

## Funkcionalnost embrionovih kesica sorte trešnje Asenova rana u odnosu na njihovu vitalnost i uspešnost oplodjenja

Radosav Cerović<sup>1</sup>, Sanja Radičević<sup>2</sup>, Đurđina Ružić<sup>2</sup>, Milena Đorđević<sup>2</sup>, Tatjana Vujović<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Inovacioni centar Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu, Karnegijeva 4, 11120 Beograd, Srbija*

*E-mail: radosavcerovic@gmail.com*

<sup>2</sup>*Institut za voćarstvo, Kralja Petra I/9, 32000 Čačak, Srbija*

*Primljeno: 08. septembra 2014; prihvaćeno: 14. oktobra 2014.*

**Rezime.** U toku dve godine u poljskim uslovima, ispitivana je funkcionalnost embrionovih kesica sorte trešnje Asenova rana u odnosu na njihovu vitalnost i uspešnost oplodjenja, u periodu od početka punog cvetanja, zaključno sa 21. danom. Broj funkcionalnih embrionovih kesica (8-, 5- i 4-jedarni stadijum) je bio neznatno veći u prvoj godini ispitivanja. Broj embrionovih kesica sa embrionom po godinama je bio približan, sa maksimumom između desetog i četrnaestog dana od početka fenofaze punog cvetanja. Temperaturni uslovi u toku deset dana od početka punog cvetanja tokom dve godine su bili ujednačeni, tako da nisu imali uticaja na dužinu vitalnosti embrionovih kesica, kao ni na broj embrionovih kesica sa embrionom u uslovima slobodnog oprašivanja. Utvrđeno je da je funkcionalnost embrionovih kesica, odnosno njihova vitalnost, obrnuto proporcionalna broju embrionovih kesica sa embrionom, odnosno uspešnosti oplodjenja.

**Ključne reči:** trešnja, embrionova kesica, vitalnost, embrion, oplodjenje

### Uvod

Istraživanja u oblasti biologije oplodjenja voćaka u neposrednoj su funkciji rešavanja problema rodosti i nerodnosti pojedinih sorti, sa osnovnim ciljem maksimalne realizacije njihovog rodnog potencijala u praksi (Cerović & Mičić, 1996). Na uspešnost procesa oplodjenja utiču brojni biotički i abiotički faktori (Cerović, 1997). Temperatura u vreme punog cvetanja predstavlja jedan od najvažnijih abiotičkih faktora koji utiče, između ostalog, na receptivnost stigme (Burgos et al., 1991; Egea et al., 1992; Hedhly et al., 2003), brzinu rasta polenovih cevčica u stubiću i plodniku (Socias i Company et al., 1976; Vasilakakis & Porlingis, 1984; Cerović & Ružić, 1992a; Hedhly et al.,

2004), kao i na dužinu vitalnosti semenih zametaka (Stösser & Anvary, 1982; Postweiler et al., 1985; Cerović & Ružić, 1992b; Cerović & Mičić, 1999; Cerović et al., 2000; Radičević, 2013).

Dužina vitalnosti embrionovih kesica kod nekih vrsta voćaka predstavlja jedan od najvažnijih faktora koji neposredno utiče na uspešnost procesa oplodjenja. Regularnost odvijanja makrosporigeneze i makrogametogeneze je takođe usko povezana sa formiranjem normalne i funkcionalne embrionove kesice. Kod nekih sorti kajsije i višnje vitalnost embrionovih kesica je kratka i praćena pojavom njihove rane degeneracije, koja ograničava uspešnost dvojnog oplodjenja (Eaton & Jamont, 1965; Dys, 1984). U nekim slučajevima, nutritivni i abiotički stresovi za vreme ranog razvoja

ploda kod nekih sorti višnje mogu dovesti do abortivnosti embriona (Furukawa & Bukovac, 1989).

Cilj ovih istraživanja bio je da se za sortu trešnje Asenova rana zaokruže saznanja o procesu oplođenja, utvrđivanjem funkcionalnosti embrionovih kesica u odnosu na njihovu vitalnost i uspešnost oplođenja u uslovima slobodnog oprašivanja. U ranijim istraživanjima, kod ove sorte određivana je najefikasnija sorta na kompozicija oprašivača primenom različitih testova za ispitivanje klijavosti polena (Cerović *et al.*, 2003).

## Materijal i metode

Sorta trešnje Asenova rana je nastala kao rezultat ukrštanja sorti Drogan's Yellow × Majova rana, i jedna je od brojnih sorti koštičavih vrsta voćaka stvorenih u Institutu za voćarstvo u Čačku. Cvetanje je srednjerano (Radičević *et al.*, 2012), a plodovi sazrevaju krajem druge nedelje zrenja trešnje, odnosno početkom juna (Radičević *et al.*, 2000). Rano prorodi, rađa redovno i obilno.

Ogled je sproveden u poljskim uslovima na stablima ove sorte sa uniformnim granama i cvetovima odabranim u fazi poznog balona. Eventualno otvoreni cvetovi su uklonjeni, a ostali su emaskulirani i izolovani kesama od gaze da bi se sprečilo moguće nekontrolisano oprašivanje (neoprašena kombinacija). Druga grupa cvetova je ostavljena za kombinaciju slobodnog oprašivanja.

Dvadeset tučkova po kombinaciji su 3., 6., 10., 14. i 21. dana od početka fenofaze punog cvetanja fiksirani i čuvani u FPA fiksativu (formalin : propionska kiselina : 70% etil-alkohol, u odnosu 5 : 5 : 90) na +4 °C. Materijal je dehidratiran kroz seriju etil-alkohola i ukalupljen u parafinske blokove, koji su zatim sečeni na mikrotomu uzdužno i poprečno, na preseke debljine od 10  $\mu$ m. Bojenje preseka je vršeno sa Delafildovim hematoksilinom.

Za vreme punog cvetanja vršeno je merenje dnevne temperature. Ogled je sproveden tokom dve godine.

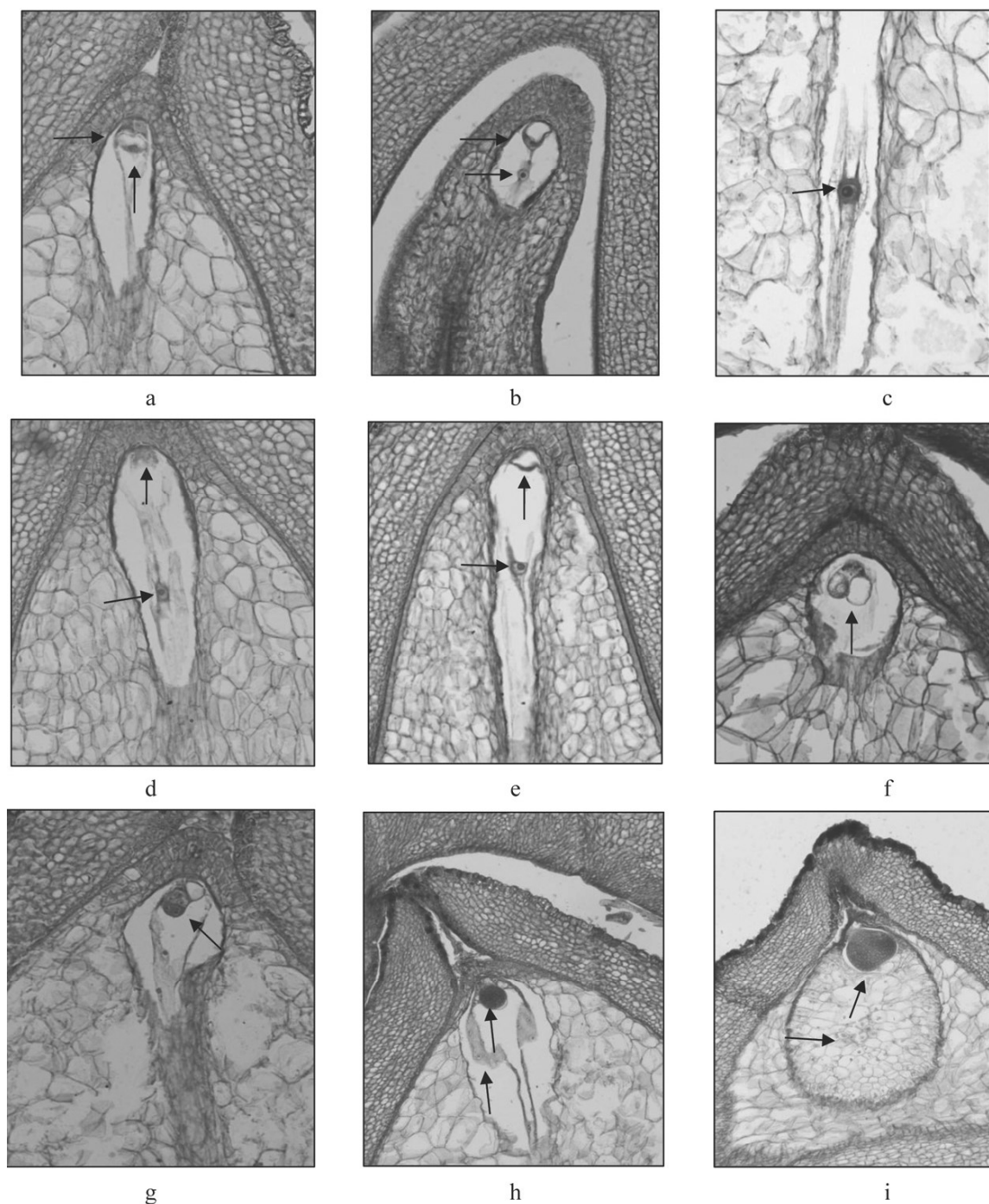
Trendovi broja funkcionalnih stadijuma embrionove kesice (8-, 5- i 4-jedarni stadijum) i embrionovih kesica sa embrionom u kombinaciji slobodnog oprašivanja, predstavljeni su najbolje prilagođenim regresionim linijama, tipa parabole.

## Rezultati

U ovim istraživanjima nije proučavan proces makrosporigeneze, budući da je on započinjao ranije, pre početka fenofaze punog cvetanja. Za trešnju kao biljnu vrstu karakteristično je da najdonja ćelija tetrađa (makrospora), tokom procesa makrogametogeneze formira monosporu osmojedarnu, bipolarnu embrionovu kesicu Polygonum tipa. Na početku punog cvetanja u embrionovim kesicama zapaženi su svi njeni elementi: dve sinergide, jajna ćelija, dva polarna jedra i tri antipode, koje po svom karakterističnom citomorfološkom obliku i položaju predstavljaju uobičajenu i normalnu, 8-jedarnu embrionovu kesicu (Sl. 1a, b). Antipode brzo propadaju, tako da spajanje polarnih jedara u jedno centralno jedro određuje konačno i broj jedara u embrionovoj kesici, koji neposredno pre procesa singamije obično iznosi četiri (Sl. 1c). U neoprašenoj kombinaciji zapažene su embrionove kesice sa normalno dva polarna jedra i u kasnijim fazama punog cvetanja, odnosno to su embrionove kesice sa pet jedara. U ovoj fazi počinje i tipično izduživanje embrionove kesice prema halaznom delu semenog zametka.

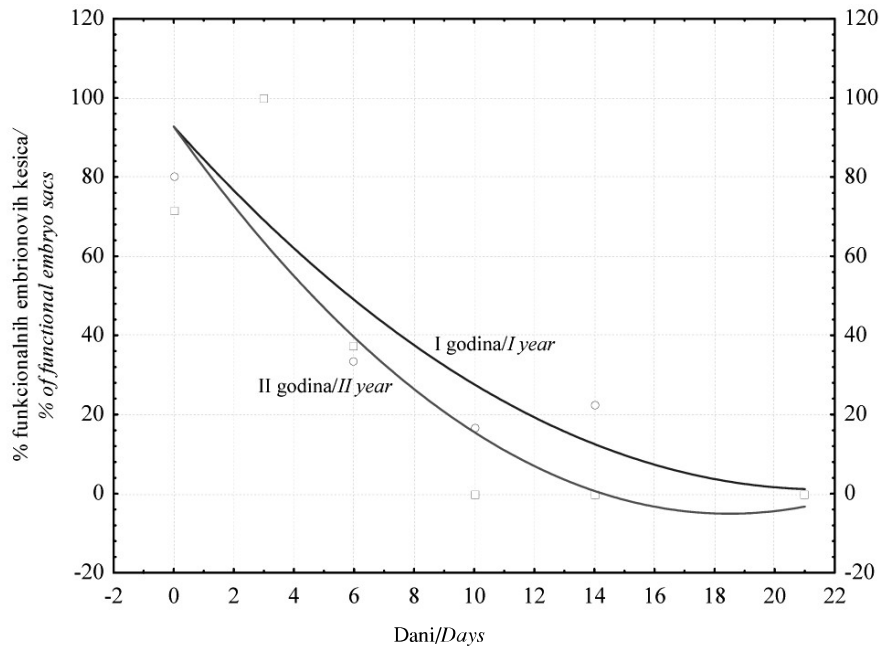
Ukoliko se sva tri funkcionalna stadijuma embrionove kesice sposobna za oplođenje (8-, 5- i 4-jedarni) predstave zbirno, regresionom linijom tipa parabole, koja je i najbolje prilagođena dinamici broja semenih zametaka, može se zapaziti brži gubitak vitalnosti embrionovih kesica u drugoj godini istraživanja (Graf. 1). Desetog dana od početka fenofaze punog cvetanja, nije više bilo funkcionalnih stadijuma embrionove kesice. U obe godine, šestog dana od početka punog cvetanja uočene su tipične pojave degeneracije, ili iregularnosti u prostornom položaju i citološkom obliku pojedinih elemenata embrionove kesice, odnosno celog jajnog aparata (Sl. 1d, e, f). Najdužu vitalnost u embrionovoj kesici pokazalo je centralno jedro. Paralelno sa opisanim degenerativnim promenama i iregularnim rasporedom pojedinih elemenata embrionove kesice, i tkivo semenog zametka je pokazivalo znake degeneracije. Obično su takve pojave zapažene prvo u integumentima, da bi kasnije zahvatile ceo semeni zametak.

U ispitivanom intervalu od početka fenofaze punog cvetanja zaključno sa 21. danom, praćena je uspešnost oplođenja u uslovima slobodnog oprašivanja, izražena kroz procenat embrionovih kesica sa embrionom (Graf. 2). Dinamika zastupljenosti embrionovih kesica sa embrionom takođe je najbolje prilagođena

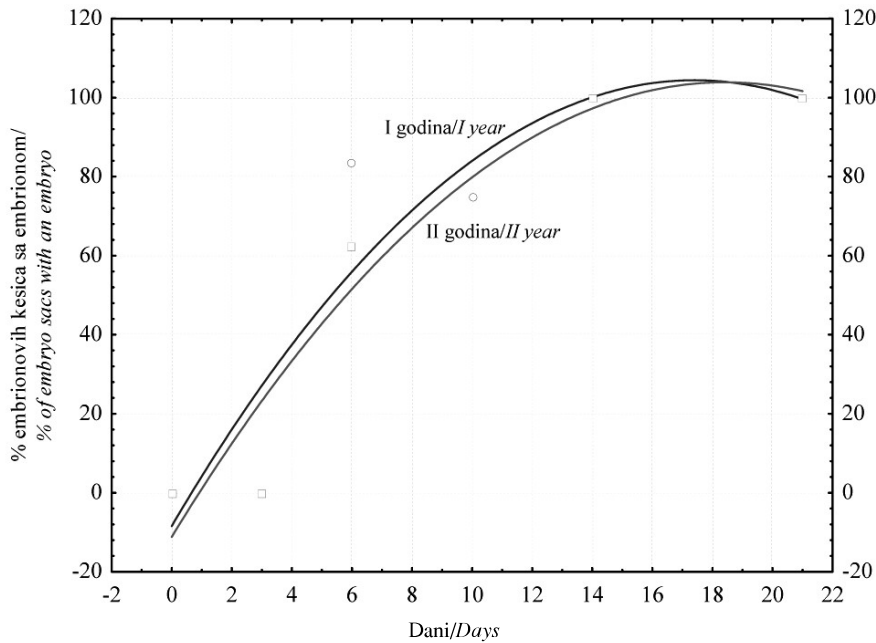


Sl. 1. Dve sinergide i jajna ćelija u mikropilarnom delu embrionove kesice (a); Jajna ćelija i centralno jedro (b); Centralno jedro (c); Degeneracija dve sinergide (d); Degeneracija jajne ćelije (e); Nepravilna konfiguracija jajnog aparata (f); Rani embrion (g); Globularni embrion i nuklearni endosperm (h); Rani srcasti embrion sa celularnim endospermom (i)

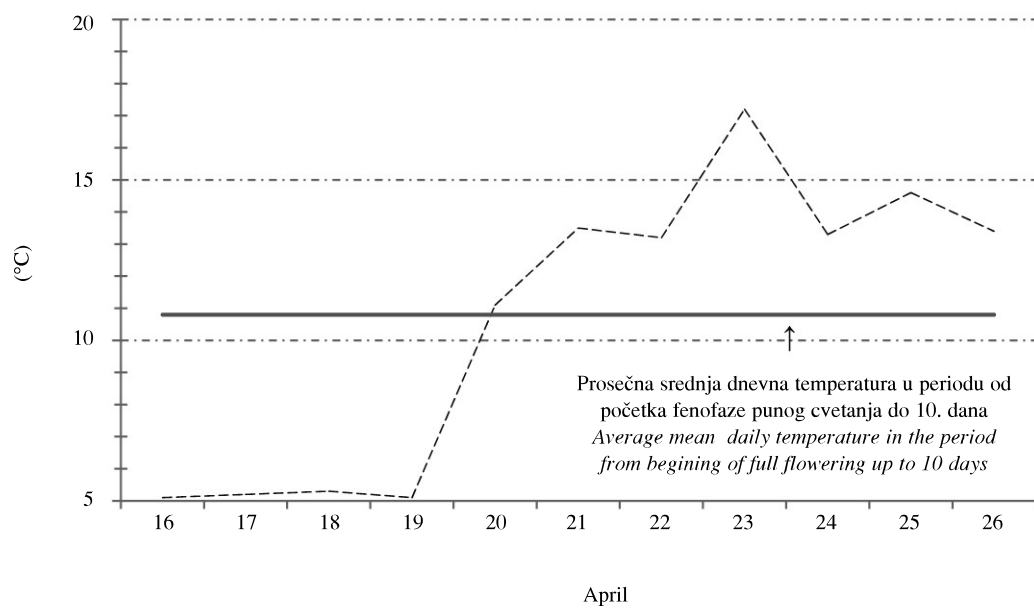
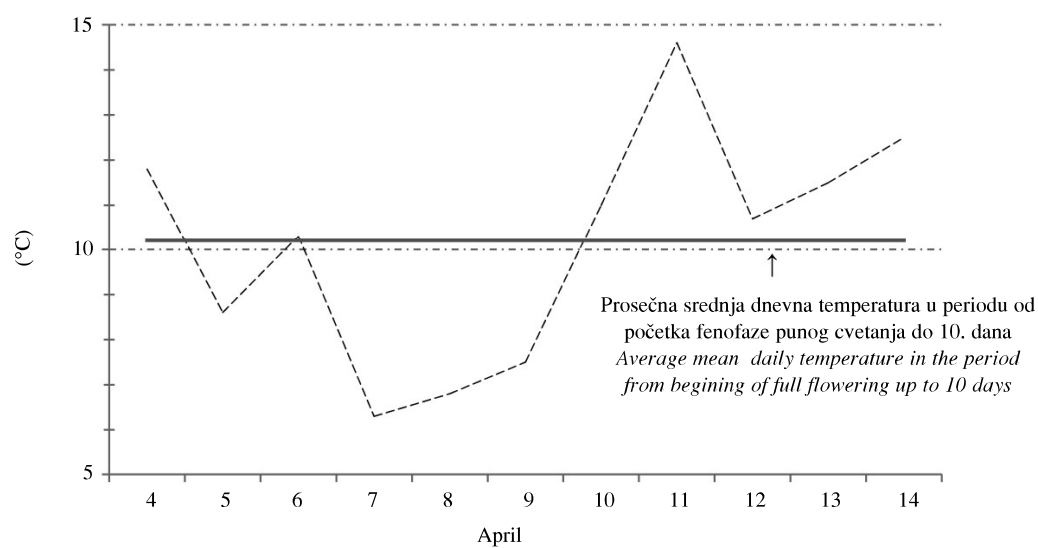
*Fig. 1. Two synergids and egg cell in micropilar part of the embryo sac (a); Egg cell and central nuclei (b); Central nuclei (c); Degeneration of two synergids (d); Degeneration of egg cell (e); The irregular configuration of egg apparatus (f); Early embryo (g); Globular embryo and nuclear endosperm (h); Early heart embryo with cellular endosperm (i)*



Graf. 1. Procenat funkcionalnih embrionovih kesica (8-, 5- i 4 jedarni stadijum) u kombinaciji bez oprašivanja sorte Asenova rana u dve godine. (○) I godina:  $92,7588 - 8,4678x + 0,1955x^2$  ( $R^2 = 0,7946$ ); (□) II godina:  $92,7514 - 10,5803x + 0,2861x^2$  ( $R^2 = 0,7791$ )  
 Graph 1. Percentage of functional embryo sacs (8-, 5- and 4-nucleate) in unpollinated flowers of cultivars 'Asenova Rana' over two years. (○) I year:  $92,7588 - 8,4678x + 0,1955x^2$  ( $R^2 = 0,7946$ ); (□) II year:  $92,7514 - 10,5803x + 0,2861x^2$  ( $R^2 = 0,7791$ )



Graf. 2. Procenat embrionovih kesica sa nekim od stadijuma posle oplodnje/embrionom u kombinaciji slobodnog oprašivanja sorte Asenova rana u dve godine. (○) I godina:  $-8,4402 + 12,9674x - 0,3725x^2$  ( $R^2 = 0,8536$ ); (□) II godina:  $-11,182 + 12,4897x - 0,3389x^2$  ( $R^2 = 0,9214$ )  
 Graph 2. Percentage of embryo sacs with embryo in condition of open pollination in cultivars 'Asenova Rana' over two years. (○) I year:  $-8,4402 + 12,9674x - 0,3725x^2$  ( $R^2 = 0,8536$ ); (□) II year:  $-11,182 + 12,4897x - 0,3389x^2$  ( $R^2 = 0,9214$ )



Graf. 3. Dinamika srednjih dnevnih temperatura u poljskim uslovima od početka fenofaze punog cvetanja do 10. dana, kod sorte sorte trešnje Asenova rana u prvoj (a), i drugoj eksperimentalnoj godini (b)

Graph 3. Dynamics of mean daily temperatures under field conditions from the beginning of full flowering up to 10 days, in sweet cherry 'Asenova Rana' in the first (a), and the second year of experiment (b)

regresionoj liniji tipa parabole. Počev od šestog dana nakon početka fenofaze punog cvetanja zapažene su različite embrionalne strukture u skladu sa njegovim ontogenetskim razvojem (proembrion, globularni i rani srcasti stadijum) (Sl. 1g, h, i). Broj embrionovih kesica sa embrionom po godinama je bio približan, i između desetog i četranaestog dana nakon početka punog cvetanja dostizao je svoj maksimum. Paralelno sa odvijanjem procesa rane embriogeneze započinje proces formiranja endosperma, od nuklearnog do celularnog tipa (Sl. 1h, i). Mada je broj semenih zametaka sa embrionom bio neznatno veći u prvoj godini ispitivanja, na kraju 21. dana od početka cvetanja on je imao približnu vrednost u obe godine.

Prosečna srednja dnevna temperatura u toku prvih deset dana punog cvetanja u prvoj godini ispitivanja je iznosila 10,2 °C, a u drugoj godini 10,8 °C. Temperaturni uslovi su bili dosta ujednačeni, tako da nisu uticali na dužinu vitalnosti embrionovih kesica, kao i na uspešnost procesa oplodjenja po godinama (Graf. 3).

## Diskusija

Pojedini elementi embrionove kesice degenerišu sledećim redosledom: prvo sinergide, zatim jajna ćelija i na kraju polarna jedra, odnosno centralno jedro (Cerović, 1997). Broj funkcionalnih embrionovih kesica se smanjuje progresivno od početka punog cvetanja, tako da je sedmog dana kod nekih sorti višnje utvrđeno samo 8% funkcionalnih embrionovih kesica (Furukova & Bukovac, 1989). Stosser & Anvari (1982) su kod nekih sorti trešnje i višnje utvrdili da vitalnost semenih zametaka varira između tri i pet dana od početka punog cvetanja. Takođe je utvrđeno da pojava fluorescencije primarnih semenih zametaka kod trešnje, kao indikator gubitka njihove vitalnosti, pokazuje snažnu genotipsku zavisnost (Radičević, 2013). Kod nekih sorti trešnje gubljenje vitalnosti embrionovih kesica započinje već posle drugog dana od početka punog cvetanja, gde ima samo 50% funkcionalnih embrionovih kesica, tako da šestog dana nije više bilo funkcionalnih jajnih ćelija u embrionovim kesicama (Eaton, 1959). U našim istraživanjima, vitalne embrionove kesice su u malom procentu prisutne do desetog dana fenofaze punog cvetanja, iako su posle trećeg i šestog dana počele progresivno gubiti svoju vitalnost. Obično

prve degenerišu sinergide, a kasnije se javlja i degeneracija jajne ćelije, kao izražena iregularnost u prostornom položaju i citološkom obliku svih elemenata u embrionovoj kesici (Cerović, 1997; Cerović & Mičić, 1999).

Kod nekih klonova Oblašinske višnje utvrđeno je postojanje funkcionalnog jajnog aparata i centralnog jedra i dvanaestog dana od početka punog cvetanja (Fotirić, 2009). Pretpostavlja se da je kod sorte trešnje Asenova rana, kao i kod ranije ispitivanih sorti, dinamika i dužina vitalnosti embrionovih kesica sortno specifična u određenim agroekološkim uslovima.

U našem istraživanjima, broj embrionovih kesica sa embrionom raste posle šestog dana od početka punog cvetanja, što je utvrđeno i kod nekih sorti višnje (Cerović & Mičić, 1999). Pojava embriona posle šestog dana u ovim istraživanjima se može dovesti u vezu sa efikasnošću programne faze u određenim temperaturnim uslovima u ispitivanom intervalu punog cvetanja (Cerović & Ružić, 1992a; Fotirić, 2009). Trend progresivnog rasta broja embrionovih kesica sa embrionom, odnosno uspešnosti oplodjenja, pod uticajem je polinacionog procesa na aktivaciju plodnika i njegovih struktura (Piemienta & Polito, 1983; Herrero *et al.*, 1988).

Naši rezultati pokazuju da je funkcionalnost embrionove kesice, odnosno njihova vitalnost, obrnuto proporcionalna broju embrionovih kesica sa embrionom, odnosno da se dinamika gubljenja vitalnosti embrionovih kesica poklapa sa brojem embrionovih kesica sa embrionom. Sorta trešnje Asenova rana je u obe godine pokazala iste trendove u približno istim temperaturnim uslovima u periodu punog cvetanja.

Iz ovog se može zaključiti da je kod ove sorte trešnje izražena regularnost procesa u ženskoj sferi, kao i oplodnih procesa. U ranijim istraživanjima je već utvrđeno da se sorta trešnje Asenova rana preklapa tri do šest dana u periodu punog cvetanja sa najvažnijim komercijalnim sortama trešnje kod nas, i određena joj je najefikasnija sortna kompozicija oprašivača (Cerović *et al.*, 2003; Radičević *et al.*, 2012). Mada u ovim istraživanjima nisu praćeni ostali faktori koji utiču na postopodne procese, ovi rezultati mogu poslužiti za bolje upoznavanje procesa koji direktno i indirektno utiču na uspešnost oplodjenja. Na taj način omogućava se stvaranje preduslova za uspešno rukovođenje i usmeravanje tog procesa u praksi (Linskens, 1988).

## Zaključak

Rezultati ovog rada su pokazali da je funkcionalnost embrionovih kesica sorte trešnje Asenova rana, odnosno njihova vitalnost, obrnuto proporcionalna broju embrionovih kesica sa embrionom. Manje razlike u pogledu funkcionalnosti embrionove kesice po godinama nisu imale većeg uticaja na uspešnost oplodjenja u tim godinama.

Ovi rezultati će upotpuniti znanja vezana za proces oplodjenja sorte trešnje Asenova rana, koje će uz ranije definisanu sortnu kompoziciju oprašivača predstavljati imperativ za njenu uspešnu rodnost u praksi.

## Zahvalnica

Ova istraživanja su finansijski podržana od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja RS (projekti TR-20013A i TR-31064).

## Literatura

- Burgos L., Egea J., Dicenta F. (1991): Effective pollination period in apricot (*Prunus armeniaca* L.) varieties. *Annals of Applied Biology*, 119: 533–539.
- Cerović R. (1997): Biologija oplodnje višnje. Zadužbina Andrejević, Beograd, 1–132.
- Cerović R., Mičić N. (1996): Oprašivanje i oplodnja jabučastih i koštičavih voćaka. *Jugoslovensko voćarstvo*, 30: 73–98.
- Cerović R., Mičić N. (1999): Functionality of embryo sacs as related to their viability and fertilization success in sour cherry. *Scientia Horticulturae*, 79: 227–235.
- Cerović R., Ružić Đ. (1992a): Pollen tube growth in sour cherry (*Prunus cersus* L.) at different temperatures. *Journal of Horticultural Science*, 67: 333–340.
- Cerović R., Ružić Đ. (1992b): Senescence of ovules at different temperatures and their effect on the behaviour of pollen tubes in sour cherry. *Scientia Horticultuirae*, 51: 321–327.
- Cerović R., Ružić Đ., Mičić N. (2000): Viability of plum ovules at different temperatures. *Annals of Applied Biology*, 137: 53–59.
- Cerović R., Ružić Đ., Radičević S., Nikolić M. (2003): Određivanje sorte kompozicije oprašivača za trešnju cv Asenova rana. *Jugoslovensko voćarstvo*, 37, 143/144: 85–94.
- Dys B. (1984): Cyto-embryological studies in self-incompatible and self-fertile cultivars of sour cherries (*Cerasus vulgaris* Mill.). II. Development of embryo sacs and ovules at some stages of florescence. *Genetica Polonica*, 25, 2: 171–180.
- Eaton G.W. (1959): A study of the megagametophyte in *Prunus avium* and its relation to fruit setting. *Canadian Journal of Plant Science*, 39: 466–476.
- Eaton G.W., Jamont A.M. (1965): Embryo sac development in the apricot, *Prunus armeniaca* L. cv Constant. *Proceedings of American Society for Horticultural Science*, 86: 95–101.
- Egea J., Burgos L., Garcia J.E., Egea L. (1992): Stigma receptivity and style performance in several apricot cultivars. *Journal of Horticultural Science*, 66: 19–25.
- Fotirić M. (2009). Klonska selekcija i biologija oplodjenja Oblačinske višnje (*Prunus cerasus* L.). Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Zemun, 1–117.
- Furukawa Y., Bukovac M.J. (1989) Embryo sac development in sour cherry during the pollination period as related to fruit set. *Horticultural Science*, 24: 1005–1008.
- Hedhly A., Hormaza J.I., Herrero M. (2003): The effect of temperature on stigmatic receptivity in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Plant, Cell and Environment*, 26: 1673–1680.
- Hedhly A., Hormaza J.I., Herrero M. (2004): Effect of temperature on pollen tube kinetics and dynamics in sweet cherry, *Prunus avium* (*Rosaceae*). *American Journal of Botany*, 91: 558–564.
- Herrero M., Arbeloa A., Gascon M. (1988): Pollen pistil interaction in the ovary in fruit trees. In: 'Sexual Reproduction in Higher Plants', Cresti M., Gori P., Pacini E. (eds.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York, Tokyo, pp. 297–302.
- Linskens H.F. (1988): Present status and future prospects of sexual reproduction research in higher plants. In: 'Sexual Reproduction in Higher Plants', Cresti M., Gori P. and Pacini E. (eds.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York, Tokyo, pp. 451–457.
- Piementa E., Polito V.S. (1983): Embryo sac development in almond [*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb] as affected by cross-self- and non-pollination. *Annals of Botany*, 51: 469–479.
- Postweiler K.R., Stösser R., Anvary S.F. (1985): The effect of different temperatures on the viability of ovules in cherries. *Scientia Horticulturae*, 25: 235–239.
- Radičević S. (2013): Biologija oplodjenja i pomološke osobine novointrokovanih sorti trešnje (*Prunus avium* L.). Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Zemun, 1–117.
- Radičević S., Cerović R., Nikolić M. (2000): Biološko-pomološke osobine novijih sorti trešanja. *Jugoslovensko voćarstvo*, 34, 131/132: 153–160.
- Radičević S., Cerović M., Đorđević M. (2012): Ispitivanje korelacionih veza nekih parametara biologije cvetanja sorti trešnje (*Prunus avium* L.). *Voćarstvo*, 46, 179/180: 121–128.
- Socias i Company R., Kester D.E., Bradley M.V. (1976): Effects of temperature and genotype on pollen tube growth in some self-incompatible and self-compatible almond cultivars. *Journal of American Society for Horticulture Science*, 101: 490–493.
- Stösser R., Anvary S.F. (1982): On the senescence of ovules in cherries. *Scientia Horticulturae*, 16: 29–38.
- Vasilakakis M.D., Porlingis I.C. (1984): Self compatibility in 'Tru-oito' almond and the effect of temperatures on selfed and crossed pollen tube growth. *Horticultural Science*, 19: 659–661.

**FUNCTIONALITY OF EMBRYO SACS AS RELATED TO THEIR VITALITY AND FERTILIZATION SUCCESS IN ‘ASENOVA RANA’ SWEET CHERRY****Radosav Cerović<sup>1</sup>, Sanja Radičević<sup>2</sup>, Đurđina Ružić<sup>2</sup>, Milena Đorđević<sup>2</sup>, Tatjana Vujović<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Innovation centreat Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade, Karnegijeva 4, 11120 Belgrade, Republic of Serbia*

*E-mail: radosavcerovic@gmail.com*

<sup>2</sup>*Fruit Research Institute, Kralja Petra I/9, 32000 Čačak, Republic of Serbia*

**Abstract**

Functionality of embryo sacs in ‘Asenova Rana’ sweet cherry was examined in relation to their vitality and fertilization success rate, in the field conditions, during the period of full bloom conclusive with 21<sup>st</sup> day. The research was performed over a period of two years. The number of functional embryo sacs (8-, 5- and 4-nucleate) was insignificantly higher in the first year. As regards the number of the embryo sacs with the embryo, approximately the same values in both years were recorded, and reached the maximum between 10<sup>th</sup> and 14<sup>th</sup> day from the beginning of full-bloom phenophase. The air temperature conditions during

the ten days after the beginning of full bloom were with no significant fluctuations, and made no impact neither on the embryo sacs longevity, nor on the number of the embryo sacs with the embryo, in the open pollination condition. Functionality of embryo sacs, i.e. their vitality, was in a reverse proportion to the number of the embryo sacs with the embryo, i.e. fertilization success.

**Key words:** sweet cherry, embryo sac, vitality, embryo, fertilization