Univerzitet u Beogradu - Šumarski fakultet, Beograd (73-92), DOI:10.2298/GSF1103073O

<http://glasnik.sfb.bg.ac.rs/pdf/103/05.pdf>

Ђукић М., Ђунисијевић-Бојовић Д., Грбић М., **Скочајић, Д.**, Обратов-Петковић Д., Бједов И. (2012): Утицај облика азота на раст сејанца инвазивних врста *Acer negundo* L. и *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle, *Glasnik Šumarskog fakulteta* 105, Univerzitet u

Beogradu - Šumarski fakultet, Beograd (61-72), DOI:10.2298/GSF1205061G
<http://glasnik.sfb.bg.ac.rs/pdf/105/05.pdf>

Grbić M., **Skočajić D.**, Đukić M., Đunisijević-Bojović D., Obratov-Petković D., Bjedov I. (2012): Ožiljavanje reznica zelkove kao alternativne neinvazivne vrste „QUICK-DIP” i kontakt metodom, Glasnik Šumarskog fakulteta 105, Univerzitet u Beogradu - Šumarski fakultet, Beograd (51-60), DOI:10.2298/GSF1205051G
<http://glasnik.sfb.bg.ac.rs/pdf/105/04.pdf>

Tomićević J., Grbić M., **Skočajić D.**, Radovanović D. (2012): Stav javnosti grada Beograda o stranim invazivnim drvenastim vrstama, Glasnik Šumarskog fakulteta 105, Univerzitet u Beogradu - Šumarski fakultet, Beograd (189-204), DOI:10.2298/GSF1205189T

Nešić M., Obratov-Petković D., **Skočajić D.**, Bjedov I. (2013): Seed quantity and quality in fruit heads of *Aster lanceolatus* Willd.: Implications for invasion success. Glasnik Šumarskog fakulteta 108, Univerzitet u Beogradu - Šumarski fakultet, Beograd (129-144), DOI:10.2298/GSF1308131N, <http://glasnik.sfb.rs/pdf/108/09.pdf>

Grbić M., **Skočajić D.**, Đukić M., Đunisijević-Bojović D., Obratov-Petković D., Bjedov I. (2014): Otklanjanje dormantnosti semena judinog drveta regulatorima rastenja, Glasnik Šumarskog fakulteta 109, Univerzitet u Beogradu - Šumarski fakultet, Beograd (73-84), DOI:10.2298/GSF1409073G

Marković M., Grbić M., **Skočajić D.**, Đukić M. (2014): Uticaj tipa eksplanta na ožiljavanje i aklimatizaciju vrste *Dianthus serotinus* Waldst. & Kit., Glasnik Šumarskog fakulteta 109, Univerzitet u Beogradu - Šumarski fakultet, Beograd (125-136), DOI:10.2298/GSF1409125M

Đukić M., Đunisijević Bojović D., Grbić M., **Skočajić D.**, Marković M., Samuilov S. (2014): Ekofiziološka svojstva bele i kanadske topole na staništima sa različitim režimom vode, Glasnik Šumarskog fakulteta 110, Univerzitet u Beogradu - Šumarski fakultet, Beograd (73-86), DOI:10.2298/GSF1410073D

Марковић М., **Скочајић Д.**, Грбић М., Ђукић М. (2014): Утицај времена узимања резница и концентрације ИВА на ожиљавање зелених резница дрена (*Cornus mas* L.) пореклом са репрезентативних матичних стабала на подручју Београда. Гласник Шумарског факултета 110, Универзитет у Београду - Шумарски факултет, Београд (105-120)

Грбић М., **Скочајић Д.**, Ђукић М., Ђунисијевић Бојовић Д., Марковић М. (2014): Испитивање особина семена *Vachellia farnesiana* (L.) Wight i Arn. као потенцијално применљиве врсте у Србији у условима климатских промена, Гласник Шумарског факултета 110, Универзитет у Београду - Шумарски факултет, Београд (33-44)

Đunisijević D., **Skočajić, D.**, Đukić, M., Grbić, M. (2002): Spectral light quality influence on seed germination of some horticultural plants. Proceedings of I Symposium on Horticulture, New Technologies in Horticulture, Skopje, Macedonia, 130 -133.

Grbić M., **Skočajić, D.** (2003): Breaking embryo dormancy in evergreen magnolia, aromatic sumach and service-tree by naked stratification. Proceedings of International scientific conference – 75 Years of the Forest Research Institute of Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, 371-375.

Djukić, M., Djunisijević Bojović, D., Grbić, M., **Skočajić, D.**, Dožić, S., & Lukić, S. (2009): Salinity tolerance of woody plants – significance for remediation of salt-degraded soils. International Conference "LAND CONSERVATION"-LANDCON 0905. Tara Mountain/Serbia full paper on CD

Djukić, M., Djunisijević Bojović, D., Grbić, M., **Skočajić, D.**, Dožić, S., & Lukić, S. (2009): Salinity tolerance of woody plants – significance for remediation of salt-degraded soils. International Conference "Land Conservation" - LANDCON 0905. Tara Mountain/Serbia full paper on CD

Đukić, M., Đunisijević-Bojović, D., Obratov-Petković, D., Grbić, M., Bjedov I., **Skočajić D.**, Milojević M. (2010): Stomata properties of invasive plant *Reynoutria japonica* Houtt. i of Topcider river sides. "First Serbian Forestry Congress - Future With Forests" Belgrade, Serbia, Belgrade University, Faculty of Forestry, 11-13 November, 2010. Congress Topics and Papers (1251-1258) ISBN: 978-86-7299-071-3

Đunisijević-Bojović, D., Đukić, M., **Skočajić, D.**, Grbić, M., Bjedov, I., Obratov-Petković, D. Šarić, N. (2010): Biological activity of *Reynoutria japonica* rhizome extracts – effects on seed germination and early seedling development. "First Serbian Forestry Congress - Future With Forests" Belgrade, Serbia, University of Belgrade, Faculty of Forestry, 11-13 November, 2010. Congress Topics and Papers (1259-1264) ISBN: 978-86-7299-071-3. ISBN: 978-86-7299-071-3

Obratov-Petković, D., Bjedov, I., **Skočajić, D.**, Đunisijević-Bojović, D., Đukić, M., Grbić, M. (2010): Asteretum lanceolati- new invasive community on wet and riparian habitats. "First Serbian Forestry Congress - Future With Forests" Belgrade, Serbia, University of Belgrade, Faculty of Forestry, 11-13 November, 2010. Congress Topics and Papers (1166-1177) ISBN: 978-86-7299-071-3

Grbić, M., **Skočajić, D.**, Obratov-Petković D., Bjedov, I., Đukić, M., Đunisijević-Bojović, D. (2010): presowing treatments to breaking seed dormancy of small-winged wingnut (*Pterocarya stenoptera* C. DC) as an indicator of potential invasiveness. "First Serbian Forestry Congress - Future With Forests" Belgrade, Serbia, Belgrade University, Faculty of Forestry, 11-13 November, 2010. Congress Topics and Papers (1178-1186) 1259-1264. ISBN: 978-86-7299-071-

Tomićević, J., Gudurić, I., **Skočajić, D.** (2012) Climate changes and invasive plant species: Raising awareness of the public towards alien invasive plant species in the city

of Belgrade, in: (Ed.) Zlatić, M., Kostadinov, S. (2012) Conference Abstracts, International conference on land conservation – LANDCON 1209, sustainable land management and climate changes, September 17-21, 2012, Danube Region/Serbia, University of Belgrade, Faculty of Forestry, Belgrade, p. 94 (ISBN: 978-86-7299-205-2)

Nešić M., Obratov-Petković D., Bjedov I., **Skočajić D.**, Đunisijević-Bojović D., Samuilov S. (2012): The impact of climate change on reproductive potential of invasive species *Aster lanceolatus* WILLD. Proceedings of International Scientific Conference “Forests in Future - Sustainable Use, Risks and Challenges”. International Scientific Conference “Forests in Future - Sustainable Use, Risks and Challenges”, 4th-5th October 2012, Belgrade, Republic of Serbia: 289-295. <http://www.forest.org.rs/pdf/proceedings-conference2012.pdf>

Đukić, M., Đunisijević-Bojović, D., Obratov-Petković, D., Grbić, M., Bjedov, I., **Skočajić D.**, Milojević M. (2011): Stomata properties of invasive plant *Reynoutria japonica* Houtt. in the area of Topčider River sides. Congress Proceedings "First Serbian Forestry Congress- Future with Forests, Belgrade, Serbia: 1251-1258. ISBN: 978-86-7299-071-3

Đunisijević-Bojović, D., Đukić, M., **Skočajić, D.**, Grbić, M., Bjedov, I., Obratov-Petković, D., Šarić N. (2011): Biological activity of *Reynoutria japonica* rhizome extracts – effects on seed germination and early seedling development. Congress Proceedings "First Serbian Forestry Congress - Future with Forests, Belgrade, Serbia: 1259-1264. ISBN: 978-86-7299-071-3

Grbić, M., **Skočajić D.**, Đukić, M., Đunisijević-Bojović D., (2012): Seed dormancy nature of *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. and other characteristics important for possible invasiveness, Proceedings of International Scientific Conference “Forests in Future - Sustainable Use, Risks and Challenges”. International Scientific Conference “Forests in Future - Sustainable Use, Risks and Challenges”, 4th-5th October 2012, Belgrade, Republic of Serbia: 397-405.

Đunisijević-Bojović D., Đukić, M., Belanović S., **Skočajić D.**, Grbić, M., Bjedov I., Obratov-Petković, D. (2012): Cadmium accumulation in *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle seedlings under phosphorus and iron deficiency. Proceedings of International Scientific Conference “Forests in Future - Sustainable Use, Risks and Challenges”. International Scientific Conference “Forests in Future - Sustainable Use, Risks and Challenges”, 4th-5th October 2012, Belgrade, Republic of Serbia: 885-889.

Stojičić, Đ., Ocokoljić, M., Milošević, B., Čavlović, D., **Skočajić, D.** (2011): *Chimonanthus praecox* (L.) Link. in changed conditions of temperate continental climate in Serbian flora. XIX International Scientific and Professional Meeting ECOLOGICAL TRUTH, Eco-Ist'11, Proceedings, 30-35, ISBN 978-86-80987-84-2

Stojicic, Dj., Ocokoljic, M., Obratov-Petkovic, D., **Skocajic, D.** (2012): Effect of Age and Site on the Yield and Viability of Empress Tree Seeds. Proceedings / XX International Scientific and Professional Meeting ECOLOGICAL TRUTH, Eco-Ist'12. XX International Scientific and Professional Meeting ECOLOGICAL TRUTH, Eco-

Ist'12, May 30 – June 02, 2012, Zajecar, Serbia. ISBN 978-86-80987-98-9, Zoran S. Marković.

Nešić M., Obratov-Petković D., Bjedov I., Belanović S., Đukić M., Đunisijević-Bojović D., **Skočajić D.** (2013): Effects of the invasive species *Aster lanceolatus* Willd. on soil properties. Proceedings of XXI International Scientific and Professional Meeting ECOLOGICAL TRUTH, Eco-Ist'13, University of Belgrade - Technical faculty in Bor, Bor, 64-71. Urednici: Radoje V. Pantovic i Zoran S. Markovic. ISBN 978-86-80987-98-9.

http://www.eco-ist.rs/proceedings_ecoist13.pdf

Djukic, M., Djunisijevic Bojovic, D., Grbic, M., **Skocajic, D.**, Markovic M. (2014): Some Eco-Physiological Properties of Invasive Plant Japanese Knotweed. Plant biology Europe, FESPБ/EPСО 2014 ,Congress, 22nd - 26th June 2014, Dublin, Ireland, Abstract Book p. 372.

M34 – 34

Грбић, М., **Каличанин, Д.** (1997): Утицај температуре складиштења на клијавост семена јеле (*Abies alba* Mill.). XII симпозијум Југословенског друштва за физиологију биљака, Крагујевац, 119

Грбић, М., **Каличанин, Д.** (1997): Утицај регулатора растења на превазилажење дормантности јудиног дрвета (*Cercis siliquastrum* L.), XII симпозијум Југословенског друштва за физиологију биљака, Крагујевац, 111

Грбић, М., **Каличанин, Д.**, Томићевић, Ј. (1999): Упоредна анализа квалитета семена алепског бора (*Pinus halepensis* Mill.) из свежих и серотинозних шишарица. XIII симпозијум Југословенског друштва за физиологију биљака, Београд, 77

Грбић, М., **Каличанин, Д.** (1999): Утицај серотиније на клијавост семена обичног (*Cupressus sempervirens* L.) и аризонског чемпреса (*Cupressus arizonica* Greene). XIII симпозијум Југословенског друштва за физиологију биљака, Београд, 78

Грбић, М., **Скочајић, Д.**, Неделков, И. (2001): Предсетвени третмани за отклањање дормантности семена оскоруше (*Sorbus domestica* L.). XIV симпозијум Југословенског друштва за физиологију биљака, Гоч, 109-110.

Грбић, М., **Скочајић, Д.** (2001): Предсетвени третмани за отклањање дормантности семена крупноцветне магнолије (*Magnolia grandiflora* L.). XIV симпозијум Југословенског друштва за физиологију биљака, Гоч, 112-113.

Grbić M., **Skočajić, D.**, Radanov, S. (2002) The effect of temperature pretreatment on the rooting of *Juniperus virginiana* 'SKYROCKET', *Juniperus media* 'OLD GOLD', *Cupressocyparis leylandii* 'CASTLEWELLAN GOLD', and *Thuja plicata* Donn ex D.Don cuttings. First symposium on horticulture, Ohrid, Skoplje. Book of abstracts, 55.

Грбић, М., **Скочајић, Д.** (2002): Одређивање интензитета инхибиторне дормантности семена *Lactuca* тестом. 7. Симпозијум о флори југоисточне Србије и суседних подручја, Димитровград, Зборник резимеа: 81

Козомара, Б., Винтерхалтер, Б., Грбић, М., **Скочајић, Д.**, Радојевић, Љ. (2003): Вегетативно размножавање *Chimonanthus praecox* L. ожиљавањем резница и културом изданака *in vitro*. XV Симпозијум Југословенског друштва за физиологију биљака, Врдник, 68.

Ђукић, М., Грбић, М., **Скочајић, Д.**, Ђунисијевић, Д. (2003): Спонтана појава атипичних облика променљивости у органогенези неких дрвенастих садница, XV Симпозијум Југословенског друштва за физиологију биљака, Врдник, 57.

Грбић, М., **Скочајић, Д.** (2003): Предсетвени третмани за отклањање дормантности семена рода *Rhus* XV Симпозијум Југословенског друштва за физиологију биљака, Врдник, 99.

Grbić M., **Skočajić, D.** (2003): Breaking embryo dormancy in evergreen magnolia, aromatic sumach and service-tree by naked stratification. Proceedings of International scientific conference – 75 Years of the Forest Research Institute of Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, 371-375.

Djukić, M., Djunisijević, D., Obratov-Petković, D., **Skocajić, D.** (2004): Leaf water potential variation in European plane tree seedlings. The 14th FESPB Congress Book of Abstracts. Cracow, 80-81.

Skočajić, D., Djunisijević, D., Grbić, M., Djukić, M. (2004): Intensity of inhibitor seed dormancy in *Sorbus* by *Lactuca* bioassay. The 14th FESPB Congress, Book of Abstracts, Cracow, 286.

Djunisijevic, D., Djukic, M., Grubisic, D., **Skocajic, D.** (2004): Heteroblasty in seed of *Acer pseudoplatanus* L. – morphometric analyses, effect of stratification and cytokinins. The 14th FESPB Congress, Book of Abstracts, Cracow, 10.

Ђукић, М., Грбић, М., Дожић, С., Ђунисијевић, Д., **Скочајић, Д.** (2004): Утицај микоризних гљива на раст садница смрче. Зборник извода са 8. симпозијума Биотехнологија и агроиндустрија. Институт за истраживања у пољопривреди Србија. Велика Плана, 150.

Грбић, М., **Скочајић, Д.**, Ђукић, М., Ђунисијевић, Д. (2004): Утицај микоризних гљива на клијање семена и развој клијаваца смрче и белог бора. Зборник извода са 8. симпозијума Биотехнологија и агроиндустрија. Институт за истраживања у пољопривреди Србија. Велика Плана, 152.

Ђунисијевић, Д., Грубишић, Д., Ђукић, М., Грбић, М., **Скочајић, Д.**, (2005): Ефекат синтетичког цитокинина – CPPU и других регулатора растенија на клијање хетеробластичних семена јавора (*Acer pseudoplatanus* L.). XVI симпозијум Друштва за физиологију биљака SCG. Program i izvodi saopštenja, Vajina Bašta: 42;

Николић, А., Грбић, М., **Скочајић, Д.**, Ђукић, М., Ђунисијевић, Д. (2005): Испитивање утицаја гиберелинске киселине (GA_3) на клијање семена *Chionanthus virginicus* L. XVI симпозијум Друштва за физиологију биљака СЦГ. Програм и изводи саопштења, Бајина Башта: 43.

Грбић, М., **Скочајић, Д.**, Ђукић, М., Ђунисијевић, Д. (2005): Брза метода за испитивање клијавости семена храста. XVI симпозијум Друштва за физиологију биљака СЦГ. Програм и изводи саопштења, Бајина Башта: 44

Ђукић, М., Ђунисијевић, Д., Грбић, М., **Скочајић, Д.**, & Дожић, С. (2005): Отпорност садница јаворолисног платана на биотички стрес. XVI симпозијум Друштва за физиологију биљака СЦГ. Програм и изводи саопштења, Бајина Башта: 58;

Ђукић, М., Дожић, С., Грбић, М., Ђунисијевић, Д., **Скочајић, Д.**, & Лукић, С. (2005): Ectomycorrhiza in spruce seedlings production. XI конгрес Друштва за проучавање земљишта Србије и Црне Горе: »Земљиште као ресурс одрживог развоја«. Plenarni referati i apstrakti, Budva: 89;

Ђукић, М., Грбић, М., Ђунисијевић, Д., **Скочајић, Д.**, Лукић, С. (2005): Nursery spruce seedlings nutrition. XI конгрес Друштва за проучавање земљишта Србије и Црне Горе: »Земљиште као ресурс одрживог развоја«. Plenarni referati i apstrakti, Budva: 90.

Kozomara B., Vinterhalter B., **Скочајић Д.**, Грбић М., Vinterhalter B., (2006) Propagation of *Chimonanthus praecox* L. by cuttings. International scientific Conference – In occasion of 60 Years of operation of Institute of Forestry, Belgrade, Serbia: Sustainable use of forest ecosystems, The Challenge of the 21th Century. The book of abstracts. Donji Milanovac, Serbia, 8-10th November, 2006, pp. 29.

Ђукић М. Грбић, М., **Скочајић Д**, Ђунисијевић Д. (2007): Influence of plant hormones on seed germination of woody ornamentals. International conference of ornamental plants, Sofia

Грбић, М., Ђукић М., **Скочајић Д**, Ђунисијевић Д. (2007): Quick-dip and contact method in *Zelkova carpinifolia* (Pall.) K. Koch cuttings rooting. International conference of ornamental plants, Sofia

Petrović, O., Obratov-Petković, D., Ђунисијевић-Bojović, D., Скочајић, Д., Ђукић, М., Bjedov, I. (2010): Alelopatski efekat ekstrakta rizoma *Aster lanceolatus* L. i *Equisetum arvense* L. Knjiga apstrakata X Simpozijum on the Flora of Southeastern Serbia and Neighbouring regions. 17-20 jun 2010., Vlasinsko jezero, str. 118. Departman za biologiju i ekologiju PMF Univerziteta u Nišu i Biloško društvo „Dr Sava Petrović“ Niš.

Stojičić, Ђ., Ocokoljić, М., Obratov-Petković, D., and **Скочајић, Д.** (2010): Анализа клијавости врсте *Paulownia tomentosa* (Thunb.) Steud у циљу оплемењивања врсте. Book of Abstracts. 10th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighbouring regions, June 17-20, 2010, Vlasina, Serbia: 119-120. str. ISBN: http://data.sfb.rs/sftp/mirjana.mesicek/Abstract_SFSES.pdf,

Скочајић, Д., Грбић, М., Ђунисијевић-Bojović, D., Ђукић, М., Obratov-Petković, D., & Bjedov, I. (2010): effects of red and far red light on seed germination of *Cercidophyllum japonicum* Siebold et Zucc. First Serbian Forestry Congress - Future With Forests, Congress Abstracts: p. 249. University of Belgrade, Faculty of Forestry,

Belgrade Co-organiser: Institute for Nature Conservation of Serbia. ISBN: 978-86-7299-066-9

Nešić, M., Obratov-Petković, D., Bjedov, I., Belanović, S., Đukić, M., Đunisijević-Bojović, D., **Skočajić, D.** (2012): Impact of the invasive species *Aster lanceolatus* Willd. On soil properties. Book of Abstracts of International Conference on Land Conservation – LANDCON 1209 Sustainable land management and climate changes, September 17-21 2012. September 17 – 21 2012, Danube Region, Republic of Serbia.
http://data.sfb.rs/sftp/landcon1209/Landcon1209_Abstracts.pdf

Grbić, M., Đukić, M., **Skočajić D.**, Đunisijević-Bojović D. (2012): Mass clonal propagation of elms for use in climate changed environment, in: (Ed.) Zlatić, M., Kostadinov, S. (2012) Conference Abstracts, International Conference on Land Conservation – LANDCON 1209 Sustainable land management and climate changes, September 17-21, 2012, Danube Region/Serbia, University of Belgrade, Faculty of Forestry, Belgrade, p. 108 (ISBN: 978-86-7299-205-2)

Đukić, M., Đunisijević-Bojović D., Grbić, M., **Skočajić D.**, (2012): Transpiration of white and euramerican poplar on Ada Ciganlija river island and possible impact on microclimate, in: (Ed.) Zlatić, M., Kostadinov, S. (2012) Conference Abstracts, International Conference on Land Conservation – LANDCON 1209 Sustainable land management and climate changes, September 17-21, University of Belgrade, Faculty of Forestry, Belgrade, p. 177 (ISBN: 978-86-7299-205-2)

Nešić, M., Obratov-Petković, D., Bjedov, I., **Skočajić, D.**, Đunisijević-Bojović D. (2013): Allelopathic potential of invasive species *Aster lanceolatus* Willd. Knjiga apstrakata XI Simpozijum on the Flora of Southeastern Serbia and Neighbouring regions, 13-16 jun 2013, Vlasinsko jezero., str. 55. Departman za biologiju i ekologiju PMF Univerziteta u Nišu i Biloško društvo „Dr Sava Petrović“ Niš. Urednici: Vladimir Randelović, Zorica Stojanović-Radić

Skočajić, D., Grbić, M., Marković, M., Djukić, M. (2013): Viability and germination of *Quercus rubra* L. seeds collected from elite trees in Belgrade area. International Scientific Conference at 85th Anniversary of Bulgarian Academy of sciences and the Forest Research Institute in Sofia, Bulgaria, October 1-2. Book of abstracts, p 17. ISSN 1311 - 8706
http://www.bas.bg/fce/001/0079/files/FRI85_programme.pdf

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Драгана Скочајић

број уписа _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Рано утврђивање компатибилности *Sato-zakura* трешања и домаћих подлога
спајањем калуса у условима *in vitro*

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

Потпис докторанда

У Београду, 27.05.2016.

Драгана Скочајић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Драгана Скочајић

Број уписа _____

Студијски програм _____

Наслов рада ___ Рано утврђивање компатибилности *Sato-zakura* трешања и
домаћих подлога спајањем калуса у условима *in vitro* ___

Ментор др Михаило Грбић, редовни професор Универзитета у Београду –
Шумарски факултет

Потписани Драгана М. Скочајић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској
верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног**
репозиторијума Универзитета у Београду.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског
звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум
одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне
библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 27.05.2016.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Рано утврђивање компатибилности *Sato-zakura* трешања и домаћих подлога спајањем калуса у условима *in vitro*

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 27.05.2016.

Датана Сиоцић

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.