ISSN 1311-0489 (Print)
ISSN 2367-8364 (Online)

Agricultural Academy

# JOURNAL OF MOUNTAIN AGRICULTURE ON THE BALKANS

Volume 21

Number 5, 2018

Published by
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture
Troyan, Bulgaria

**AGRICULTURAL ACADEMY, SOFIA, BULGARIA**

# JOURNAL OF MOUNTAIN AGRICULTURE ON THE BALKANS (JMAB)®

**ISSN 1311-0489 (Print); ISSN 2367-8364 (Online)**

JOURNAL OF MOUNTAIN AGRICULTURE ON THE BALKANS is a bilingual journal issued six times a year by the Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture (RIMSA) in Troyan, Bulgaria. Its scope includes basic and applied researches relevant to agriculture and stockbreeding in the mountain, hilly and lowland areas in Bulgaria and abroad. JMAB is an international free open access web based scientific journal dedicated to the publication and discussion of high-quality research in the field of Stockbreeding, Forage Production and Grassland Management, Annual and Perennial Plants and General Agriculture. It publishes original scientific papers, overviews and short communications which are doubleblind peer reviewed.

*For contributions and subscription information, please contact the Editorial Office:*
*RIMSA, 281, Vasil Levski Str.*
*5600 Troyan, Lovech District*
*Bulgaria*
*Tel.: +359/670/66914*
*Mobile: +359/877/743604*
*E-mail: jma@mail.bg*
*Website: http://www.rimsa.eu/index.php/journal*

*Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2018, 21 (5), 152-163* ISSN 1311-0489 (Print)
*Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan* ISSN 2367-8364 (Online)

# Наличие на несъвместими поленови тръбички в стълбчето на сливов сорт "Позна Плава"

Милена Джорджевич[1]*, Радосав Церович[2], Саня Радичевич[1], Ивана Глишич[1], Небойша Милошевич[1], Сладжана Марич[1], Милан Лукич[1]

*[1]Изследователски институт по овощарство, ул. "Краля Петра I" 9, 3200 Чачак, Република Сърбия*
*[2]Белградски университет, Център по иновации към Факултет по технология и металургия, "Карнегиева" 4, 11120 Белград, Република Сърбия*

# Occurrence of the incompatible pollen tubes in the style of plum cultivar ‘Pozna Plava’

Milena Đorđević[1]*, Radosav Cerović[2], Sanja Radičević[1], Ivana Glišić[1], Nebojša Milošević[1], Slađana Marić[1], Milan Lukić[1]

*[1]Fruit Research Institute, Kralja Petra I/9, 32000 Čačak, Republic of Serbia*
*[2]University of Belgrade, Innovation Centre at Faculty of Technology and Metallurgy, Karnegijeva 4, 11120 Belgrade, Republic of Serbia*
**Email: mdjordjevic@institut-cacak.org*

*Received:* 30.04.2018 *Accepted:* 17.12.2018 *Published:* 21.12.2018

## РЕЗЮМЕ

Самостерилността, чрез разпознаване и отхвърляне на собствен или генетично идентичен полен, при овощните култури, не позволява самоопрашване. Появата на гаметофитна несъвместимост е придружена от неравномерно нарастване на поленовата тръба с обилно натрупване на калус в нея. За период от три години е проучена несъвместимостта на поленовата тръба в стълбчето на сливов сорт "Позна Плава" при три варианта на опрашване, като се изполэва анилиново синьо оцветяване за наблюдение под флуоресцентен микроскоп. Вариантите на опрашване са свободно, кръстосано с "Чачанска найболя", "Презента", "Ханита" и самоопрашване.

Във всички изследвани варианти

## SUMMARY

Self-incompatibility in fruits prevents self-fertilization by recognition and rejection of its own or genetically identical pollen. Occurrence of gametophyte incompatibility is accompanied by irregular pollen tube growth with an abundant accumulation of callose in it.

In a three-year period, pollen tube incompatibility in the style of the plum cultivar ‘Pozna Plava’ in three pollination variants was analysed using fluorescent microscopic aniline blue staining method. Pollination variants were open, cross- (‘Čačanska Najbolja’, ‘Presenta’, ‘Hanita’) and self-pollination.

In all the analysed variants, the

е установено наличие на поленови тръби с типични признаци на несъвместимост. В повечето случаи несъвместимите поленови тръби спират растежа си в горната третина на стълбчето. При кръстосаното опрашване със сортовете "Ханита" и "Чачанска найболя" са наблюдавани несъвместими поленови тръби във втората третина на стълбчето. Най-висок процент на несъвместими поленови тръби 4.84% е отчетен във варианта на самоопрашване.

По-нисък процент на несъвместими поленови тръби е отчетен във варианта на кръстосано опрашване със сорт "Чачанска найболя" (3.06), което може да се обясни с това, че е родител на сорта "Позна Плава". Най-ниският процент (по-малко от 1.3%) на несъвместими поленови тръби е открит при варианта на кръстосано опрашване със сортовете "Презента" и "Ханита".

**Ключови думи**: сливи, стълбче, флуоресцентен микроскоп, несъвместими поленови тръби

presence of pollen tubes with typical signs of incompatibility was found. In most cases, incompatible pollen tubes stopped their growth in the upper third of the style. In a cross-pollination with the cultivars ‘Hanita’ and ‘Čačanska Najbolja’ incompatible pollen tubes in the second third of the style were seen as well. The highest percentage of incompatible pollen tubes 4,84% was found in a self-pollination variant.

Somewhat lower percentage of incompatible pollen tubes was found in a cross-pollination variant with the cultivar ‘Čačanska Najbolja’ (3,06%), which can be explained by being a parent of the cultivar ‘Pozna Plava’. The lowest percentage (less than 1,3%) of incompatible pollen tubes was found in a cross-pollination variant with the cultivars ‘Presenta’ and ‘Hanita’.

**Key words**: plum, style, fluorescent microscope, incompatible pollen tubes

## УВОД

При видовете от род *Prunus*, стълбчето на цвета принадлежи към т.н. влажен тип, с клетъчни секреторни продукти върху близалцето, което дава възможност за кълняемост на полена и за проникване на поленовата тръба в тъканта на близалцето (Nasrallah et al., 1991). Проводящият канал е в центъра на стълбчето, съставен от удължени клетки, които отделят пектиназната извънклетъчна матрица (Crawford and Yanofski, 2008). След като поленът полепне по близалцето, по-нататъшни процеси, включващи хидратация, кълняемост, растеж през проводящата тъкан на стълбчето, насочване към микропила и в крайна сметка взаимодействие с женските гаметофити, се ръководят и регулират от женския спорофит (Higashiyama and Hamamura, 2008; Palanivelu and Tsukamoto, 2011).

Изследвайки растежа на поленовите тръби при черешите, Radičević

## INTRODUCTION

In the genus *Prunus*, the style belongs to the wet type with secretory cell exudates on the stigma which enabling pollen germination and pollen tube penetration into the tissue of the stigma (Nasrallah et al., 1991).

Conductive channel is in the centre of the style composed of elongated cells which excreting the pectinase extracellular matrix (Crawford and Yanofski, 2008). After pollen adhesion on the stigma, further events including hydration, germination, growth through the conductive tissue of the style, guidance to micropyle and in the end, interaction with female gametophyte are guided and regulated by the female sporophyte (Higashiyama and Hamamura, 2008; Palanivelu and Tsukamoto, 2011).

By examining the growth of pollen tubes in cherries, Radičević (2013) points

(2013) посочва по-бърз растеж на поленовите тръби в стълбчето, отколкото в яйчника, което показва зависимостта на броя на поленовите тръби и скоростта на растежа на използваните опрашители на спорофитите на майчиното растение. Намаляването на броя на поленовите тръби в стълбчето е свързано с намаляване на проводимия канал и следователно наличието на хранителни вещества (Herrero, 1992).

Самостерилността е един от най-важните механизми на растенията, за недопускане на самоопрашване и за стимулиране на кръстосано опрашване (Frankling-Tong and Franklin, 2003). При растенията има два вида самостерилност – спорофитна и гаметофитна. Спорофитината се среща при малък брой растения от семейства *Brassicaceae*, *Asteraceae и Convolvulaceae*, докато гаметофитичният тип е по-разпространен (Igic and Kohn, 2001).

За разлика от други видове от род *Prunus*, при които има гаметофитна самостерилност, при домашната слива се наблюдават и двата вида. (Botu et al., 2002). Спорофитната самостерилност се обуславя от локусна мутация, отговорна за образуването на полен и цитоплазмения стерилитет (Kota and Lacis, 2013). Гаметофитната система се основава на алелния полиморфизъм на *S*-RNase на кодиращия ген или *S*-гена и въз основа на неговата проява, сортовете се класифицират в три групи: самофертилни, частично самофертилни и самостерилни (Botu et al., 2002).

Традиционният подход за тестване на самосъвместимостта при овощните дървета е определен чрез проследяване на процента на плодния завръз при полски условия. Друг метод е да се изследва растежа на поленови тръби в стълбчето и да се открият несъвместимите, използвайки флуоресцентен микроскоп (Kho i Baër, 1971). Напоследък се използват два молекулярни метода за тестване на стерил-

to a faster growth of pollen tubes in the style than in the ovary, indicating the dependence of pollen tubes numbers and the growth rate of used pollinators of the sporophytes of the mother plant. Reduction in the numbers of pollen tubes along the style is associated with the reduction of the conductive channel, and therefore the availability of nutrients (Herrero, 1992).

Self-incompatibility is one of the most important mechanisms of plants to prevent self-pollination and enhance cross-pollination (Frankling-Tong and Franklin, 2003). In plants, there are two types of self-incompatibility, sporophytic and gametophytic. The sporophytic type is found in a small number of plants from the families *Brassicaceae*, *Asteraceae and Convolvulaceae*, while the gametophytic type is more prevalent (Igic and Kohn, 2001).

Unlike other species of the genus *Prunus*, in which there is a gametophytic system of incompatibility, both types of self-incompatibility are seen in domestic plum (Botu et al., 2002). Sporophytic incompatibility is conditioned by locus mutation, responsible for pollen formation and cytoplasmic sterility (Kota and Lācis, 2013). The gametophytic system is based on the allelic polymorphism of the *S*-RNase of the coding gene or *S*-gene, and based on its manifestation, cultivars are classified into three groups: self-compatible, partially self-compatible and self-incompatible (Botu et al., 2002).

A traditional approach to test self-compatibility in fruit trees have been determinated by monitoring the fruit set percentage under field conditions. Another method is to examine the growth of pollen tubes in the style and to detect incompatible pollen tubes using a fluorescence microscope (Kho i Baër, 1971). More recently, two molecular methods for testing self-incompatibility have been used: determination of style ността: определяне вида на рибонуклеазата (S-RNase) и ДНК амплификация и идентификация чрез PCR анализ (Halász et al., 2010).

Изследванията в настоящата статия целят да определят наличието на несъвместими поленови тръби в стълбчето на "Позна Плава" в три варианта на опрашване: свободно, кръстосано и самоопрашване.

ribonuclease (S-RNase) and DNA amplification and identification by PCR analysis (Halász et al., 2010).

The research in this paper was aimed at determining the presence of incompatible pollen tubes in the style of ‘Pozna Plava’ in three variants of pollination: open, cross- and self-pollination.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

По време на тригодишния период (2008 г., 2010 г. и 2011 г.) са проведени изследвания в насаждение от сливи в база "Любич" на Изследователски институт по овощарство. Овощната градина е създадена през 2002 г. със сортове, присадени върху подложка джанка (*Prunus cerasifera* L.), при схема 6,0×5,0 m. Като тестов материал е използван сорт "Позна Плава", създаден през 1980 г. в Изследователски институт по овощарство, чрез самоопрашване на сорт "Чачанска найболя", признат е за сорт през 2008 г. В сътрудничество с г-н Klaus Ganter (насаждения на Klaus Ganter Markenbaumschule, Wyhl, Германия) този сливов сорт е защитен в Европейския съюз под името "Čačak Späthe".

Експериментът е заложен при полски условия, по време на фазата на пълен цъфтеж, с три начина на опрашване: свободно, кръстосано (с полен от сорт "Чачанска найболя", "Презента" и "Ханита") и самоопрашване. Поставянето на полен върху плодника на близалцето се прави в момента, когато се наблюдава секрецията върху близалцето. При опрашването, опрашените плодници са подложени на тройно последователно фиксиране – 72, 144, 240 часа. За да се фиксират пробите, плодниците веднага се накисват в разтвор на FPA (70% етанол, пропионова киселина и формалдехид, 90:5:5) и се съхраняват при 4°C. За изследване растежа на поленовите тръби в стълбчето е използван флуоресцентно-

## MATERIAL AND METHODS

Investigations were carried out during the three-year period (2008, 2010 and 2011) within the plum plantation at the Ljubic facility of the Fruit Research Institute Čačak. The orchard was established in 2002, with cultivars grafted on a myrobalan (*Prunus cerasifera* L.) rootstock, with a spacing of 6.0×5.0 m. The plum cultivar ‘Pozna Plava’ was used as a test material, created in 1980 at the Fruit Research Institute from the self-pollination of the cultivar ‘Čačanska Najbolja’, recognized as a cultivar in 2008. In cooperation with Mr. Klaus Ganter (plantations of Klaus Ganter Markenbaumschule, Wyhl, Germany) this plum cultivar has been protected in the European Union under the name ‘Čačak Späthe’.

Under field conditions, during the full flowering sub-phase, experiment was set with three pollination vartiant: open, cross- (pollen of the ‘Čačanska Najbolja’, ‘Presenta’ and ‘Hanita’ cultivars) and self-pollination. The application of pollen on the pistil stigma was made at the time when the secretion on the stigma was observed. Upon the pollination, pollinated pistils were subjected to the triple successive fixation – 72, 144, 240 hours.

To fix the samples, pistils were immediately soaked in FPA solution (70% ethanol, propionic acid and formaldehyde, 90:5:5 percentages by volume) and stored at 4°C. A fluorescence-microscopic method with aniline-blue as a fluorochrome (Preil, 1970; Kho and Baër, микроскопският метод с анилиново синьо като флуорохром (Preil, 1970; Kho and Baër, 1971) .

Появата на несъвместими поленови тръби в стълбчето е установена чрез флуоресцентен микроскоп (Olympus BX61) с ултравиолетова светлина, като се използва софтуер Multiple Image Analysis in AnalySIS.

## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Появата на гаметофитна несъвместимост е съпроводена с неправилен растеж на поленовите тръби, с изобилно натрупване на калус. Във всички изследвани варианти е установено наличие на поленови тръби с типични признаци на несъвместимост (Фигура 1).

В повечето случаи, несъвместимите поленови тръби спират растежа си в горната третина на стълбчето (Фигура 1a, 1b). Най-голям брой несъвместими поленови тръби са характеризирани с удължен връх, който е повече или по-малко флуоресцентен. Наблюдавани са поленови тръби, удебелени по цялата си дължина, които също така са по-флуоресциращи от други. Малък брой несъвместими поленови тръби се наблюдават в зоната точно под близалцето (Фигура 1c) или във втората третина на стълбчето.

Само през 2010 г. се наблюдава наличие на несъвместими поленови тръби във втората третина на стълбчето, при варианта на кръстосано опрашване със сорт "Ханита" (60%) и със сорт "Чачанска найболя" (17%) .

Връхчето на несъвместимата поленова тръба е най-често кръгло, но също така са наблюдавани несъвместими поленови тръби с неправилно оформени върхове (Фигура 1d, 1e). Освен типичните признаци на несъвместимост, са наблюдавани поленови тръби с по-силни или по-слаби разклонения, по-малко на брой, (Фигура 1f, 1g).

1971) was used to examine the growth of pollen tubes in the style.

The occurrence of incompatible pollen tubes in the style was done on the fluorescent microscope (Olympus BX61) under ultraviolet light, using Multiple Image Analysis in AnalySIS software.

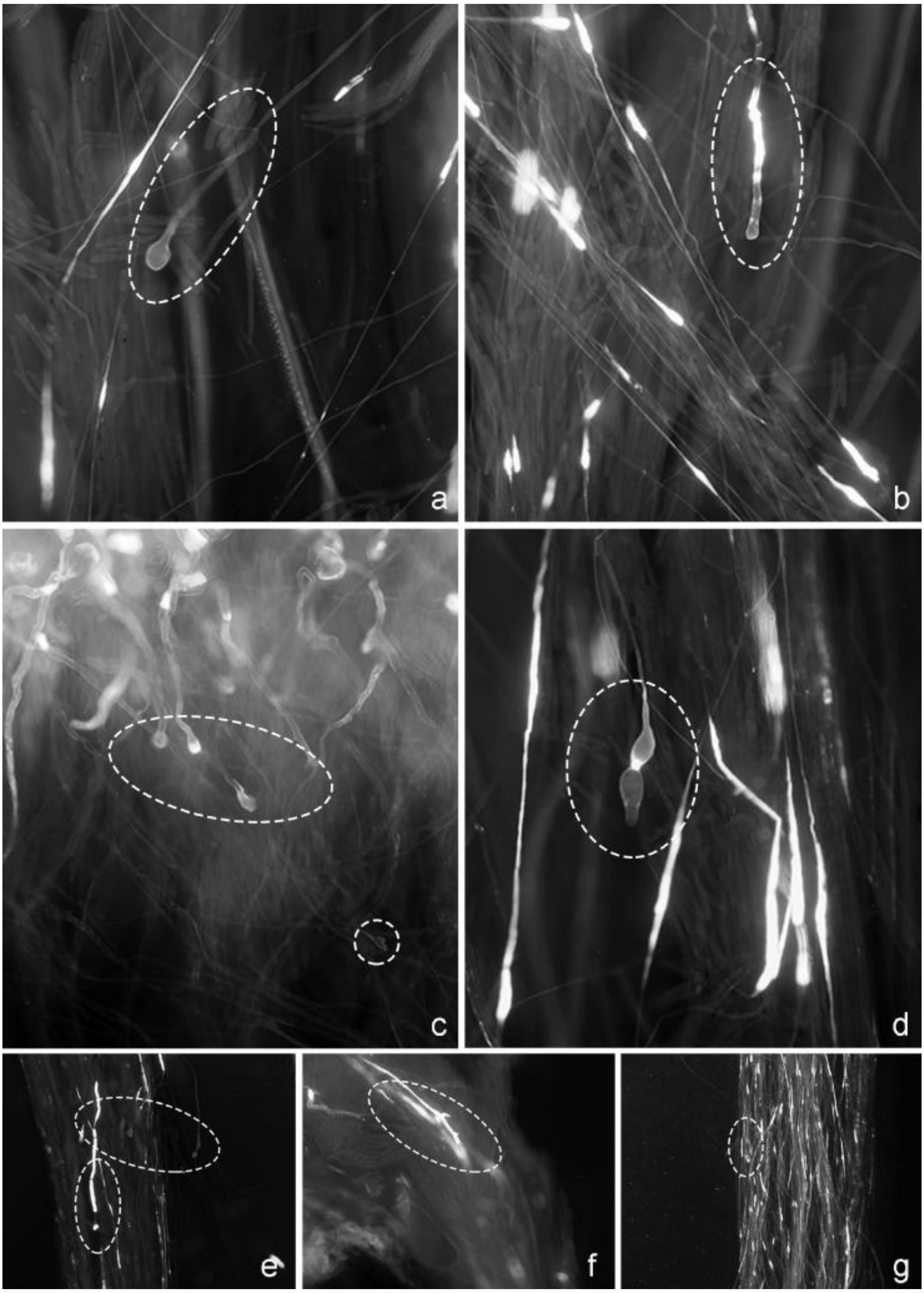
## RESULTS AND DISCUSSION

The occurrence of gametophytic incompatibility was accompanied by irregular growth of pollen tubes, with an abundant accumulation of callosis in it. In all pollination variants, the presence of pollen tubes with typical signs of incompatibility was found (Figure 1).

In the majority of cases, incompatible pollen tubes stopped their growth in the upper third of the style (Figure 1a, 1b). The largest number of incompatible pollen tubes was characterized by an extended tip, which was more or less fluorescence. Pollen tubes that were thickened all over their length were also observed and more fluoresced than other pollen tubes. In a small number, incompatible pollen tubes were observed in the region just below the stigma (Figure 1c) or in the second third of the style.

Only in 2010, the presence of incompatible pollen tubes was observed in the second third of the style, in the cross-pollination variant with the cultivar 'Hanita' (60% of the total number of incompatible pollen tubes was in the second third of the style) and with the cultivar 'Čačanska Najbolja' (17% of the total number of incompatible pollen tubes were in the second third of the style).

Tip of the incompatible pollen tube was most often round, but incompatible pollen tubes with an irregularly shaped tip were also observed (Figure 1d, 1e). Apart from the typical signs of incompatibility, pollen tubes that have had stronger or weaker branches were seen in smaller number as well (Figure 1f, 1g).




**Фиг. 1. Несъвместими поленови тръби: а-б) типичен удължен връх на поленова тръба; в) тяхното присъствие в близалцето; г-е) неправилен връх на поленовата тръба; f-g) разклоняване на несъвместима поленова тръба**
**Fig. 1. Incompatible pollen tubes: a–b) typical extended tip of pollen tube; c) their presence in the stigma; d–e) irregular tip of pollen tube; f–g) branching of incompatible pollen tube**

През трите опитни години, най-големият брой несъвместими поленови тръби средно са открити във варианта на самоопрашване (4,84%), докато най-малък брой е открит във вариантите на кръстосано опрашване с "Презента" и "Ханита" (1,10% и 1,25%) (Таблица 1).

През 2010 г. е установен най-голям брой несъвместими поленови тръби във вариантите със самоопрашване и кръстосано опрашване, а при варианта на свободно опрашване през 2008 г.

For all three years, the highest number of incompatible pollen tubes, on average, was found in the self-pollination variant (4.84%), while the smallest number was found in the cross-pollination variants with the cultivars 'Presenta' and 'Hanita' (1.10% and 1.25%) (Table 1).

Observed by the year of study, the largest number of incompatible pollen tubes in the self- and cross- pollination variants was found in 2010, while in the open pollination variant, in 2008.

**Таблица 1. Присъствие на несъвместими поленови тръби (%) в стълбчето на сливов сорт "Позна Плава", по варианти и по години**
**Table 1. Presence of incompatible pollen tubes (%) in the style of the plum cultivar Pozna Plava, in variants of pollination, by years**

| Вариант на опрашване<br>Pollination variant | Зона на стълбчето<br>Style region | Година<br>Year 2008 | Година<br>Year 2010 | Година<br>Year 2011 | Общо<br>Total |
|---|---|---|---|---|---|
| **'Pozna Plava'** | 1/3 | 2,65 | 6,75 | 5,11 | 4,84 |
| **'Čačanska Najbolja'** | 1/3 | 1,92 | 5,64 | 3,46 | 3,06 |
| | 2/3 | / | 1,15 | / | |
| **'Hanita'** | 1/3 | 1,82 | 1,29 | 0,10 | 1,25 |
| | 2/3 | / | 1,77 | / | |
| **'Presenta'** | 1/3 | – | 1,70 | 0,49 | 1,10 |
| **Свободно опрашване<br>Open pollination** | 1/3 | 4,56 | 3,42 | 4,33 | 4,10 |

Във варианта със самоопрашване, през годините на изследването, броят на несъвместимите поленови тръби варира от 2,65% до 5,11%. При вариантите с кръстосано опрашване, броят на несъвместими поленови тръби е в диапазона 1,92-6,79% при сорта "Чачанска найболя"; 0,10-3,06% с "Ханита" и 0,49-1,79% със сорт "Презента". При варианта със свободно опрашване, броят варира от 3,42 до 4,56%.

Генетичният контрол на стерилността се регулира от многоалелен *S*-локус, при който съвместимостта при кръстосване се определя от хаплоидния поленов геном и от диплоидния геном на плодника. Растежът на поленовата тръба спира ако *S*-алелът,

In a self-pollination variant by the years of study, the number of incompatible pollen tubes ranged from 2,65% to 5,11%. In cross-pollination variants, the number of incompatible pollen tubes was in the range 1,92–6,79% with the cultivar 'Čačanska Najbolja'; 0,10–3,06% with 'Hanita' and 0,49–1,79% with the cultivar 'Presenta'. In an open-pollination variant, the number ranged from 3,42 to 4,56%.

Genetic control of self-incompatibility is regulated by a multialellic *S*-locus, where the compatibility of crossing is determined by the haploid pollen genome and the diploid genome of the pistil. Stopping of the pollen tube growth occurs if the *S*-allele съдържащ се в поленовото зърно, е взаимен с един от двата *S*-алела на плодника. Два напълно различни *S*-локусни гена участват в идентифицирането и отхвърлянето на техния собствен полен: *S*-RNase (гликопротеин с рибонуклеат) като *S*-компонент на плодника и F-box gene, *SLF* (S-локус F-box) (kod *Prunus mume*) и *SFB* S-хаплотип-specific *F*-box gene) (при *Prunus dulcis*, *Punus avium* и *Prunus cerasus*), като *S*-компонент на полена, чиято функция в несъвместимата реакция все още не е установена (Hauck et al., 2006).

Поради факта, че гаметофитната несъвместимост пречи на самоопождането, водещо до намаляване на плодния завръз, опрашването със съвместим полен е изключително важно. Проявата на самостерилност при овощните култури изключва едносортово засаждане и изисква наличие на два или три съвместими сорта – опрашители (Dicenta et al., 2002). Изследването на самоопождането, както и ползите от някои опрашители, най-често се определят от плодния завръз или чрез изследване на растежа на поленовите тръби в стълбчето след опрашването. Идентифицирането на S-RNase *и SFB* гена дава възможност за характеризиране на *S*-хаплотипа в представителите на семейство *Rosaceae* чрез PCR анализ. Този метод е независим от времето и сезона на цъфтеж, тъй като за аналитичен материал се използва вегетативна тъкан (Kitasiba et al., 2007).

Използвайки флуоресцентния микроскопски метод на оцветяване с анилиново синьо, броят на несъвместимите поленови тръби варира от 1.10% при варианта на кръстосано опрашване със сорт "Презента" до 4.84% при самоопрашване. В повечето случаи несъвместимите поленови тръби спират растежа си в горната третина на стълбчето. През 2010 г. във варианта с кръстосано опрашване със

possessing a pollen grain is mutual with one of the two *S*-alleles of the pistil. Two completely different *S*-locus genes are involved in identifying and rejecting their own pollen: *S*-RNase (glycoprotein with ribonucleate) as an *S*-component of the pistil and *F*-box gene, *SLF* (*S*-lokus *F*-box) (kod *Prunus mume*) and *SFB* S-haplotype-specific *F*-box gene) (in *Prunus dulcis*, *Punus avium* and *Prunus cerasus*), as an *S*-component of the pollen, whose function in the incompatible reaction haven't been established yet (Hauck et al., 2006).

The fact that the gametophytic incompatibility system prevents self-fertilization, leading to reduced fruit set, pollination with compatible pollen is extremely important. In fruits, the occurrence of self-incompatibility excludes one varietal planting and requires the presence of two or three compatible pollinators (Dicenta et al., 2002). Examination of self-fertility, as well as the benefits of certain pollinators, have been most often defined by fruit set or by examination of pollen tubes growth in the style after pollination.

Identification of *S*-RNase and *SFB* gene enabled the characterization of *S*-haplotype in the representatives of *Rosaceae* family using PCR analysis. This method is independent of flowering time and season, because vegetative tissue is used as the analysis material (Kitasiba et al., 2007).

Using fluorescence microscopic method of aniline blue staining, the number of incompatible pollen tubes ranged from 1.10% in the variant of cross pollination with the cultivar 'Presenta', up to 4.84% in self-pollination.

In most cases incompatible pollen tubes stopped their growth in the upper third of the style. In 2010, in the cross pollination variant with the cultivars 'Hanita' and сортове "Ханита" и "Чачанска найболя" се наблюдават несъвместими поленови тръби във втората третина на стълбчето. Приблизително същия брой несъвместими поленови тръби е установен във варианта на самостоятелно и свободно опрашване през всичките три години на изследването, което вероятно се обуславя, наред с други условия, от наличието на собствен полен върху близалцето, във варианта със свободно опрашване. По-малкият брой несъвместими поленови тръби във варианта на кръстосано опрашване със сорт "Чачанска найболя" (3.06%) може да се обясни с това, че е родител на сорт "Позна Плава". Най-малкият брой (по-малко от 1,3%) несъвместими поленови тръби е определен във варианта на кръстосано опрашване със сортовете "Презента" и "Ханита".

Гаметофитната стерилност включва неправилно функциониране на поленовите тръби и голямо отлагане на калус в тях (Ünal et al., 2013). При нея, реакцията на отхвърляне на полена е най-често срещана в горната третина на стълбчето и е придружена от силно отлагане на калус по стените на поленовите тръби и утаяването му в горния край води до образуване на характерно разширение на върха на поленовата тръбичка.

Получените резултати съответстват на резултати от проучвания на други видове от род *Prunus*: кайсия (Milatović и Nikolić, 2007), синя слива (Milošević, 2013; Djorđević et al., 2014), при които наличието на несъвместими поленови тръби е свързано главно със зоната в горната третина на стълбчето. Чрез тестване на самоопрашването при 37 сорта кайсии, Milatović and Nikolić (2007) посочват наличието на несъвместими поленови тръби, които спират растежа в долните части на яйчника. Същите резултати за наличие на несъвместими поленови тръби в долните части на яйчника се

‘Čačanska Najbolja’, incompatible pollen tubes were observed in the second third of the style. Approximately the same number of incompatible pollen tubes was established in the variant of self- and open pollination in all three years of study, which is probably conditioned, among others, by the presence of their own pollen on the stigma in the open pollination variant.

A somewhat smaller number of incompatible pollen tubes in the variant of cross pollination with the cultivar ‘Čačanska Najbolja’ (3.06) can be explained by it being a parent of the ‘Pozna Plava’ cultivar. The lowest number (less than 1.3%) of incompatible pollen tubes was determined in the cross pollination variant with the cultivars ‘Presenta’ and ‘Hanita’.

Gametophytic incompatibility system involves irregular behavior of pollen tubes and a large callose deposition in them (Ünal et al., 2013). In this incompatibility system, reaction of pollen rejection is most common in the upper third of the style and is accompanied by a strong callose deposition in the pollen tubes walls and its sedimentation at the very top leading to the formation of a characteristic extension of the pollen tube tip.

The results obtained agree with the results of the study with larger number of species of the genus *Prunus*: apricot (Milatović and Nikolić, 2007), plum (Milošević, 2013; Đorđević et al., 2014) in which the occurrence of incompatible pollen tubes is mainly related to the region of the upper third of the style.

By testing self-fertility in 37 cultivars of apricot, Milatović and Nikolić (2007) state the presence of incompatible pollen tubes that stop growth in lower parts of the ovary. The same results of incompatible pollen tubes occurrence in lower parts of the ovary were observed in eight apricot наблюдават в осем сорта кайсии, анализирани при вариантите със самоопрашване и кръстосано опрашване (Milatović et al., 2010).

Анализирайки растежа на поленовата тръба в стълбчето на сорт „Чачанска лепотица" в три варианта на опрашване (свободно опрашване, кръстосано и самоопрашване), Kuzmanović (2008) открива наличие на несъвместими поленови тръби в горната третина от стълбчето от 12.1 до 17%. Изследвайки растежа на поленовата тръба в стълбчето на три сорта сливи, Milosevic (2013) установява наличие на несъвместими поленови тръби в 3,70-23,81% от плодниците.

Поради трите компонента на генома е трудно да се намери алелна формула или структура за два сорта домашни сливи, тъй като всеки геном има свой собствен *S*-ген с множество алели. Поради тази причина всеки сливов сорт с поленова кълняемост може да бъде опрашител на друг сливов сорт, но в различна степен (Selesses and Bonnet, 1994). Поради полиплоидната и сложна структура на генома, домашната слива е последният изследван вид от подсемейство *Prunoideae* (Tao and Iezzoni, 2010). Поради тази причина съвместимите групи при сините сливи не са определени и няма надеждна информация за генетичното разнообразие на стерилни алели (Kota and Lacis, 2013).

cultivars analysed in the variants of self- and cross pollination (Milatović et al., 2010).

Analyzing the pollen tube growth in the style of the plum cultivar 'Čačanska Lepotica' in three variants of pollination (open pollination, cross- and self-pollination), Kuzmanović (2008), finds the presence of incompatible pollen tubes in the upper third of the style from 12.1 to 17%. By examining the pollen tube growth in the style of three plum cultivars, Milosevic (2013) found the presence of incompatible pollen tubes in 3.70-23.81% of pistils.

Because of genome's three-components, it is difficult to find the same allelic formula or structure for two domestic plums, since each genome has its own *S*-gene with multiple alleles. For this reason, each plum cultivar with pollen fertility can be a pollenizer to another plum cultivar but in varying degrees (Selesses and Bonnet, 1994). Due to the polyploidy and complex structure of the genome, domestic plum is the last studied species from the subfamily *Prunoid*eae (Tao and Iezzoni, 2010). For this reason, compatible groups in plums have not been defined yet and there are no reliable information on the genetic diversity of self-incompatible alleles (Kota and Lācis, 2013).

## ИЗВОДИ

Тъй като това са несъвместими поленови тръби, чийто брой спрямо общия брой поленови тръби в горната третина от стълбчето е по-малък от 5%, влиянието им е незначително, дори и върху броя на поленовите тръби, които проникват в яйчника, следователно те могат да имат значение само от гледна точка на описанието на различни морфологични форми на несъвместимост.

## CONCLUSIONS

Since these are incompatible pollen tubes whose counts in relation to the total number of pollen tubes in the upper third of the style was less than 5%, their influence is insignificant, even on the number of pollen tubes that penetrate into the ovary, therefore they can only be of significance here in terms of description of (the incidence of) different morphological forms of incompatible pollen tubes.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Настоящето изследване е проведено по Проект TR–31064: Развитие и запазване на генетичния потенциал на овощни видове от умерени климатични зони, подкрепен от Министерството на образованието, науката и технологичното развитие на Република Сърбия.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was conducted under Research Project TR–31064: Development and preservation of genetic potential of temperate zone fruits, supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Botu, M., C. Şarpe and S. Cosmulescu**, 2002. The genetic control of pollen fertility, pollenizing and fruit set for the *Prunus domestica* L. plum cultivars. *Acta Horticulturae*, 577, 139-145.
2. **Crawford, B.C.W. and M.F. Yanofsky**, 2008. The formation and function of the female reproductive tract in flowering plants. *Current Biology*, 18(20), R972-R978.
3. **Dicenta, F., E. Ortega, J.A. Canovas and J. Egea**, 2002. Self-pollination vs. Cross-pollination in almond: pollen tube growth, fruit set and fruit characteristics. *Plant Breeding*, 121, 163-167.
4. **Đorđević, M., R. Cerović, S. Radičević and D. Nikolić**, 2014. Incompatible pollen tubes in the plum style and their impact on fertilization success. *Genetika*, 46(2), 411-418.
5. **Franklin-Tong, N.V. and F.C.H. Franklin**, 2003. Gametophytic self-incompatibility inhibits pollen tube growth using different mechanisms. *Trends Plant Sci,* 8(12), 598-605.
6. **Halász, J., A. Pedryc, S. Ercisli, K.U. Yilmaz and A. Hegedus**, 2010. *S*-genotyping supports the genetic relationships between Turkish and Hungarian apricot germplasm. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 135(5), 410-417.
7. **Hauck, N.R., H. Yamane, R. Tao and A.F. Iezzoni**, 2006. Accumulation of nonfunctional *S*-haplotypes results in the breakdown of gametophytic self-incompatibility in tetraploid *Prunus*. *Genetics*, 172(2), 1191-1198.
8. **Herrero, M.**, 1992. From pollination to fertilization in fruit trees. *Plant Growth Regulation*, 11(1), 27-32.
9. **Higashiyama, T. and Y. Hamamura**, 2008. Gametophytic pollen tube guidance. *Sexual Plant Reproduction*, 21(1), 17-26.
10. **Igic, B. and J.R. Kohn**, 2001. Evolutionary relationships among self-incompatibility RNases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(23), 13167-13171.
11. **Kho, Y.O. and J. Baër**, 1971: Fluorescence microscopy in botanical research. *Zeiss information*, 76, 54-57.
12. **Kitashiba, H., S.L. Zhang, J. Wu, K. Shirasawa and T. Nishio**, 2007. *S* genotiping and *S* screening utilizing *SFB* gene polymorphism in Japanese plum and sweet cherry by dot-blot analysis. *Molecular breeding*, 21(3), 339-349.
13. **Kota, D.I. and G. Lācis**, 2013. Evaluation of self-incompatibility locus diversity of domestic plum (*Prunus domestica* L.) using DNA-based *S*-genotyping. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences*, Section B, 67(2), 109-115.
14. **Kuzmanović, M.**, 2008. Biology of fertilization of plum cv Čačanska Lepotica (*Prunus domestica* L.). MSc, University of Belgrade, Faculty of Agriculture, Belgrade, Serbia.

15. **Milatović, D. and D. Nikolić**, 2007. Analysis of self-(in)compatibility in apricot cultivars using fluorescence microscopy. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 82(2), 170-174.
16. **Milatović, D., D. Nikolić, V. Rakonjac and M. Fotirić-Akšić**, 2010. Cross-(in)compatibility in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 85(5), 394-398.
17. **Milošević, N.T.**, 2013. Degree of fertilization and biological traits of new plum cultivars (*Prunus domestica* L.). Dissertation, University of Belgrade, Faculty of Agriculture, Belgrade, Serbia.
18. **Nasrallah, J.B., T. Nishio and M.E. Nasrallah**, 1991. The self incompatibility genes of *Brassica*: expression and use in genetic ablation of floral tissues. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42, 393-422.
19. **Palanivelu, R. and T. Tsukamoto**, 2011. Pathfinding in angiosperm reproduction: pollen tube guidance by pistils ensures successful double fertilization. *WIREs Developmental Biology*, 1, 96-113.
20. **Preil, W.**, 1970. Observing the growth of pollen tubes in pistil and ovarian tissue by means of fluorescence microscopy. *Zeiss Information*, 75, 24-25.
21. **Radičević, S.**, 2013. Fertilization biology and pomological properties of newly introduced sweet cherry (*Prunus avium* L) cultivars. Dissertation, University of Belgrade, Faculty of Agriculture, Belgrade, Serbia.
22. **Salesses, G. and A. Bonnet**, 1994. Citological studies of tetra-, hepta-, and octoploid interspecific hybrids between *P. cerasifera*, *P. spinosa* and *P. domestica*. *Acta Horticulturae*, 359, 26-32.
23. **Tao, R. and A. Iezzony**, 2010. The *S*-RNase-based gametophytic self-incompatibility system in *Prunus* exhibits distinct genetic and molecular features. *Scientia Horticulturae*, 124(4), 423-433.
24. **Ünal, M., F. Vardar and Ö. Ayturk**, 2013. Current Progress in Biological Research, Chapter 14: Callose in plant sexual reproduction, doi: 10.5772/53001.