Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2017, 20 (2), 267-274
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan
ISSN 1311-0489 (Print)
ISSN 2367-8364 (Online)

In vitro кълняемост на полен от различни сортове високо храстовидна боровинка отглеждани в Западна Сърбия

Александър Лепосавич[1]*, Милена Джоджевич[1], Радослав Церович[2], Дарко Йевремович[1], Саня Радичевич[1], Драган Джурович[3]

[1]Изследователски институт по овощарство, Чачак, Сърбия
[2]Център за иновации към Факултет по технология и металургия, Белград, Сърбия
[3]Факултет по агрономство, Чачак, Сърбия
**E-mail: aleksandarleposavic@yahoo.com*

In vitro pollen germination of different highbush blueberry cultivars grown in Western Serbia

Aleksandar Leposavić[1]*, Milena Đorđević[1], Radosav Cerović[2], Darko Jevremović[1], Sanja Radičević[1], Dragan Đurović[3]

[1]Fruit Research Institute, Čačak, Serbia
[2]Innovation Centre of Faculty of Technology and Metallurgy, Belgrade, Serbia
[3]Faculty of Agronomy, Čačak, Serbia

***Original scientific paper; Supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Serbia, Project No. TR-31064*

РЕЗЮМЕ

Изследването на *in vitro* кълняемостта на полен е един от основните показатели за функционалната жизненост на полена. Тази характеристика до голяма степен е първият показател за генотипното приспособяване към различни географски условия.

Статията представя резултати за *in vitro* кълняемост на полен на високо храстовидна боровинка от сортове "Река", "Нюи", "Дюк", "Озаркблу" и "Блукроп" (контрола), отглеждани в агроекологичните условия на Западна Сърбия.

По време на тригодишното изследване най-силна кълняемост на полен е отчетена при сорт "Река" (80.93%), а най-слаба при сорт "Нюи" (62.31%). Тъй като климатичните

SUMMARY

In vitro pollen germination test is one of the main indicators of pollen functional viability. This characteristic is in large extent the first indicator of the genotype adaptation to different geographical conditions.

The paper presents the results of *in vitro* pollen germination of highbush blueberry cultivars Reka', 'Nui', 'Duke', 'Ozarkblue' and 'Bluecrop' (control), grown in agro-ecological conditions of Western Serbia.

During the three-year study the highest pollen germination was recorded in cultivar 'Reka' (80.93%), and the lowest in cultivar 'Nui' (62.31%). Since the weather conditions can greatly affect the

условия могат значително да повлияят на изразяването на тези характерни белези, най-слаба кълняемост на полена при всички сортове е отчетена през втората година (70.14%).

Ключови думи: високо храстовидна боровинка, полен, качество, климатични условия

expression of these traits, the lowest pollen germination in all cultivars was recorded in the second year of the study (70.14%).

Key words: highbush blueberry, pollen, quality, germination test

УВОД

Процесът на опрашване на високо храстовидните боровинки зависи до голяма степен от качеството на полена и условията на съхранение (Leposavić, 2014). Stösser et al. (1996) посочват, че качеството на полена варира при сортовете в рамките на определени овощни видове. Някои автори посочват феномена на изменчивост на *in vitro* кълняемостта на полена при отделни видове плодове за година, както и различното влияние на експерименталните условия върху тази характеристика, особено температурата (Pirlak 2002, Cerović et al., 2005, Mert, 2009). Според Pirlak (2002), силната *in vitro* кълняемост на полена при различни температури, за отделни видове и сортове, от гледна точка на редовността на определени фази в процеса на торене, може да бъде първият индикатор за пригодността на генотипите за разнообразни екологични условия.

Изследвайки покълването на полена при няколко храстовидни боровинкови сорта, Merril (1936) установява, че увеличаването на съдържанието на захароза в хранителните среди (над 12%), пропорционално повишава кълняемостта на поленовите зърна.

Обратно, резултатите от изследването на кълняемостта на полени на 6 боровинкови сорта, проведено от Eaton (1966), показват, че увеличаването на съдържанието на захароза в хранителния агар (от 10 до 20%) не оказва влияние върху кълняемостта на поленовите зърна. Най-ниска кълняемост на поленови зърна показва сорт "Weymouth" (5,5%), а най-висока "Pemberton"

INTRODUCTION

The process of pollination and fertilization of highbush blueberries is largely dependent on pollen quality and storage conditions (Leposavić, 2014). Stösser et al. (1996) stated that the quality of pollen varies between cultivars within certain fruit species. Some authors indicated the phenomenon of variation of *in vitro* pollen germination in different fruit species per year, as well as different influence of the experimental conditions on this characteristic, especially temperature (Pirlak 2002; Cerović et al., 2005; Mert, 2009).

According to Pirlak (2002), high *in vitro* pollen germination at different temperatures in various species and cultivars, from the standpoint of the regularity of certain phases of the fertilization process, may be the first indicator of suitability of the genotypes to different environmental conditions.

Studying pollen germination in several highbush blueberry cultivars, Merril (1936) found that the increase of sucrose content in nutrient media (over 12%) proportionally increased germination of pollen grains.

In contrast, the results of the study of pollen germination in 6 blueberry cultivars conducted by Eaton (1966) showed that the increase of sucrose content in nutrient agar (from 10 to 20%) had no influence on the germination of pollen grains. The lowest pollen grain germination showed cultivar 'Weymouth' (5.5%), and the highest 'Pemberton' (70.6%). Wood and Barker (1964)

(70,6%). Wood and Barker (1964) отчитат най-висока кълняемост (35%) на поленови зърна при дива синя нискостеблена боровинка (*Vaccinium angustifolium* Ait.) в хранителна среда, съдържаща 0.5% агар и 13.5% захароза. Кълняемостта на полена при боровинка ”заешко око” (*Vaccinium ashei* Reade) варира от 80.2 до 90.2% в изследванията на Brevis et al. (2006 г.). Според резултатите от Dogterom et al. (2000), поленът на сорт "Блукроп" показва най-висока кълняемост в сравнение с „Патриот“ (съответно 93,2 и 88,8%).

recorded the highest germination (35%) of pollen grains in the wild lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.) in nutrient medium that contained 0.5% agar and 13.5% sucrose.

Pollen germination in rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei* Reade) varied from 80.2 to 90.2% in the trials of Brevis et al. (2006). According to the results of Dogterom et al. (2000), pollen of cultivar ‘Bluecrop’ showed the highest germination comparing to ‘Patriot’ (93.2 and 88.8%, respectively).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Тригодишното проучване (2008-2010г.) е проведено в експериментално боровинково насаждение, създадено през пролетта на 2006 г. в местността Чачак (43°53.654’северна ширина и 20 ° 20.619’ източна дължина, 245 m надморска височина и северо-южна ориентация на реда).

Тригодишни сертифицирани растения са засадени на разстояние 2,5 x 1,5 m. Вътре-редовото пространство е покрито с 10 cm дървесни стърготини, получени от иглолистни дървета (Leposavić, 2014).

In vitro тест за кълняемост на полен се използва за оценка на жизнеспособността на полена. Клони с цветове в пълен цъфтеж, от всички сортове са използвани за теста. Прашниците се съхраняват в хартиени кутии при температура 20 °C в продължение на 24-48 часа, до момента на разкъсване и освобождаване на поленовите зърна. Поленът от всеки сорт се инокулира в три петриеви блюда върху хранителна среда (1% агар и 12% захароза).

След 24 часа инкубация при 20 °C, броят на покълналите поленови зърна се оценява в три полета на видимост под светлинния микроскоп Olympus BX61 (Olympus, Tokyo, Japan). Зрителното поле на микроскопа включва около 100 поленови зърна. Поленови зърна, които покълнали надвишават своя радиус, се считат за покълнали зърна (Galleta, 1983). Делът на покълналите зърна годишно е изчислен като среден брой на

MATERIAL AND METHODS

The three-year study (2008−2010) was carried out in the experimental blueberry plantation established in the spring of 2006 in the locality Čačak (43°53.654’ north latitude and 20°20.619’ east longitude, 245 m altitude, and north-south row orientation).

Three-year old certified plants were planted at a distance of 2.5 x 1.5 m. The inter-raw space was layered with 10 cm of sawdust obtained from coniferous trees (Leposavić, 2014).

In vitro pollen germination test have been used to estimate pollen viability. Branches with flowers in the full bloom stage all of cultivars were used for the test. Anthers were kept in paper boxes at a temperature of 20 °C for 24-48 h, until the moment of rupture and the release of pollen grains. Pollen of each cultivar was inoculated into three Petri dishes on the nutrient medium (1% agar and 12% sucrose).

After 24 h of incubation on 20 °C the number of germinated pollen grains was evaluated in three fields of view under light microscope Olympus BX61 (Olympus, Tokyo, Japan). Microscope field of view included about 100 pollen grains. Pollen grains that germinated exceeding their radius were considered as germinating grains (Galleta, 1983). The share of germinated grains per year was evaluated as average number of

покълнали поленови зърна на девет различни микроскопични зрителни полета.

Получените данни са статистически анализирани, като е използван двуфакторен (А - сорт, Б - година) дисперсионен анализ (ANOVA) (Hadživuković, 1991). Значението на разликите между средните стойности по отношение на стандартния сорт "Блукроп" е определен чрез тест на Данет (Dunnett, 1955). Значението на разликите между средните стойности за година и средните стойности на взаимодействие на сортове (вариант на опрашване) х година е определен чрез множествен тест за достоверност на разликите на Дънкан (Duncan Multiple Range) (Duncan, 1955).

germinated pollen grains on nine different microscopic fields of view.

Obtained data were statistically analyzed using two factor (A - cultivar, B - year) analysis of variance (ANOVA) (Hadživuković, 1991). The significance of differences among mean values in regard to standard cultivar 'Bluecrop' was determined by Dunnett test (Dunnett, 1955).

The significance of differences among mean values per year and interaction mean values of cultivars (pollination variant) x year was determined by Duncan multiple range test (Duncan, 1955).

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

In vitro тестът за покълване на полен е един от основните показатели за функционалната жизнеспособност на полена. Факторите, влияещи върху покълването на полена, са: вид на плода, хранителен и здравен статус на растението, местоположение на цветовете в растението, метеорологични условия, време и начин на събиране и съхраняване на полена, плътност на инокулирания прашец върху хранителната среда, състав и pH на средата и т.н. (Stanley and Linskens, 1974).

Като се използва *in vitro* тест за кълняемост, се считат за покълнали само зърна от полени, покълнали върху хранителна среда, надвишаваща радиуса им.

Анализът на изменчивостта на покълване на полена показва значителни разлики между сортове, година и различна кълняемост на сортовете годишно (Таблица 1, Фигура 1).

Значително по-голяма кълняемост на полени по отношение на контролния сорт, средна стойност за три години, показва сорт "Река". Тъкмо обратното, най-ниска кълняемост на полени е отчетена при сорт "Нюи" (P<0,01). Значително по-висока кълняемост на полен, независимо от сорта, е доказана през третата година от изследването. Като цяло, по-ниската кълняемост през втората година е следствие от по-ниската

RESULTS AND DISCUSSION

In vitro pollen germination test is one of the main indicators of pollen functional viability. Factors affecting pollen germination are: fruit species, nutritional and health status of the plant, flower position on the plant, weather conditions, time and manner of pollen collection and storage, density of inoculated pollen on the nutrient medium, composition and pH value of the medium, etc. (Stanley and Linskens, 1974).

Using *in vitro* germination test, only pollen grains that germinated on nutrient media exceeding their radius were considered as germinating grains

Analysis of variance of pollen germination showed significant differences between cultivars, year and different germination of cultivars per year (Table 1, Figure 1).

Significantly higher pollen germination in regard to control cultivar, mean value for three years, showed cultivar 'Reka'. On the contrary, the lowest pollen germination was recorded in cultivar 'Nui' (P<0.01). Significantly higher pollen germination, regardless cultivar, was evidenced in the third year of the study. In general, lower germination in the second year is a consequence of the lower pollen

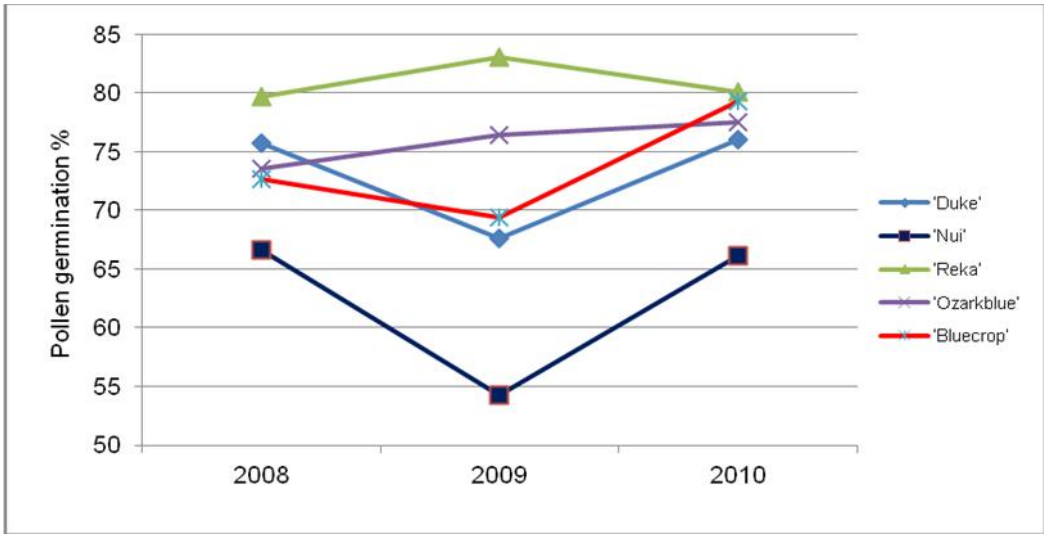
кълняемост на полени при сортове "Нюи", "Блукроп" и "Дюк", както посочват Cerović et al. (2005). Същите автори отчитат появата на изменчивост при *in vitro* кълняемостта на полена в различните видове плодове за година.

germination in cultivars ‘Nui’, ‘Bluecrop’ and ‘Duke’, as reported by Cerović et al. (2005). The same authors stated the occurrence of variation of *in vitro* pollen germination in different fruit species per year.

Таблица 1. Кълняемост на полен in vitro (%) от високо храстовидни боровинкови сортове, от 2008 до 2010 г.
Table 1. Pollen germination *in vitro* (%) of highbush blueberry cultivars, from 2008 to 2010

Третиране/Treatment			
Сорт/Cultivar		‘Duke’	73.13 ns
		‘Nui’	62.31**
		‘Reka’	80.93**
		‘Ozarkblue’	75.87 ns
		‘Bluecrop’	73.76
Година/Year		2008	73.65 a
		2009	70.14 b
		2010	75.81 a
	‘Duke’	2008	75.76 a-d
		2009	67.61 de
		2010	76.02 a-d
	‘Nui’	2008	66.60 e
		2009	54.22 f
		2010	66.11 e
	‘Reka’	2008	79.68 ab
		2009	83.05 a
		2010	80.07 ab
	‘Ozarkblue’	2008	73.60 b-e
		2009	76.45 a-d
		2010	77.55 abc
	‘Bluecrop’	2008	72.63 b-e
		2009	69.35 c-e
		2010	79.30 ab
ANOVA			
Cultivar (A)/Сорт (А)			**
Year (B)/Година (Б)			**
A × B			**

Asterisk represents significant differences between mean values of ‘Bluecrop’ (control) and other cultivars for *P*<0.05 (*) and *P*<0.01 (**) based on Dunnett test and the results of ANOVA (F test); ns – not significant.
Means per rows for year and interaction mean A×B marked with the same lowercase letter represent that there are no differences for *P*<0,01 based on Duncan multiple range test.
Звездичката представя значимите разлики между средните стойности на сорт "Блукроп" (контрола) и други сортове за P<0.05 (*) и P<0.01 (**) на базата на тест на Данет и резултатите от ANOVA (F тест); Ns - не е значителен.
Средните стойности от редове за година и средното взаимодействие AxB отбелязано със същата малка буква, показват, че няма разлики за P <0,01 въз основа на множествен тест за достоверност на разликите на Дънкан.



Фиг. 1. Кълняемост на полен при сортове високо храстовидна боровинка от 2008 г. до 2010 г.
Fig. 1. Pollen germination of highbush blueberry cultivars, from 2008 to 2010

Сортовете "Река" и "Озаркблу" показват една и съща кълняемост на полени по време на цялото проучване. Сорт "Нюи" показва значително по-ниска кълняемост на полени, в сравнение с други сортове за всичките години. Pirlak (2002) установява, че тази характеристика може да показва по-ниска приспособимост към почвено-климатичните характеристики на местността. Това трябва да се има предвид при избора на сорт боровинки за засаждане.

Освен по-ниската кълняемост на полена на сорт "Нюи", кълняемостта на полена на други сортове е по-висока от най-голямата стойност на сорт "Pemberton" (70,6%), както отчита Eaton (1966). Wood & Barker (1964) отбелязват ниска поленова кълняемост (35%) при високо храстовидни боровинкови сортове. Значително по-високи стойности на този показател са отчетени от Brevis et al. (2006). Dogterom et al. (2000) установяват по-високи стойности (93,2%) на кълняемост на полени при сорт "Блукроп", отколкото са отчетени в нашето изследване.

Cultivars ‘Reka’ and ‘Ozarkblue’ showed the same pollen germination during entire study. Cultivar ‘Nui’ showed the significantly lower pollen germination in regard to other cultivars during all years. Pirlak (2002) stated that this characteristic may indicate its lower adaptability to agricultural and ecological characteristics of the locality. This should be considered when selecting blueberry cultivars to plant.

Apart lower pollen germination of cultivar ‘Nui’, pollen germination of other cultivars is higher than the highest value of cultivar ‘Pemberton’ (70.6%), as reported by Eaton (1966). Wood & Barker (1964) recorded low pollen germination (35%) in highbush blueberry cultivars. Significantly higher values of this characteristic were reported by Brevis et al. (2006).

Dogterom et al. (2000) reported higher values (93.2%) of pollen germination for cultivar ‘Bluecrop’ than reported in our study.

ИЗВОДИ

Въз основа на резултатите от тригодишното проучване на помологичните характеристики на пет сорта високо храстовидни боровинки: "Река", "Дюк", "Нюи", "Озаркблу" и "Блукроп" може да се направи изводът, че *in vitro* кълняемостта на полена е сортова характеристика. Най-висока стойност на поленова кълняемост показва сорт "Река" (80.93%), а най-ниска сорт "Нюи" (62.31%). Тези резултати може да показват ниска адаптивност на сорт "Нюи" към почвено-климатичните характеристики на местността, където експериментът е проведен.

CONCLUSIONS

Based on the results of the three-year study of pomological characteristics of five highbush blueberry cultivars: 'Reka', 'Duke', 'Nui', 'Ozarkblue' and 'Bluecrop' we may conclude that in vitro pollen germination represents cultivar's characteristic. The highest value of pollen germination showed cultivar 'Reka' (80.93%), and the lowest cultivar 'Nui' (62.31%). These results may indicate low adaptability of the cultivar 'Nui' to agricultural and ecological characteristics of the locality where the experiment was established.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Brevis, P. A., D. S NeSmith., H. Y. Wetzstein, D. B. Hausman**, 2006. Production and viability of pollen and pollen-ovule ratios in four rabbiteye blueberry cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 131: 181−184.
2. **Galletta, G. J.**, 1983. Pollen and seed management. In: Methods in Fruit Breeding. Moore J. N., Janick J. (eds). Purdue University Press, West Lafayette, Indiana, pp. 23−47.
3. **Dogterom, M. H, M. L Winston and A. Mukai**, 2000. Effect of pollen load size and source (self, outcross) on seed and fruit production in highbush blueberry cv. 'Bluecrop' (*Vaccinium corymbosum*; *Ericaceae*). *American Journal of Botany*, 87 (11), 1584-1591.
4. **Duncan, D. B.**, 1955. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics*, 11: 1-42.
5. **Dunnett, C. W.**, 1955. A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *Journal of the American Statistical Association*, 50: 1096-1121.
6. **Eaton, G. W.**, 1966. Production of highbush blueberry pollen and its germination in vitro as affected by pH and sucrose concentration. *Canadian Journal of Plant Science*, 46: 207−209.
7. **Leposavić, A.**, 2014. Pomological properties of newly introduced highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) cultivars. University of Novi Sad, Faculty of Agriculture, 1−127 + 29 (Sr).
8. **Merrill, T. A.**, 1936. Pollination of the highbush blueberry. *Michigan Agricultural Experiment Station Technical bulletin*, 151.
9. **Mert, C.**, 2009. Temperature responses of pollen germination in walnut (*Juglans regia* L.). *Journal of Biological & Environmental Sciences*, 3 (8), 37−43.
10. **Pirlak, L.**, 2002. The effects of temperature on pollen germination and pollen tube growth of apricot and sweet cherry. *Gartenbauwissenschaft*, 67 (2), 61−64.
11. **Stanley, R. G. and H. F. Linskens**, 1974. Pollen: Biology, Biochemistry and Management. Springer Berlin.
12. **Stösser, R., W. Hartman and S. F. Anvari**, 1996. General aspects of pollination and fertilization of pome and stone fruit. *Acta Horticulturae*, 423: 15−22.

13. **Hadživuković, S.**, 1991 Statistički metodi s primenom u poljoprivrednim i biološkim istraživanjima. Poljoprivredni fakultet - Institut za ekonomiku poljoprivrede i sociologiju sela, Novi Sad (Sr).
14. **Cerović, R., Đ. Ružić, S. Radičević, M. Kuzmanović**, 2005. Određivanje sortne kompozicije oprašivača za trešnju cv Čarna. *Voćarstvo*, 39 (152), 347−355 (Sr).
15. **Wood, G. W. and W. G. Barker**, 1964. Preservation of blueberry pollen by the freeze-drying process. *Canadian Journal of Plant Sci*ence, 44: 387−388.