*Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2020, 23 (3), 180-194* ISSN 1311-0489 (Print)
*Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan* ISSN 2367-8364 (Online)

# Скорост на растеж на поленовите тръбички и формиране на завръз при сливови генотипи (*Prunus domestica* L.) при различен начин на опрашване

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

*[1]Изследователски институт по овощарство, "Краля Петра I" 9, 32000 Чачак, Република Сърбия*
*[2]Белградски университет, Иновационен център, Технологичен и металургичен факултет, "Карнегийева" 4, 11120 Белград, Република Сърбия*

# Pollen tubes growth Rate and Initial Fruit Set in Some Plum (*Prunus domestica* L.) Genotypes under Different Pollination Modes

Ivana Glišić[1]*, Radosav Cerović[2], Milena Đorđević[1], Sanja Radičević[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*
**E-mail: iglisic@institut-cacak.org*

*Original scientific paper*

## РЕЗЮМЕ

Скоростта на растеж на поленовите тръбички през три етапа (72 ч., 144 ч. и 240 ч. след опрашването), както и първоначалният плоден завръз от шест обещаващи сливови генотипа, разработени в Изследователски институт по овощарство, Чачак (хибридите 38/62/70, IV/63/81, 32/21/87, 34/41/87, 22/17/87, сорт „Nada“) са изследвани при самоопрашване, кръстосано опрашване („Čačanska Lepotica" като опрашител) и варианти на свободно опрашване за период от две години (2010/2011). Динамиката на растеж на поленовите тръбички е различна в зависимост от генотипа, варианта на опрашване и годината. 72 часа след опрашването,

## SUMMARY

Pollen tubes growth rate in three fixation terms (72 h, 144 h and 240 h after pollination), as well as the initial fruit set of six promising plum genotypes developed at Fruit Research Institute, Čačak (the hybrids 38/62/70, IV/63/81, 32/21/87, 34/41/87, 22/17/87, and the cultivar ‘Nada’) were investigated under self-, cross- (‘Čačanska Lepotica’ as pollenizer) and open pollination variants over the two years (2010/2011).

Dynamics of pollen tubes growth varied depending on genotype, pollination variant and year. 72 h after pollination, location of the longest pollen tube was between the medium part of the style and

местоположението на най-дългата поленова тръбичка е между средната част на стълбчето и нуцелуса. Поленовите тръбички се наблюдават предимно в яйчника, 144 ч. след опрашване, докато 240 ч. след опрашване само при хибрид 32/21/87, във вариант на самоопрашване не се наблюдава проникване на поленова тръбичка в нуцелуса. Най-голямото количество опрашени плодници, с проникване в нуцелуса 240 ч. след опрашване, е получено при вариант на кръстосано опрашване във всички изследвани генотипи и през двете години, с изключение на хибриди IV/63/81 и 22/17/87 през 2011 г., когато този показател достига най-висока стойност във варианта на самоопрашване и свободно опрашване. Средната стойност на първоначалния плоден завръз варира от 1,08% (хибрид 32/21/87, самоопрашване) до 54,06% („Nada“, кръстосано опрашване). Най-висок процент на първоначален плоден завръз, при поголямата част от изследваните генотипи е регистриран във вариант на кръстосано опрашване, с изключение на хибрид 34/41/87, където най-добрият резултат е получен във варианта на самоопрашване.

**Ключови думи**: сливов генотип, самоопрашване, свободно и кръстосано опрашване, динамика на цветни тръбички, плоден завръз

the nucellus.

Pollen tubes were predominantly observed in the ovary 144 h after pollination, while 240 h after pollination, penetration of pollen tube into the nucellus was not observed only in hybrid 32/21/87, in self-pollination variant.

The highest amount of pistils with penetration into the nucellus 240 h after pollination was obtained in cross-pollination variant in all investigated genotypes and in both years, except in hybrids IV/63/81 and 22/17/87 in 2011 where this parameter achieved the highest value in self-pollination and open-pollination variants, respectively.

The average value of initial fruit set varied from 1.08% (32/21/87, self-pollination) to 54.06% ('Nada', cross-pollination). The highest percentage of the initial fruit set for the majority of investigated genotypes recorded in the cross-pollination variant, except in hybrid 34/41/87, where the best result was obtained in self-pollination variant.

**Key words**: plum genotype, self-, open- and cross-pollination, pollen tubes dynamics, fruit set

## УВОД

Оптималният плоден завръз и добивът от генотипи на европейска слива (*Prunus domestica* L.) се контролира от голям брой фактори, които влияят върху процесите на опрашване и оплождане. Първата стъпка в опрашването е пренасяне на поленови зърна от прашниците към близалцето и тяхното прилепване, последвано от хидратацията и покълването им. Фактори, които оказват значително влияние върху успеха на тази фаза са съвместимостта и припокриването при цъфтежа на сортовете (Koskela et al., 2010), достатъчно количество и качество на пра-

## INTRODUCTION

Optimal fruit set and yield of genotypes of European plum (*Prunus domestica* L.) is under strong control of a large number of factors that affect pollination and fertilization processes.

The first step of pollination is transfer of pollen grains from the anthers to the stigma and their adhesion followed by their hydration and germination.

Factors that significantly influence the success of this phase are flowering overlap (Koskela et al., 2010), pollen of adequate quantity and quality (Surányi,

шеца (Surányi, 2006), осигуряване на преноса му и възприемчивост на близалцето (Nikolić et al., 2012).

В следващата стъпка поленовите тръбички порастват през стълбчето. Тяхното удължаване може да бъде прекъснато в случаите, когато идентични *S*-алели присъстват в поленовите зърна и в плодниците (Nikolić и Milatović, 2010). Скоростта на растеж на поленовите тръбички е под влиянието на редица фактори като мъжки (Kuzmanović, 2008) и женски (Neumüler, 2011) генотипи, режим на опрашване (Stott et al., 1973), колебания на температурата през периода на цъфтеж (Hedhly et al., 2005). Също така, съществуват генотип-зависими реакции на мъжки и женски сортове при различни температури (Petropoulou and Alston, 1998, Radičević et al., 2016).

Последните фази на растеж на поленовите тръбички настъпват в тъканта на яйчника. Когато поленовите тръбички навлизат в тъканта на яйчника те се разрастват през обтураторната област и микропилират в нуцелуса, а след това през един от синергидите в ембрионалния сак и проникват в яйцето. Сперматозоидите се доставят в ембрионалната торбичка на яйчника чрез поленовата тръбичка. Прорастването на поленовата тръбичка през яйчника се насочва от няколкото структури на женския гаметофит (McCormick, 2004; Yadegari and Drewsb, 2004; Palanivlu and Tsukamoto, 2011). По време на процеса на двойно оплождане, една сперматозоидна клетка опложда яйцеклетката и се образува зигота, докато другите сперматозоиди оплождат две полярни ядра на централната клетка и образуват тетраплоидния ендосперм. Наличието на семена е решаващо за развитието на плода, така че плодният завръз е в пряка връзка с оплождането (Cerović и Mićić, 1999). Зрелите яйцеклетки имат ограничен живот, затова оплождането трябва да се извършва през цялото

2006), assurance of its transfer and stigma receptivity (Nikolić et al., 2012).

In the next step pollen tubes grow through the style. Their elongation can be interrupted in cases when the same *S*-alleles is present in the pollen grains and in the pistils (Nikolić and Milatović, 2010).

Pollen tubes growth rate is under the influence of a number of factors such as male (Kuzmanović, 2008) and female (Neumüler, 2011) genotypes, pollination mode (Stott et al., 1973), temperature fluctuation during the blooming period (Hedhly et al., 2005). Also, genotype-dependent reactions of male and female cultivars on different temperatures exist (Petropoulou and Alston, 1998, Radičević et al., 2016).

The final phases of pollen tubes growth occur in the tissue of the ovary. When pollen tubes enter the ovarian tissue, they growth through the obturator area and micropyle into the nucellus, and then through one of the synergids in the embryo sac and penetrate the ovule.

Sperm cells are delivered to the embryo sac of the ovary through the pollen tube. The growth of pollen tubes through the ovary is directed by the several structures of the female gametophyte (McCormick, 2004; Yadegari and Drewsb, 2004; Palanivlu and Tsukamoto, 2011).

During the double fertilisation process, one sperm cell fertilizes the egg cell and zygote is formed, while the other sperm cells fertilize two polar nuclei of the central cell and form the tetraploid endosperm.

The presence of seeds is decisive for fruit development so that the fruit set is in direct correlation with fertilization (Cerović and Mićić, 1999).

Mature ovules have a limited lifetime, so fertilization must occur throughout this

това време (Cerović and Mićić, 1996), където връзката на тези параметри е определена като ефективен период на опрашване (Sanzol and Herrero, 2001). Некачественият плоден завръз може да бъде резултат от съкратения период на ефективно опрашване, т.е. времевият интервал между продължителността на живот на яйцеклетката и времето, необходимо за проникване на поленовата тръба в яйцеклетката (Stöser and Anvari, 1982). Краткият период на опрашване може да бъде резултат от бавен растеж на поленовите тръбички и/или къса продължителност на живот на яйцеклетките (Yerko and Miller-Azarenko, 1992). Според условията на околната среда температурата на въздуха по време на цъфтеж е най-важният фактор, който влияе както върху скоростта на растеж на поленовата тръбичка, така и върху продължителността на живот на яйцеклетката (Beltrán et al., 2019). Увеличаването на температурата на въздуха ускорява растежа на поленовите тръбички (Hedhly et al., 2004), но съкращава живота на яйцеклетките (Cerović et al., 2000).

За да се осигури рентабилност в сливопроизводството, преди въвеждането на нови сортове е важно да се познават различни аспекти на тяхната репродуктивна биология. Целта на настоящото проучване е да се изследва динамиката на растеж на поленовите тръбички и първоначален завръз, определени за шест обещаващи генотипа на синя слива, разработени в Изследователски институт по овощарство, Чачак, т.е. пет хибрида и нов сорт, при различни начини на опрашване.

time (Cerović and Mićić, 1996), where the relationship of these parameters is defined aseffective pollination period (Sanzol and Herrero, 2001).

Poor fruit set may result from the shortened effective pollination period, i.e. the time interval between ovule longevity and time required for the pollen tube to penetrate the ovule (Stöser and Anvari, 1982).

A short pollination period can result from slow pollen tubes growth rate and/or short ovules longevity (Yerko and Miller-Azarenko, 1992).

Among the environmental conditions, air temperature during flowering is the most important factor having impact on both pollen tube growth rate and ovule longevity (Beltrán et al., 2019).

An increase in air temperature accelerates the growth of pollen tubes (Hedhly et al., 2004), but shortens the ovules longevity (Cerović et al., 2000).

In order to ensure profitability of plum growing before introducing new cultivars into production, knowledge of different aspects of their reproductive biology is essential. The aim of this study was to investigate pollen tubes growth rate and initial fruit set in six promising plum genotypes developed at Fruit Research Institute, Čačak, i.e. five hybrids and newly released cultivar, under different pollination modes.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Растителен материал

Изследването включва пет обещаващи хибрида [38/62/70 (’Hall’ × ’California Blue’), IV / 63/81 (‘Large Sugar Prune’ × ’Scoldus’), 32/21/87 (’Stanley’ × ’Scoldus’), 34/41/87 (’Valjevka’ × ‘Čačanska Lepotica’), 22/17/87 (’Čačanska Najbolja’ ×

## MATERIAL AND METHODS

Plant material

The research included five promising hybrids [38/62/70 (‘Hall’ × ‘California Blue’), IV/63/81 (‘Large Sugar Prune’ × ‘Scoldus’), 32/21/87 (‘Stanley’ × ‘Scoldus’), 34/41/87 (‘Valjevka’ × ‘Čačanska Lepotica’), 22/17/87 (‘Čačanska Najbolja’ ×

’Zelta Boutilcovidna’)] и нов сорт “Nada“ (’Stanley ’×’ Scoldus’), разработен в Изследователски институт по овощарство, Чачак в рамките на селекционната програма за Европейска слива (*P. domestica*). Опитът е извършен в експериментална овощна градина на съоръжение Любич, близо до Чачак, което е създадено през пролетта на 2003 г. със стандартен едногодишен посадъчен материал, присадени върху джанка (*Prunus cerasifera* Ehrh). Изследваните генотипи са засадени в три повторения с 15 дървета, при схема 6,0 m × 5,0 m и формирани с пирамидална корона.

Процедура на опрашване и вземане на проби от плодниците

През двугодишния период (2010/2011 г.) клони с приблизително 500 цвята (в етапа на късен бял бутон) на всеки генотип бяха избрани на случаен принцип от всички дървета,, са кастрирани и изолирани с хартиени торби. В същото време, за да се подготви цветен прашец за самоопрашване и кръстосано опрашване, са взети полеви проби от клони с цветни пъпки в етапа на късен бял бутон от всеки изследван генотип и сорт „‘Čačanska Lepotica’.

В лабораторията прашниците от всеки генотип се събират и съхраняват в хартиени кутии при стайна температура до тяхното отваряне и освобождаване на цветен прашец. В началото на етап на пълен цъфтеж, кастрираните и изолирани цветове от всеки генотип са самоопрашени и кръстосано опрашени ръчно.

За да се предотврати неконтролирано опрашване, опрашените цветове се изолират отново със същите хартиени торбички в продължение на 15 дни. Тридесет плодници от всеки изследван генотип и в двата варианта на опрашване са взети на 72 ч., 144 ч. и 240 ч. след опрашване. Взетите проби веднага са натопени в разтвор на FPA (70% етанол, пропионова киселина и

‘Zelta Boutilcovidna’)] and a new cultivar ‘Nada’ (‘Stanley’ × ‘Scoldus’), developed at Fruit Research Institute, Čačak within the European plum (*P. domestica*) breeding programme. The trial was performed in an experimental orchard on the Ljubić facility, near Čačak, which was established in spring 2003 with standard one-year old plantings of aforementioned genotypes grafted on myrobalan seedlings (*Prunus cerasifera* Ehrh). Investigated genotypes were planted in three replications with 15 trees, with spacing of 6.0 m × 5.0 m and pyramidal crown training system.

Pollination procedure and pistils sampling

During the two-year period (2010/2011) the branches with approximately 500 flowers at the late balloon stage of each genotype were randomly selected from all trees, emasculated and isolated with paper bags. At the same time, in order to prepare pollen for self- and cross-pollination, branches with flower buds at the late balloon stage of each studied genotype and cultivar ‘Čačanska Lepotica’ were sampled in the field.

In the laboratory, anthers of each genotype were collected and stored in paper boxes at room temperature until their opening and releasing of pollen grains. At the beginning of full flowering emasculated and isolated flowers of each genotype were self- and cross-pollinated by hand.

In order to prevent uncontrolled pollination subsequently pollinated flowers were isolated again with the same paper bags during 15 days. Thirty pistils of each investigated genotype in both pollination variants were sampled 72 h, 144 h and 240 h after pollination.

Sampled pistils were immediately soaked in FPA solution (70% ethanol, propionic

формалдехид, при обем от 90: 5: 5 процента) и са съхранени при 4° С. По същия начин и при същите условия са взети проби от всеки изследван генотип на слива от свободно опрашване.

Израстване на поленови тръбички *in vivo*

За да се изследва растежът на поленовите тръбички *in vivo* в стълбчето и в яйчника, е използван метод за оцветяване с анилиново синьо (Kho and Baër, 1971). Направено е отделяне на стълбчето от яйчника под стерео микроскоп. За по-добро наблюдение, стълбчето се отваря по протежение на шева и се смачква, докато яйчникът се отделя по шева и се реже надлъжно и тангенциално. Наблюдението на стълбчетата и яйчниците се извършва под UV светлини на микроскоп Olympus BX61 (Токио, Япония). Скоростта на растеж на поленовите тръбички се определя в три периода (72 ч., 144 ч. и 240 ч. след опрашването) като процент на плодниците с най-дълга поленова тръбичка, проникваща в определени части от стълбчето или яйчника.

Първоначален плоден завръз

В началото на етапа на зреене е отчетен формираният завръз. Във вариантите на самоопрашване и кръстосано опрашване се изчислява като брой на плодове, получени от опрашените цветове, останали след последното фиксиране. За определяне на първоначалния плоден завръз във вариант на свободно опрашване са избрани клони с приблизително 300 цвята в период на пълен цъфтеж. Първоначалният плоден завръз представлява броя на получените плодове спрямо броя на подбраните цветове.

Статистически анализ

Данните свързани с първоначалния плоден завръз, са анализирани чрез модела на Фишер за дисперсионен анализ (ANOVA), с двуфакторен

acid and formaldehyde, 90:5:5 percentages by volume) and stored at 4°C. In the same way and in the same terms, samples of each investigated plum genotypes were taken from the open-pollination.

Pollen tubes growth *in vivo*

To investigate pollen tubes growth *in vivo* in the style and in the ovary, aniline blue staining method was used (Kho and Baër, 1971).

The separation of the style from the ovary under a stereo microscope was done. For better observation, the style was opened along the suture and squashed, while the ovary was separated along the suture and was cut longitudinally-tangentially.

Observation of styles and ovaries was done under UV lights on Olympus BX61 microscope (Tokio, Japan). The pollen tubes growth rate was determined in three terms (72 h, 144 h and 240 h after pollination) as the percentage of pistils with the longest pollen tube penetrating to certain parts of the style or ovary.

Initial fruit set

Determination of initial fruit set at the beginning of the maturation stage was done. Initial fruit set in variants of self- and cross-pollination was calculated as the number of fruits obtained from the pollinated flowers remaining after the last fixation.

To determine the initial fruit set in open pollination variant branches with approximately 300 flowers were selected at the time of full flowering. Initial fruit set represented the number of obtained fruits, in relation to the number of selected flowers.

Statistical analysis

The data relating to initial fruit set was analysed using Fisher's model of analysis of variance (ANOVA), with a two-factor design, using the *F* test with the

модел, използвайки тест *F* с праг на значимост, определен при P ≤ 0,05. В случаите, когато *F*-тестът е значим, разликите между аритметичните стойности се пресмятат, като се използва тестът за най-малка значима разлика (LSD) с праг на значимост, определен при P ≤ 0,05. Статистическите анализи се извършват с помощта на статистически софтуерен пакет SPSS, версия 8.0 за Windows (SPSS Inc., Чикаго, Илинойс).

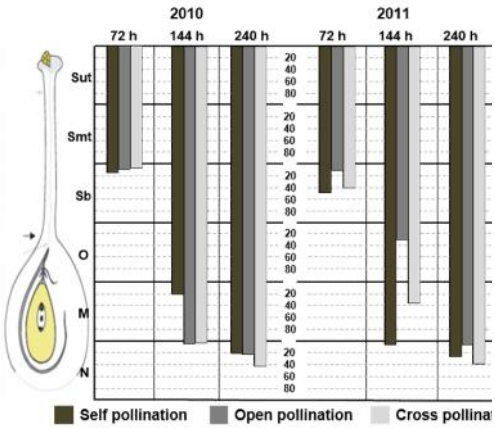
significance threshold set at P ≤ 0.05. In cases where the *F*-test was significant, differences between arithmetic means were evaluated using the least significance difference (LSD) test with the significance threshold set at P ≤ 0.05. Statistical analyses were performed using SPSS statistical software package, Version 8.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL).

## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Получените резултати показват, че скоростта на растеж на поленовите тръбички се променя в зависимост от генотипа, метода на опрашване и годината (Фигури 1 до 6).

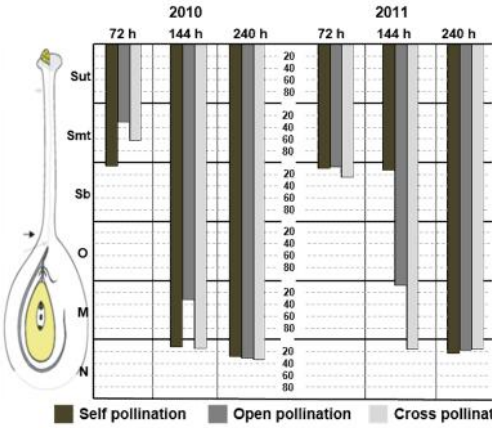
## RESULTS AND DISCUSSION

The obtained results showed that the pollen tubes growth rate varied depending on genotype, pollination mode and year (Figures 1 to 6).




**Фиг. 1. Сила на растеж на поленови тръбички в плодници на хибрид 38/62/70**

**Fig. 1. Pollen tubes growth rate in the pistils of hybrid 38/62/70**




**Фиг. 2. Сила на растеж на поленови тръбички в плодници на хибрид IV/63/81**

**Fig. 2. Pollen tubes growth rate in the pistils of hybrid IV/63/81**

Sut – горна третина на стълбчето; Smt – средна третина на стълбчето; Sb – основа на стълбчето; O - обтураторна зона; M - микропил, N – нуцелус на яйчника.
Sut - upper third of the style; Smt - medium third of the style; Sb - base of the style; O - obturator zone; M - micropyle, N - nucellus of the ovule.

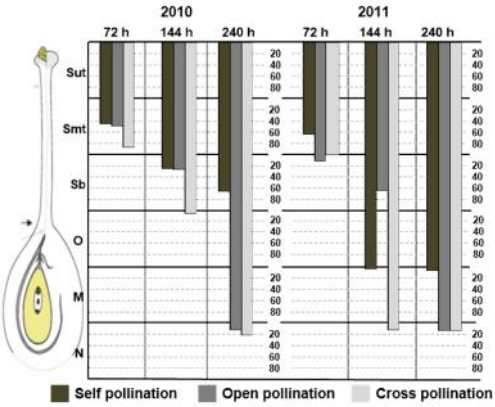
Поленовите тръбички са наблюдавани в средната част или в основата на стълбчето за 72 ч. след опрашване: при хибриди 38/62/70 (Фигура 1), IV/63/81 (Фигура 2) и 32/21/87 (Фигура 3) при всички варианти на опрашване и през двете години; в сорт „Nada“ при

Pollen tubes were observed in the medium part or in the base of the style 72 h after pollination: in hybrids 38/62/70 (Figure 1), IV/63/81 (Figure 2) and 32/21/87 (Figure 3) in all variant of pollination and in both years; in cultivar ‘Nada’ in self-pollination and cross-

варианти на самоопрашване и кръстосано опрашване и през двете години (Фигура 4); в хибрид 34/41/87 във всички варианти на опрашване през 2010 г. и във вариант на самоопрашване през 2011 г. (Фигура 5), а при хибрид 22/17/87 във вариант на самоопрашване и кръстосано опрашване през 2010 г. (Фигура 6). В същия период, най-дългите поленови тръбички при всички останали варианти са разположени в яйчника, предимно в обтураторната зона. Появата на най-дългите поленови тръбички в микропила има по-малък размер, докато проникването на поленовата тръбичка в нуклеуса се наблюдава само при хибрид 34/41/87 във вариант на кръстосано опрашване през 2011 г.

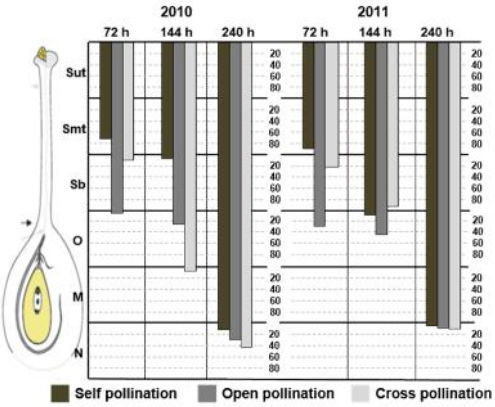
pollination variants in both years (Figure 4); in hybrid 34/41/87 in all variants of pollination in 2010 and in variant of self-pollination in 2011 (Figure 5), and in hybrid 22/17/87 in variant of self-pollination and cross-pollination in 2010 (Figure 6).

In the same term, the longest pollen tubes in all other treatments were located in the ovary, predominantly in the obturator zone. The occurrence of the longest pollen tubes in micropyle had lower rate, while penetration of pollen tube into the nucellus was observed only in hybrid 34/41/87 in variant of cross-pollination in 2011.




**Фиг. 3. Сила на растеж на поленови тръбички в плодници на хибрид 32/21/87**

**Fig. 3. Pollen tubes growth rate in the pistils of hybrid 32/21/87.**




**Фиг. 4. Сила на растеж на поленови тръбички в плодници на сорт 'Nada'**

**Fig. 4. Pollen tubes growth rate in the pistils of cultivar 'Nada'.**

Sut – горна третина на стълбчето; Smt – средна третина на стълбчето; Sb – основа на стълбчето; O – обтураторна зона; M - микропил, N – нуцелус на яйчника

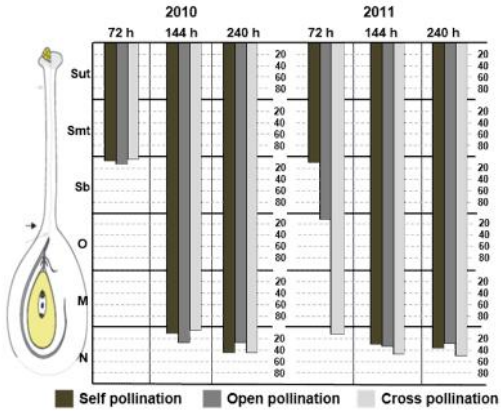
Sut - upper third of the style; Smt - medium third of the style; Sb - base of the style; O - obturator zone; M - micropyle, N - nucellus of the ovule.

144 часа след опрашването са открити най-дългите поленови тръбички в яйчника на изследваните генотипи, във всички варианти на опрашване и през двете години на изследване, с изключение на хибрид IV/63/81 във вариант на самоопрашване през 2011 г. (Фигура 2), хибрид 32/21/87 във ва-

144 h after pollination the longest pollen tubes were found in the ovary of the investigated genotypes, in all variants of pollination and in both years of investigation, with the exceptions of hybrid IV/63/81 in variant of self-pollination in 2011 (Figure 2), hybrid 32/21/87 in variant of self-pollination in 2010 and in variant of

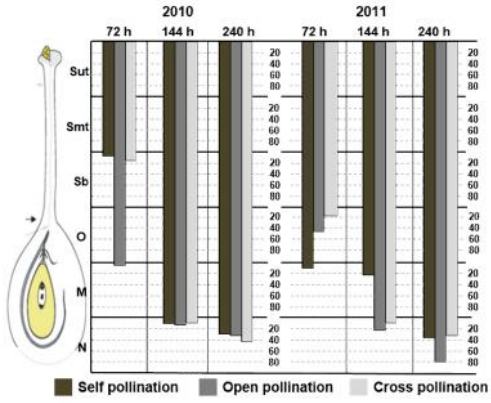
риант на самоопрашване през 2010 г. и във вариант на отворено опрашване през двете години (Фигура 3), както и за сорт „Nada“ във вариант на самоопрашване през 2010 г. и във вариант на кръстосано опрашване през 2011 г. (Фигура 4).

open-pollination in both years (Figure 3), as well as in cultivar ‘Nada’ in variant of self-pollination in 2010 and in variant of cross-pollination in 2011 (Figure 4).




**Фиг. 5. Сила на растеж на поленови тръбички в плодници на хибрид 34/41/87**

**Fig. 5. Pollen tubes growth rate in the pistils of hybrid 34/41/87**




**Фиг. 6. Сила на растеж на поленови тръбички в плодници на хибрид 22/17/87**

**Fig. 6. Pollen tubes growth rate in the pistils of hybrid 22/17/87**

Sut – горна третина на стълбчето; Smt – средна третина на стълбчето; Sb – основа на стълбчето; O - обтураторна зона; M - микропил, N – нуцелус на яйчника.

Sut - upper third of the style; Smt - medium third of the style; Sb - base of the style; O - obturator zone; M - micropyle, N - nucellus of the ovule.

240 ч. след опрашване, проникване на поленовата тръбичка в нуклеуса не е наблюдавано само при хибрид 32/21/87 във вариант на самоопрашване и през двете години (фигура 3).

Покълването на цветния прашец и първоначалният растеж на плодната тръбичка зависят от запасите в прашеца (Stephanson et al., 2003), докато влиянието на женския генотип се отразява във физическата форма и хранителните елементи (Bayer and Stösser, 2002; Hedhly et al., 2005). Keulemans (1984) посочва, че някои сортове сливи, използвани за опрашители са „бавно растящи“. Същият автор отбелязва, че повишаването на температурата на въздуха ускорява растежа на поленовите тръбички, но също така и че всички сортове не реагират по един и същи начин. Резултатите от настоящото про-

240 h after pollination penetration of pollen tube into the nucellus was not observed only in hybrid 32/21/87 under self-pollination mode in both years (Figure 3).

The pollen germination and initial pollen tube growth depend on reserves stored in the pollen (Stephanson et al., 2003), while the influence of female genotype is reflected in physical and nutritional role (Bayer and Stösser, 2002; Hedhly et al., 2005).

Keulemans (1984) pointed out that some plum cultivars as pollenizers behave as ‘slow growers’. The same author noted that an increase in air temperature accelerated pollen tubes growth, but also that all cultivars did not react in the same way. Results of the present study relating to obtained differences in pollen tubes

учване, свързани с получените разлики в скоростта на растеж на поленовите тръбички между изследваните генотипове, начините на опрашване и годините, могат да бъдат обяснени от резултатите на гореспоменатите автори. Освен това въздействието на едни и същи фактори е довело до различни резултати по отношение на скоростта на растеж на поленовите тръбички на сините сливи, което може да се намери в литературата. На третия ден след опрашването, проникването на поленовите тръбички в яйчника на синята слива е наблюдавано от Kuzmanović (2008) и Đorđević et al. (2012). От друга страна Jonese et al. (1971) заявяват, че на поленовите тръбички са необходими пет дни, за да достигнат основата на стълбчето, докато DeCeault and Polito (2010) предвиждат шестдневен период, а Stott et al. (1973) период от осем дни.

Най-голямото количество опрашени плодници, с проникване в нуцелуса 240 ч. след опрашване, е получено при вариант на кръстосано опрашване във всички изследвани генотипи и през двете години, с изключение на хибриди IV/63/81 и 22/17/87 през 2011 г., когато този показател достига най-висока стойност във варианта на самоопрашване и отворено опрашване. По-бърз растеж на поленовите тръбички във вариант на кръстосано опрашване също отчитат Jia et al. (2008) и Đorđević et al. (2019) при синята слива, както и от Radičević et al. (2016) за черешите. Наличните данни в литературата показват, че динамиката на растеж на поленовите тръбички зависи от генотипа на опрашителя (Kuzmanović, 2008; Đorđević et al., 2019). Във връзка с това трябва да се има предвид, че в настоящото проучване, като източник на прашец за кръстосано опрашване е използван сорт „‘Čačanska Lepotica’“. Този сорт се счита за най-добрият опрашител за всички генотипи на европейската синя слива (Neumüler, 2011). В допълнение към хибрид 32/21/87, при който не се

growth rate between investigated genotypes, pollination modes and years can be explained by the findings of aforementioned authors.

Also, the impact of the same factors has led to different results regarding pollen tubes growth rate in plum, which can be found in the literature.

On the third day after pollination, penetration of pollen tubes in ovary of plum was observed by Kuzmanović (2008) and Đorđević et al. (2012).

On other hand, Jonese et al. (1971) stated that pollen tubes take five days to reach the base of the style, whereas DeCeault and Polito (2010) stipulated six days period, and Stott et al. (1973) a period of eight days.

The highest amount of pistils with penetration into the nucellus 240 h after pollination was obtained in cross-pollination variant in all investigated genotypes and in both years, except in hybrids IV/63/81 and 22/17/87 in 2011 where this parameter achieved the highest value in self-pollination and open-pollination variants, respectively.

A faster growth of pollen tubes under cross-pollination variant was also reported by Jia et al. (2008) and Đorđević et al. (2019) for plum, as well as by Radičević et al. (2016) for sweet cherry. Data available in the literature show that the dynamic of pollen tube growth rate depends on the genotype of pollenizer (Kuzmanović, 2008; Đorđević et al., 2019). Regarding this, it should be taken into account that in our study, as a pollen source for cross-pollination ‘Čačanska Lepotica’ was used.

This cultivar is considered as the best pollenizer for all genotypes of European plum (Neumüler, 2011). In addition to hybrid 32/21/87, in which pollen tube

наблюдава проникване на поленоватаа тръбичка в нуклеуса за 240 часа след самоопрашване е наблюдавано ниско количество пплодници с проникване на поленови тръбички в нуклеуса в същия срок и режим на опрашване за сорт “Nada“. Това е свързано с ниското ниво на самоопрашване на споменатите генотипи (Glišić et al., 2017).

Начините на опрашване повлияват значително процента на завръз за изследваните генотипи (Таблица 1). Най-висок процент е регистриран във вариант на кръстосано опрашване, с изключение на хибрид 34/41/87, където най-добрият резултат е получен във варианта на самоопрашване. При свободното опрашване процента на завръза варира между 9,27% (32/21/87) и 33,65% (34/41/87). Тези резултати са в съответствие с данните на Milatović (2019), който посочва, че плодният завръз на европейски сортове синя слива при вариант с ъс свободно опрашване варира от 0% до 50%. Като се имат предвид данните на Szabó (2003) за класификация на европейската синя слива в зависимост от плодния завръз при свободно опрашване, може да се заключи, че изследваните генотипи се характеризират с малък (32/21/87), среден (38/62)/70, IV/63/87 и “Nada“] и голям (34/41/87 и 22/17/87) плоден завръз. При вариант на самоопрашване стойностите на първоначалния плоден завръз варират от 1,08 (32/21/87) до 48,72 (34/41/87). Получените резултати съответстват на предишни данни на Glišić et al. (2017), които посочват ниска (32/21/87 и „Nada“), умерена (38/62/70 и IV / 63/81) и висока (34/41/87 и 22/17/87) степен на самоопрашване на изследваните генотипи. Първоначалният плоден завръз във варианта на кръстосано опрашване варира между 31.02% (38/62/70) и 54.06% („Nada“), което показва, че сорт “Čačanska Lepotica“ е задоволителен опрашител за изследваните генотипи (Mišić et al., 1979; Wertheim, 1996 ; Szabó, 2003).

penetration into the nucellus was not observed 240 h after self-pollination, a low amount of pistils with penetration of pollen tubes into the nucellus in the same term and pollination mode was observed in cultivar ‘Nada’. This is related to the low level of self-fertility of the mentioned genotypes (Glišić et al., 2017).

The pollination modes significantly impacted values of initial fruit set in the assessed genotypes (Table 1). The highest percentage of initial fruit set was observed in variant of cross-pollination for all genotypes, except for hybrid 34/41/87, where the best results were obtained in variant of self-pollination. The initial fruit set under open–pollination ranged between 9.27% (32/21/87) and 33.65% (34/41/87). Those results are in line with statements of Milatović (2019) who reported that fruit set of European plum cultivars in open-pollination variant varied from 0% to 50%.

Taking into account the statements of Szabó (2003) for classification of European plum depending on fruit set under open-pollination mode, it can be concluded that the assessed genotypes are characterized by low (32/21/87), medium (38/62/70, IV/63/87 and ‘Nada’) and high (34/41/87 and 22/17/87) degree of fruit set. In variant of self-pollination, values of initial fruit set varied from 1.08 (32/21/87) to 48.72 (34/41/87). Obtained results are in agreement with previously findings of Glišić et al. (2017), who reported low (32/21/87 and ‘Nada’), moderate (38/62/70 and IV/63/81) and high (34/41/87 and 22/17/87) self-fertility of the genotypes studied in the present research. The initial fruit set in variant of cross-pollination ranged between 31.02% (38/62/70) and 54.06% (‘Nada’) indicating that cultivar ‘Čačanska Lepotica’ is a satisfactory pollenizer for investigated genotypes (Mišić et al., 1979; Wertheim, 1996; Szabó, 2003).

**Таблица 1. Първоначален плоден завръз (%) на генотипи на синя слива при различни начини на опрашване**

**Table 1. Initial fruit set (%) of investigated plum genotypes under different pollination modes**

| | | Hybrid 38/62/70 | Hybrid IV/63/81 | Hybrid 32/21/87 | Nada | Hybrid 34/41/87 | Hybrid 22/17/87 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Вариант на опрашване/Pollination variant (A) | | | | | | | |
| Самоопрашване Self-pollination | | 21.90±6.39c | 35.61±1.02b | 1.08±0.34c | 13.45±1.29b | 48.72±1.34a | 32.27±1.02b |
| Свободно опрашване Open-pollination | | 26.76±1.31b | 14.39±0.88c | 9.27±0.36b | 12.09±1.12c | 33.65±0.35c | 32.04±0.95b |
| Кръстосано опрашване Cross-pollination | | 31.02±0.39a | 49.18±1.23a | 32.94±1.23a | 54.06±3.12a | 47.11±0.50b | 34.81±1.83a |
| Година/Year (B) | | | | | | | |
| 2010 | | 22.84±3.84b | 34.64±5.20a | 14.62±5.25a | 32.26±5.11a | 44.00±2.66a | 34.35±1.28a |
| 2011 | | 30.28±1.76a | 31.49±4.99b | 14.24±4.34a | 20.80±3.68b | 42.31±2.16b | 31.73±0.72b |
| A × B | | | | | | | |
| Самоопрашване Self-pollination | 2010 | 7.60±0.06d | 36.42±1.73a | 0.33±0.02d | 16.33±0.25c | 51.63±0.33a | 34.39±0.15b |
| | 2011 | 36.20±0.22a | 34.80±1.26a | 1.82±0.13d | 10.56±0.25e | 45.80±0.57c | 30.15±0.80c |
| Свободно опрашване Open-pollination | 2010 | 29.43±1.15b | 15.95±0.83a | 8.50±0.24c | 14.51±0.59d | 34.19±0.54d | 29.92±0.23c |
| | 2011 | 24.10±0.34c | 12.84±0.89a | 10.05±0.05c | 9.68±0.49e | 33.11±0.22d | 34.16±0.07b |
| Кръстосано опрашване Cross-pollination | 2010 | 31.49±0.54b | 51.56±1.39a | 35.02±0.66a | 65.95±1.01a | 46.19±0.08b | 38.75±0.45a |
| | 2011 | 30.55±0.49b | 46.82±0.16a | 30.86±1.44b | 42.17±0.49b | 48.02±0.66c | 30.87±0.97c |
| ANOVA | | | | | | | |
| A | | ** | ** | ** | ** | ** | ** |
| B | | ** | ** | ns | ** | ** | ** |
| A × B | | ** | ns | ** | ** | ** | ** |

* Посочва разлика (F тест) при P ≤ 0.05; Малките букви посочват разликите при $P \leq 0.05$ според LSD тест
*Indicates a factor difference (*F* test) at P ≤ 0.05; The different lower-case letters indicate differences at $P \leq 0.05$ according to the LSD test.

Въздействието на годината върху първоначалния плоден завръз не е значително само при хибрид 32/21/87 (Таблица 1). Останалите генотипи показаха по-високи стойности през първата година на изследване, с изключение на хибрид 38/62/70. Освен това взаимодействието между начина на опрашване и годината значително повлияват на първоначалния плоден завръз на изследваните генотипи, с изключение на хибрид IV/63/81. Получените резултати могат да бъдат обяснени с влиянието на метеорологичните условия (Furukawa and Bukovac, 1989), както и от специфичния отговор на генотипа на мъжкия и женския пол върху тяхното въздействие.

Impact of year on initial fruit set was not significant only in hybrid 32/21/87 (Table 1). The other genotypes showed higher values in the first year of investigation, except hybrid 38/62/70.

Also, the interaction of pollination mode and year significantly impacted the initial fruit set of the investigated genotypes, except hybrid IV/63/81.

The obtained results can be explained by the impact of weather conditions on the fruit set (Furukawa and Bukovac, 1989), as well as by the specific response of each male and female genotype to their impact.

## ИЗВОДИ

Резултатите от настоящото проучване показват, че скоростта на растеж на поленовите тръбички се обуславя от генотипа, начина на опрашване и годината. Най-добрата сила на растеж на поленовите тръбички в повечето проучвани генотипи е получена във вариант на кръстосано опрашване. Съответно, най-доброто плододаване на повечето изследвани генотипи е получено и във вариант на кръстосано опрашване. Стойностите на плодния завръз, установени във вариант на свободно опрашване, показват, че хибриди 38/62/70, IV / 63/87, 34/41/87 и 22/17/87 и сорт "Nada" имат добър потенциал за култивиране. Степента на растеж на плодната тръбичка и първоначалния плоден завръз в хибриди 32/21/87 и сорт "Nada" при самоопрашване, показват частичната самосъвместимост на тези генотипи, докато споменатите параметри във вариант на кръстосано опрашване показват, че „Čačanska Lepotica" може да се препоръча като техен опрашител.

## CONCLUSIONS

The results of the present study indicate that pollen tubes growth rate is conditioned by genotype, pollination mode and year. The best pollen tubes growth dynamics in the majority of studied genotypes were obtained in the cross-pollination variant.

Accordingly, the best fructification of the most examined genotypes was also obtained in the variant of cross-pollination. The values of fruit set in variant of open-pollination indicate that hybrids 38/62/70, IV/63/87, 34/41/87 and 22/17/87 and cultivar 'Nada' have good cropping potential.

The pollen tube growth rate and initial fruit set in hybrids 32/21/87 and cultivar 'Nada' under self-pollination mode point to the partial self-compatibility of those genotypes, while the mentioned parameters in variant of cross-pollination show that 'Čačanska Lepotica' can be recommended as their pollenizer.


## БЛАГОДАРНОСТИ

Настоящото изследване е проведено с подкрепата на Министерството на образованието, науката и технологичното развитие на Република Сърбия, договор No. 451-03-68/2020-14/200215 (включващ проект № 31064, озаглавен „Развитие и запазване на генетичния потенциал на плодовете в умерена климатична зона").

## ACKNOWLEDGEMENTS

This research was conducted under the support of Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia, contract No. 451-03-68/2020-14/200215 (including project No. 31064, titled 'Development and preservation of genetic potential of temperate zone fruits').


## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES


1. **Bayer, I. and R. Stösser**, 2002. Changes of Style Structure During Bloom and its Effect on Pollen Tube Growth and Fruit Set in the Plum Variety 'Lützelsachser' (*Prunus domestica* L.). *Gartenbauwissenschaft*, 67, 213-224.
2. **Beltrán, R., A. Valls, N. Cebrián, C. Zornoza, F. G. Breijo, J. R. Armiñana, A. Garmendia and H. Merle**, 2019. Effect of Temperature on Pollen Germination for Several Rosaceae Species: Influence of Freezing Conservation Time on Germination Patterns. *PeeerJ*, DOI 10.7717/peerj.8195.
3. **Cerović, R. and N. Mićić**, 1996. Pollination and Fertilization of Pome and Stone Fruit Species. *Journal of Yugoslav Pomology*, 30, 73-98 (Sr).
4. **Cerović, R. and N. Mićić**, 1999. Functionality of Embryo Sacs as Related to

Their Viability and Fertilization Success in Sour Cherry. *Scientia Horticulturae*, 79, 227-235.
5. **Cerović, R., Đ. Ružić and N. Mićić**, 2000. Viability of Plum Ovules at Different Temperatures. *Annals of Applied Biology*, 137(1), 53-59.
**6. DeCeault, M. T. and V. S. Polito**, 2010. High Temperatures During Bloom Can Inhibit Pollen Germination and Tube Growth, and Adversely Affect Fruit Set in the Prunus domestica Cultivars 'Improved French' and 'Muir Beauty'. In: Proceedings of IX International Symposium on Plum and Prune Genetics, Breeding and Pomology, Italy, *Acta Horticulturae*, 874, 163-168.
7. **Đorđević, M., R. Cerović, S. Radičević, D. Nikolić, N. Milošević, I. Glišić, S. Marić and M. Lukić**, 2019. Polen Tube Growth and Embryo Sac Development in 'Pozna Plava' Plum Cultivar Related to Fruit Set. *Erwerbs-Obstbau*, 61, 313-322.
8. **Đorđević, M., R. Cerović, D. Nikolić, S. Radičević and M. Lukić**, 2012. Pollen Tubes Growth in the Plum Pistils in Relations to Initial Fruit Set. *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans*, 15(3), 726-733.
9. **Furukawa, Y. and M. J. Bukovac**, 1989. Embryo Sac Development in Sour Cherry During the Pollination Period as Related to Fruit Set. *Horticultural Science*, 24, 1005-1008.
10. **Glišić, I., D. Milatović, R. Cerović, S. Radičević, M. Đorđević and N. Milošević**, 2017. Examination of Self-Compatibility in Promising Plum (*Prunus domestica* L.) Genotypes Developed at Fruit Research Institute, Čačak. *Scientia Horticulturae*, 224, 156-162.
11. **Hedhly, A., J. I. Hormaza and M. Herrero**, 2004. Effect of Temperature on Pollen Tube Kinetics and Dynamics in Sweet Cherry *Prunus avium* (*Rosaceae*). *American Journal of Botany*, 91(4):558-564.
12. **Hedhly, A.**, **J. I. Hormaza and M. Herrero**, 2005. Influence of Genotype-Temperature Interaction on Pollen Performance. *Journal of Evolutionary Biology*, 18(6), 1494-1502.
13. **Herrero, M.**, 1992. Mechanisms in the Pistil that Regulate Gametophyte Population in Peach (*Prunus persica*). In: Angiosperm Pollen and Ovules (E. Ottaviano, D. L.Mulcahy, M. Sari-Gorla and G.B. Mulcahy, eds.). Springer, New York-Berlin-Heidelberg, Germany, pp. 377-381.
14. **Jia, H.J., He, F.J., Xiong C.Z., Zhu, F.R. and G. Okamoto**, 2008. Influences of Cross Pollination on Pollen Tube Growth and Fruit Set in Zuili Plums (Prunus salicina). *Journal of Intergrative Olant Biology*, 50(2), 203-209.
15. **Jones, V., K. G. Stott and R. R. Williams**, 1971. Pollination in Plums. Report of Long Ashton Research Station for 1970, University of Bristol, pp. 24.
16. **Keulemans, J.** 1984. The Effect of Temperature on Pollen Tube Growth and Fruit Set on Plum Trees. *Acta Horticulturae*, 149, 95-101.
17. **Kho, Y.O. and J. Baër**, 1971. Fluorescence Microscopy in Botanical Research. *Zeiss Information*, 76, 54-57.
18. **Koskela, E., H. Kemp and M. C. A. van Dieren**, 2010. Flowering and Pollination Studies with European Plum (*Prunus domestica* L.) Cultivars. In: Proceedings of IX International Symposium on Plum and Prune Genetics, Breeding and Pomology, Italy, *Acta Horticulturae*, 874, 193-201.
19. **Kuzmanović, M.**, 2008. Reproductive Biology of Plum Cultivar '"Čačanska Lepotica' "'. Master thesis, University of Belgrade, Faculty of Agriculture (Sr).
20. **McCormick, S.**, 2004. Control of Male Gametophyte Development. *Plant Cell*, 16, 142-153.
21. **Milatović, D.**, 2019. Plum. Scientific Pomological Society of Serbia, pp. 531 (Sr).

22. **Mišić, P., R. Todorović, D. Vinterhalter, N. Lekić, V. Pavlović and S. Dragutinović**, 1979. Investigation of Relationship of Fertilisation of Some European Plum Cultivars. *The Science in Practice*, *9*(5), 571-576 (Sr).
23. **Neumüller, M.**, 2011. Fundamental and Applied Aspects of Plum (*Prunus domestica* L.) Breeding. *Fruit Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*, 5(spec. issue 1), 139-154.
24. **Nikolić, D. and D. Milatović**, 2010. Examining Self-Compatibility in Plum (*Prunus domestica* L.) by Fluorescence Microscopy. *Genetika*, 42(2), 387-396.
25. **Nikolić, D., V. Rakonjac and M. Fotirić-Akšić**, 2012. The Effect of Pollenizer on the Fruit Set of Plum Cultivar Čačanska Najbolja. *Journal of Agricultural Science*, 57(1), 9-18.
26. **Palanivelu, R. and T. Tsukamoto**, 2011. Pathfinding in Angiosperm Reproduction: Pollen Tube Guidance by Pistils Ensures Successful Double Fertilization. *WIREs Development Biology*, 1(1), 96-113.
27. **Petropoulou, S. P. and F. H**. **Alston**, 1998. Selecting for Improved Pollination at Low Temperatures in Apple. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 73, 507-512.
28. **Radičević, S., R. Cerović, D. Nikolić and M. Đorđević**, 2016. The Effect of Genotype and Temperature on Pollen Tube Growth and Fertilization in Sweet Cherry (*Prunus avium* L.). *Euphytica*, 209, 121-136.
29. **Sanzol, J. and M. Herrero**, 2001. The Effective Pollination Period in Fruit Trees. *Scientia Horticulturae*, 90, 1-17.
30. **Stephenson, A. G., S. E. Travres, J. I. Mena-Ali and J. A. Winsor**, 2003. Pollen Performance Before and During the Autotrophic Transmission of Pollen Tube Growth. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 358, 1009-1018.
31. **Stösser, R. and S. F. Anvari**, 1982. On the Senescence of Ovule in Cherries. *Scientia Horticulture*, 45, 28-29.
32. **Stott, K. G., C. J. Jefferies and C. Jago**, 1973. Pollination and Fruit Set in Plum. Report of Long Ashton Research Station for 1972, University of Bristol, pp. 23-26.
33. **Surányi, D.**, 2006. Comparative Study of Different Fertile Groups in Plums. *International Journal of Horticultural Science*, 12(3), 71-76.
34. **Szabó, Z.**, 2003. Plum (*Prunus domestica* L.). In: Floral Biology, Pollination and Fertilisation in Temperate Zone Fruit Species and Grape (P. Kozma, M. Nyéki and Z. Szabó, eds.). Akadémiai Kiadó, Budapest, pp. 383-410.
35. **Wertheim, S.J.**, 1996. Methods for Cross Pollination and Flowering Assessment and Their Interpretation. In: Proceedings of II Workshop on Pollination, Belgium, *Acta Horticulturae*, 423, 237-241.
36. **Yadegari, R. and N. G. Drewsb**, 2004. Female Gametophyte Development. *The Plant Cell*, 16, 133-141.
37. **Yerko, M. M. and A. N. Miller-Azarenko**, 1992. Genotype, Temperature, and Fall-Applied Ethephon Affect Plum Flower Bud Development and Ovule Longevity. *Journal of American Horticultural Science*, 117(1), 14-21.