Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, vol. 19, 4, 2016, (183-198)
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan

Биофизични коефициенти за изчисляване евапотранспирацията на лозово вкоренилище

Емил Цветанов[1*], Куман Куманов[2]

[1]Институт по лозарство и винарство, 5800 Плевен, България
[2] Институт по овощарство, 4004 Пловдив, България

[*]E-mail: estzvetanov@gmail.com

Biophysical coefficients for evaluation of grapevine nursery evapotranspiration

Emil Tsvetanov[1*], Kouman Koumanov[2]

[1]Institute of Viticulture and Enology, 5800 Pleven, Bulgaria
[2]Fruit-Growing Institute, 4004 Plovdiv, Bulgaria

РЕЗЮМЕ

Неотменима част от технологията за производство на лозов посадъчен материал е напояването. Научната информация относно управлението на поливния процес в лозовото вкоренилище обаче е крайно недостатъчна, особено за условията на широко разпространеното днес микронапояване. С цел подобряване на поливния режим на лозовото вкоренилище, в района на гр. Плевен, България, е проведено изследване за определяне стойностите на биофизични коефициенти K (Z, R, K_P и K_C), участващи в емпирични формули за изчисляване евапотранспирацията (ET_C) от метеорологични фактори (Ф) от вида $ET_C = K \times \Phi$. Опитите са изведени във вкоренилището за производство на лозов посадъчен материал на експерименталната база на Института по лозарство и винарство-Плевен, през периода 2007-2014 г. Напояването е капково, като през първата половина на вегетационния период са извършвани и освежителни поливки чрез микродъждуване.

SUMMARY

Irrigation is indispensable part of the technology for production of grapevine planting material. However, there is lack of scientific information concerning irrigation management in the vine nursery, especially under the widely used nowadays microirrigation.

For improving the vine-nursery irrigation regime, a field trial was set in the region of Pleven, Bulgaria. Subject of investigation were the values of biophysical coefficients K (Z, R, K_P and K_C), part of empirical formulas of the type $ET_C = K \times \Phi$ for calculating the crop evapotranspiration (ET_C) from meteorological factors (Ф).

The study was carried out in the grapevine nursery of the Institute of Viticulture and Enology - Pleven, in the period 2007-2014.

The nursery was drip-irrigated combined with cooling microsprinkler applications during the first half of the vegetation period. The variation in the estimated

Установено е вариране в стойностите на определените биофизични коефициенти Z, K_P и K_C от един и същ порядък (CV_{CP} ≈ 0.30). По-голямо е варирането при стойностите на R (CV_{CP} ≈ 0.54), вероятно в следствие на освежителните поливки. Установено е, че освежителните поливки увеличават варирането в стойностите и на останалите биофизични коефициенти. Изборът на една от първите три формули за изчисляване на ET_C (Z, K_P и K_C) зависи най-вече от наличните метеорологични данни.

Ключови думи: биофизични коефициенти, евапотранспирация, поливен режим, присадени калеми, лозово вкоренилище

values of the biophysical coefficients Z, K_P and K_C was of the same order (CV_{AV} ≈ 0.30). The variation of the R values was greater (CV_{SR} ≈ 0.54), probably due to the cooling applications.

It was found that the cooling applications increased the variation in the values of the other biophysical coefficients as well. Choosing one of the first three formulas (using Z, K_P and K_C) for ET_C calculation should be based mainly on the available meteorological data.

Key words: biophysical coefficients, evapotranspiration**,** irrigation regime, grafted cuttings, vine nursery

УВОД

Напояването на лозовите вкоренилища, като част от технологията за производство на лозов посадъчен материал, оказва съществено влияние върху добива от присадени вкоренени лози и тяхното качество. Според Малтабар (1971) лозовите вкоренилища е задължително да бъдат напоявани. Поливният режим и методите за напояване са предмет на изследвания с цел подобряване водния режим на присадените лозички във вкоренилището и получаване на висок процент първокласен лозов посадъчен материал (Магрисо и др., 1965; Магрисо и др., 1968). Планирането и управлението на поливния процес зависят от правилното определяне нуждите на лозовото вкоренилище от вода, т.е. евапотранспирацията на културата (ET_C). За

INTRODUCTION

The irrigation regime of vine nurseries, as part of the technology for production of grapevine planting material, significantly affects the yield and the quality of the grafted vines.

According to Maltabar (1971) the irrigation of grapevine nurseries is obligatory. The irrigation regime and the irrigation methods have been studied in order to improve the water regime of the grafted vines in the nursery and to obtain higher percentage of first-class grapevine planting material (Magriso et al., 1965; Magriso et al., 1968). The planning and the management of irrigation process depend on the proper estimation of the vine nursery water use, i.e. the crop evapotranspiration (ET_C).

There are numerous empirical

изчисляване на ET_C са разработени множество емпирични формули, включващи различни характеристики на културата и околната среда.

Най-простата и все още широко разпространена в България формула обвързва евапотранспирацията на културата (ET_C) с един метеорологичен фактор (Ф) (Давидов и Гайдарова, 1983; Sharma, 1985) и има следния вид:

formulas developed for ET_C calculation on the basis of various characteristics of the crop and the environment.

The simplest and yet widespread in Bulgaria equation correlates the crop evapotranspiration (ET_C) with a single meteorological factor (Ф) (Davidov and Gaydarova, 1983; Sharma, 1985) as it follows:

$$ET_C = K \times \Phi$$

където K е биофизичен коефициент, който се определя опитно за конкретни периоди от вегетацията на културата ($K = ET_C:\Phi$). Ф може да бъде сумата от среднодневните температури (°C) за периода ($K \rightarrow Z$); сума от среднодневния дефицит на налягането на водните пари (HPa) за периода ($K \rightarrow R$); изпарението (mm) от свободна водна повърхност ($K \rightarrow K_P$); или еталонната евапотранспирация (mm) ($K \rightarrow K_C$).

Целта на представеното в настоящата статия изследване е да се определят биофизичните коефициенти Z, R, K_P и K_C на лозово вкоренилище за района на гр. Плевен, България.

where K is a biophysical coefficient, which is experimentally estimated for specific intervals of the crop vegetation period ($K = ET_C:F$). Ф can be the sum of the average daily temperatures (°C) for the interval ($K \rightarrow Z$); sum of the average daily water-vapor pressure deficit (HPa) for the interval ($K \rightarrow R$); evaporation (mm) from free water surface ($K \rightarrow K_P$); or reference evapotranspiration (mm) ($K \rightarrow K_C$).

The objective of the presented in this paper research was to estimate the biophysical coefficients Z, R, K_P and K_C of grapevine nursery for the region of Pleven, Bulgaria.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Изследването е проведено в периода 2007-2014 г. във вкоренилището за производство на лозов посадъчен материал на експерименталната база на

MATERIAL AND METHODS

The study was carried out in the grapevine nursery of the Institute of Viticulture and Enology-Pleven, in the period 2007-2014.

Института по лозарство и винарство-Плевен. В представените резултати не са включени данни от 2013 г. поради компрометиране на реколтата в следствие на причини, които са извън контролираните в този експеримент фактори. Опитът е заложен със сорт Мискет кайлъшки, присаден на подложката Берландиери х Рипария СО4 с последващо двукратно парафиниране. Присадените резници са засадени в лехи от по два реда на дълбочина 15 cm при разстояния на засаждане 7-8 cm между резниците и 50 cm между редовете в лехата. Разстоянието между лехите е 2 m. Присадените резници са снабдявани с вода чрез система за капково напояване с по едно поливно крило на леха, разположено между двата реда лозички. Поливните крила са с вградени през 15 cm капкообразуватели с дебит 1.0 L h^{-1}. Обемът на подаваната поливна вода е контролиран с водомер, монтиран в началото на системата. През първата половина на вегетационния период са извършвани освежителни поливки два или три пъти на ден, съответно преди обяд, на обяд и в следобедните часове, които са с размер 1-2 mm. За целта са използвани микродъждовални апарати „Water Bird VI Clasic" (TORO) с дебит 156 L h^{-1} при 0.2 MPa налягане и радиус на действие 5 m. Използвана е квадратна схема на разполагане с

The 2013 data were ignored because of crop compromising due to reasons beyond the factors controlled in this study.

The trial was set with the Muscat Kailashki variety grafted on Berlandiery x Riparia SO4 rootstock with subsequent double wax sealing. The grafted cuttings were planted in two-row raised beds at depth of 15 cm and planting distances of 7-8 cm between the cuttings and 50 cm between the rows. The distance between the beds was 2.0 m.

The grafted cuttings were supplied with water by a drip irrigation system with one lateral per bed, located between the two rows of grapevines. The laterals had built-in drippers at intervals of 15 cm with flow rate of 1.0 L h^{-1}. The volume of the supplied irrigation water was controlled by flow-meter installed at the inlet of the system. During the first half of the vegetation period, cooling microsprinkler application rates of 1-2 mm were realized two or three times per day, respectively in the morning, at lunchtime and in the afternoon. "Water Bird VI Clasic" (TORO) microsprinklers were used for that purpose with flow rate of 156 L h^{-1} and 5 m radius of operation at 0.2 MPa pressure head. A square installation scheme was used with 7 m distance

разстояние между апаратите 7 m, при което поливаната площ от един апарат е 49 m^2, а интензитетът на дъжда е 3.2 mm h^{-1}.

През периода 2007-2008 г. динамиката на почвената влажност е проследявана през времеви интервали от 7-10 дни в почвен слой с дълбочина 60 cm. Пробите са вземани послойно през 10 cm в три повторения и са обработвани по класическия тегловно-термостатен метод. След всяко вземане на почвени проби е реализирана поливка за възстановяване на почвената влажност до пределната полска влагоемност (ППВ). Размерът на поливките е изчисляван по формулата (Джунински, 1980):

$$m = 10H\alpha(\beta_{ППВ} - \beta_{\Phi}), mm$$

където *H* е дълбочината на активния почвен слой (m); α – обемната плътност на почвата (g cm^{-3}); $\beta_{ППВ}$ – е тегловната пределната полска влагоемност на почвата (%) и β_C – фактическа тегловна влажност (%).

В случая на лозово вкоренилище обаче дълбочината на активния почвен слой H нараства с времето. Ето защо в периода 2009-2014 г. размерът на всяка поливка е изчисляван в съответствие с действителната дълбочина на активния почвен слой към конкретния момент. За определянето на H във всеки един момент е използвана емпиричната формула (Tsvetanov and Koumanov, 2011):

between the microsprinklers. Thus, the area irrigated by one microsprinkler was 49 m^2, and the rain intensity was 3.2 mm h^{-1}.

During the period 2007-2008, the soil moisture dynamics was monitored at intervals of 7-10 days to depth of 60 cm.

The samples were taken in triple replicates at 10 cm increments and were processed by the conventional gravimetric method. Water applications were realized after each sampling for recovering the soil moisture to field capacity (FC). The application rate was calculated using the formula (Dzhuninski, 1980):

$$m = 10H\alpha(\beta_{FC} - \beta_C), mm$$

where *H* is the root zone depth (m); α – bulk density of the soil (g cm^{-3}); β_{FC} – was the gravimetric field capacity (%), and β_C – the current gravimetric soil moisture (%).

In the case of vine nursery, however, the depth of the root zone *H* increased over time.

Therefore, in the period 2009-2014 each application rate was calculated in accordance with the current depth of the root zone. The current value of H was calculated using the empirical formula (Tsvetanov and Koumanov, 2011):

$$H = (0.001t^2 + 0.053t + 0.034)sin\,45^{\circ} + a$$

където: H – дълбочина на активния почвен обем (cm); t – време от засаждането на присадените резници във вкоренилището (бр. дни); a – дълбочина на засаждане на резниците в почвата (cm), в конкретния случай a = 15cm; 45° – ъгъл спрямо стъблото, под който растат корените в почвата.

Евапотранспирацията на вкоренилището е установена по метода на водния баланс за дълбочината на активния почвен слой към текущия момент. Воднобалансовите изчисления са извършени по формулата:

$$ET_C = W_{НАЧ} - W_{КР} + \sum_{i=1}^{n} m_i + M_B$$

където ET_C – евапотранспирация на вкоренилището (mm); $W_{нач.}$ – воден запас в активния почвен слой с дълбочина H cm в началото на периода, за който се изчислява ET_C (mm); $W_{кр.}$ – воден запас в активния почвен слой с дълбочина H (cm) в края на периода, за който се изчислява ET_C (mm); $\sum_{i=1}^{n} m_i$ – сума от поливните норми, подадени през периода за навлажняване до ППВ на активния почвен слой (H cm) (mm); i – номер на поредната поливка; m – поливна норма (mm); M_B – оползотворената част от падналите през периода валежи (mm), изчислена по Куманов (1995).

where: *H* – depth of the root zone (cm); *t* – time from planting the grafted cuttings in the nursery (number of days); *a* – planting depth of the cuttings in soil (cm), in this case *a* = 15cm; 45° – the angle at which the roots grow, measured towards the stalk.

The evapotranspiration of the nursery was established by the water balance method for the current depth of the root zone using the formula:

$$ET_C = W_{INI} - W_{END} + \sum_{i=1}^{n} m_i + M_R$$

where ET_C – evapotranspiration of the nursery (mm); W_{INI} – water storage in the root zone of depth *H* at the beginning of the interval for which ET_C was calculated; W_{END} – water storage in the root zone of depth *H* at the end of the interval for which ET_C was calculated; $\sum_{i=1}^{n} m_i$ – sum of the application rates for the interval, wetting the root zone to field capacity (mm); *i* – number of the current application rate; *m* – application rate (mm); M_R – the used portion of rainfalls for the interval (mm), calculated according to Koumanov (1995).

Биофизичните коефициенти Z, ET_C, K_P и R са изчислени по формулата:

$$K = ET_C : Ф$$

като за всеки от коефициентите метеорологичният фактор Ф е съответно:

Z – сумата от среднодневните температури (°C) за периода;

ET_C – еталонната евапотранспирация ET_0 (mm) изчислена по формулата на Blaney and Criddle (1962):

$$ET_0 = p(0.46 + 8.13)$$

където T – средната температура за периода (°C), p – отношението на сумата от дневните часове за периода към общата сума на дневните часове в една година (%);

K_P – изпарението от свободна водна повърхност (mm);

R – сума от среднодневния дефицит на налягането на водните пари за периода (HPa).

По отношение на климатичната си характеристика през поливния период (май-август) годините на изследването покриват широк спектър от изключително влажна до суха и от много хладна до гореща година (Таблица 1), въз основа на което може да се счита, че получените резултати по отношение водопотреблението на присадените резници през поливния период са представителни.

The biophysical coefficients Z, ET_C, K_P and R were calculated using the equation:

$$K = ET_C : Ф$$

as for each of the coefficients the meteorological factor F being respectively:

Z – the sum of average daily temperatures (°C) for the interval;

ET_C – reference evapotranspiration ET_0 (mm) calculated by the formula of Blaney and Criddle (1962):

$$ET_0 = p(0.46T + 8.13)$$

where *T* – the average temperature for the interval (°C), *p* – the ratio of daylight hours for the period to the total sum of daylight hours for a year (%);

K_P – the evaporation from a “Class A” pan (mm);

R – the sum of the average daily water-vapor pressure deficit of for the interval (HPa).

According the climatic characteristic of the experimental years’ irrigation period (May-August), they covered a wide range from extremely wet to dry and from very cool to warm (Table. 1). Therefore, the obtained results regarding the nursery evapotranspiration in the irrigation period were representative.

Таблица 1 Климатична характеристика на годините от 2007 до 2014 според сумата на валежите, средната среднодневна температура и средната максимална температура за периода май-август (поливният период)
Table 1 Climatic characterization of the years 2007-2014 according to the amount of rainfall, the average daily temperature and the average daily maximum temperature for the period from May to August (the irrigation period)

Година Year	Валежи Rainfalls			Температура Temperature					
				Среднодневна Average daily			Максимална Maximum		
	Сума Sum	Обезпеченост Inverse percentile rank	Характерна годината Year character	Средно Average	Обезпеченост Inverse percentile rank	Характерна годината Year character	Средно Average	Обезпеченост Inverse percentile rank	Характерна годината Year character
	mm	%	-	°C	%	-	°C	%	-
2007	206	60	Среден Medium	22.1	20	Средно горещ Medium warm	29.2	17	Средно горещ Medium warm
2008	117	89	Сух Dry	20.2	80	Средно хладен Medium cool	27.3	56	Среден Medium
2009	174	77	Средно сух Medium dry	20.2	84	Хладен Cool	27.4	52	Среден Medium
2010	252	36	Средно влажен Medium humid	21.5	54	Среден Medium	27.1	61	Среден, средно хладен Medium, med. cool
2011	144	81	Средно сух - сух Medium dry - dry	21.9	37	Среден, средно горещ Medium, med. warm	29.7	12	Горещ Warm
2012	189	64	Среден - средно сух Medium - med. dry	21.0	67	Средно хладен Medium cool	27.4	47	Среден Medium
2014	280	19	Средно влажен Medium humid	18.4	97	Много хладен Very cool	25.4	83	Средно хладен - хладен Medium cool - cool

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Средните, средноквадратичните отклонения и коефициентите на вариация на стойностите на изследваните биофизични коефициенти за периода 2007-2014 г. са представени по седмици след засаждането на лозичките в Таблица 2 и онагледени на Фигури 1, 3, 5 и 7.

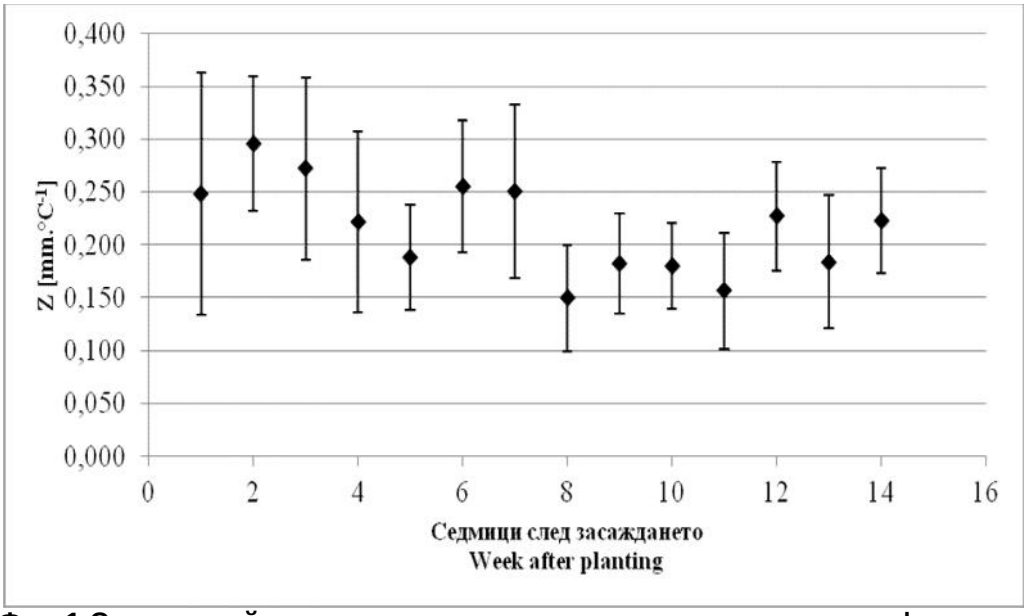
RESULTS AND DISCUSSION

The means, the standard deviations and the variation coefficients of the studied biophysical coefficients for the years 2007-2014 are presented in Table 2 and illustrated on Figures 1, 3, 5 and 7 versus the weeks after planting of the vines.

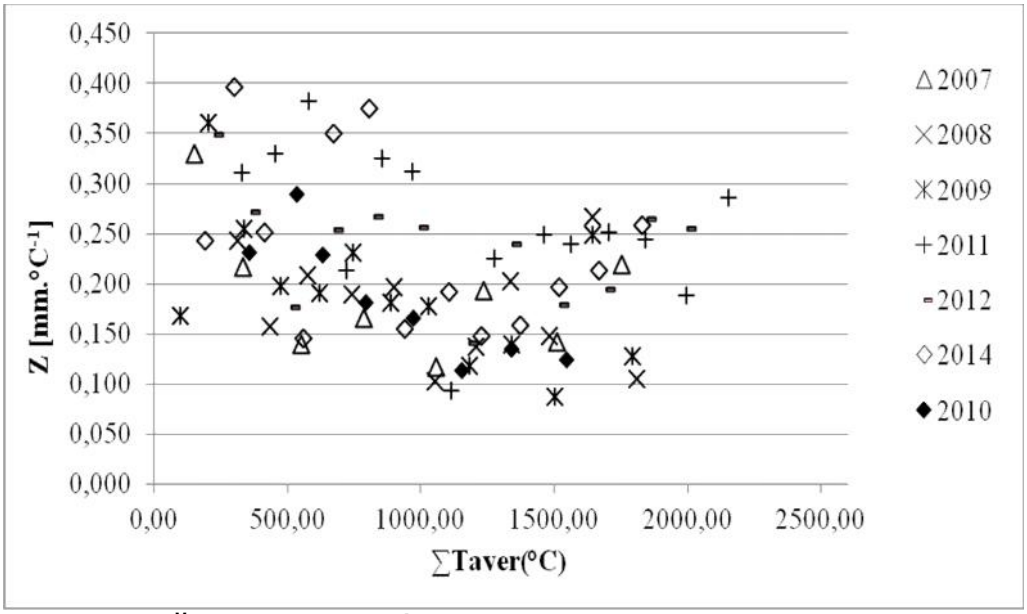
Таблица 2 Средно, средноквадратично отклонение (STDV) и коефициент на вариация (CV) на стойностите на биофизичните коефициенти Z, R, K_P и K_C по седмици след засаждането на лозичките въз основа на данни от периода 2007-2014 г. (2008-2014 г. за K_P).

Table 2. Mean, standard deviation (STDV) and coefficient of variation (CV) of the biophysical factors (Z, R, K_P and K_C) values by weeks after planting the vines for the period 2007-2014 (2008-2014 for K_P).

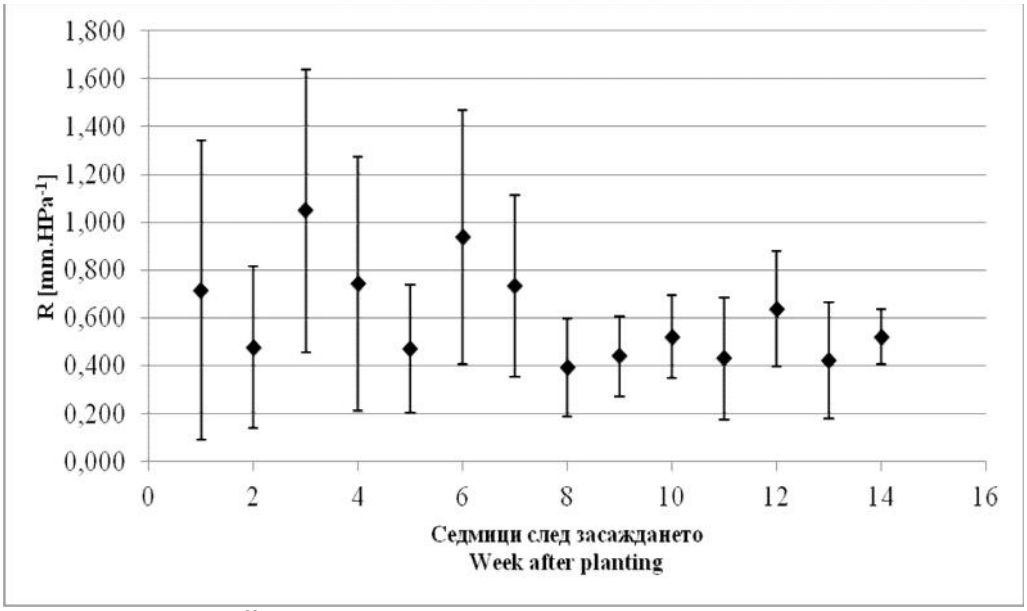
Седмица след засаждане Week after planting	Среднодневна температура Average daily temperature, ºC			Дефицит на налягането на водните пари Water-vapor pressure deficit, HPa			Изпарение от изпарител „Клас А“, Evaporation from “Class A” pan, mm			Еталонна евапотранспирация, Reference evapotransipration, mm		
	Z	STDV	CV	R	STDEV	CV	K_P	STDEV	CV	K_C	STDEV	CV
№	mm ºC^{-1}	mm ºC^{-1}	-	mm HPa^{-1}	mm HPa^{-1}	-	mm mm^{-1}	mm mm^{-1}	-	mm mm^{-1}	mm mm^{-1}	-
1	0,249	0,114	0,46	0,716	0,624	0,87	0,374	-	-	0,830	0,364	0,44
2	0,296	0,063	0,21	0,476	0,339	0,71	0,932	0,368	0,39	0,986	0,180	0,18
3	0,272	0,086	0,32	1,047	0,590	0,56	0,856	0,286	0,33	0,784	0,214	0,27
4	0,222	0,085	0,38	0,744	0,530	0,71	0,739	0,342	0,46	0,712	0,279	0,39
5	0,188	0,050	0,26	0,468	0,268	0,57	0,628	0,214	0,34	0,671	0,176	0,26
6	0,255	0,062	0,24	0,939	0,531	0,56	0,867	0,160	0,18	0,806	0,163	0,20
7	0,250	0,082	0,33	0,734	0,381	0,52	0,804	0,217	0,27	0,791	0,187	0,24
8	0,150	0,050	0,33	0,392	0,205	0,52	0,525	0,234	0,44	0,517	0,180	0,35
9	0,182	0,048	0,26	0,440	0,170	0,39	0,627	0,134	0,21	0,649	0,197	0,30
10	0,180	0,041	0,22	0,522	0,175	0,34	0,677	0,318	0,47	0,670	0,126	0,19
11	0,157	0,055	0,35	0,430	0,256	0,60	0,613	0,183	0,30	0,603	0,223	0,37
12	0,227	0,052	0,23	0,638	0,239	0,37	0,894	0,172	0,19	0,885	0,190	0,22
13	0,184	0,063	0,34	0,423	0,244	0,58	0,767	0,254	0,33	0,658	0,203	0,31
14	0,223	0,050	0,22	0,520	0,114	0,22	0,904	0,035	0,04	0,717	-	-
Средно Average			0,30			0.54			0,31			0,29



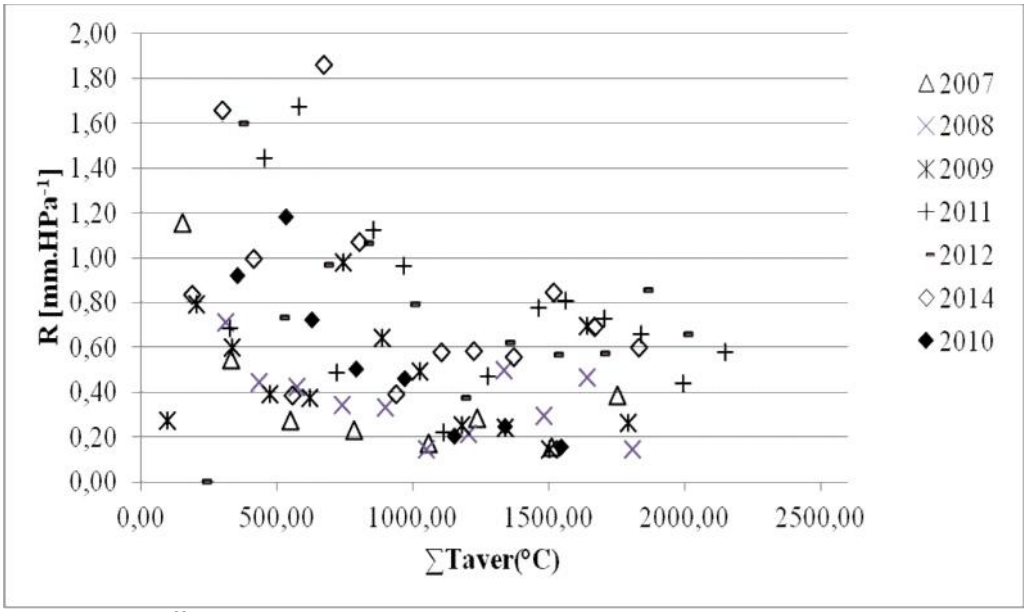
Фиг. 1 Средни стойности и средноквадратични отклонения на коефициента Z за периода 2007-2014 г. по седмици от датата на засаждането на лозичките
Fig. 1 Mean and standard deviation of the Z coefficient by weeks from the date of planting the vines for the period 2007-2014



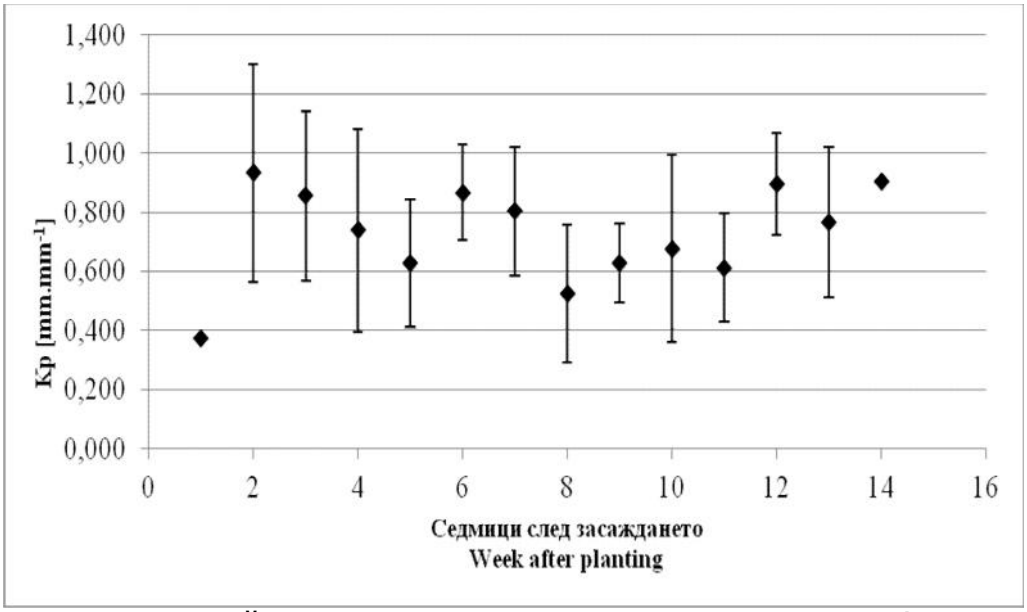
Фиг. 2 Стойности на коефициента Z в зависимост от сумата на среднодневните (активните) температури на въздуха от датата на засаждането на лозичките за периода 2007-2014 г.
Fig. 2 Values of the Z coefficient versus the sum of the average daily (active) air temperatures from the date of planting the vines for the period 2007-2014



Фиг. 3 Средни стойности и средноквадратични отклонения на коефициента R за периода 2007-2014 г. по седмици от датата на засаждането на лозичките
Fig. 3 Mean and standard deviation of the R coefficient by weeks from the date of planting the vines for the period 2007-2014

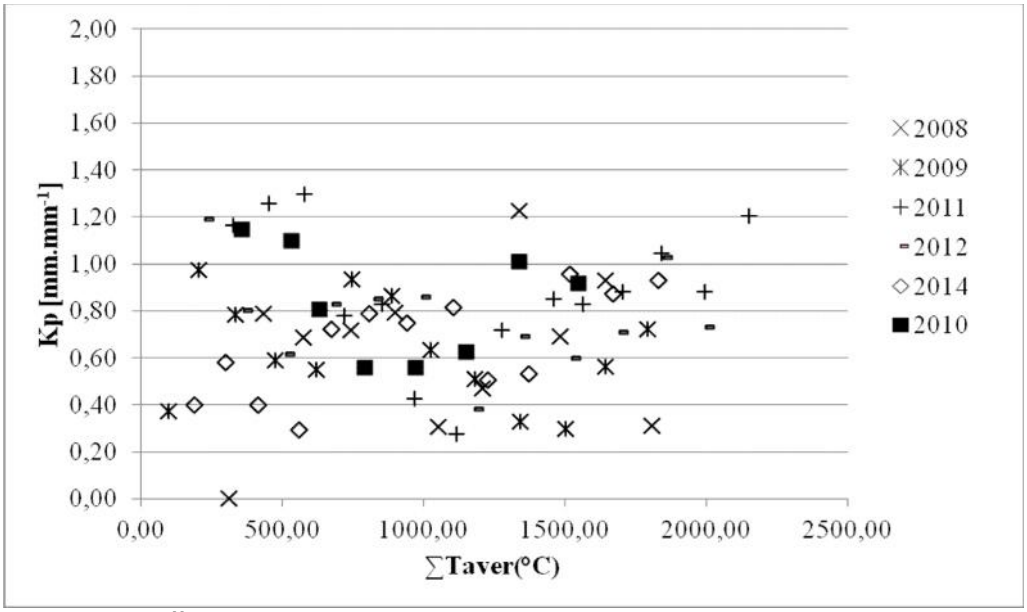


Фиг. 4 Стойности на коефициента R в зависимост от сумата на среднодневните (активните) температури на въздуха от датата на засаждането на лозичките за периода 2007-2014 г.
Fig. 4 Values of the R coefficient versus the sum of the average daily (active) air temperatures from the date of planting the vines for the period 2007-2014



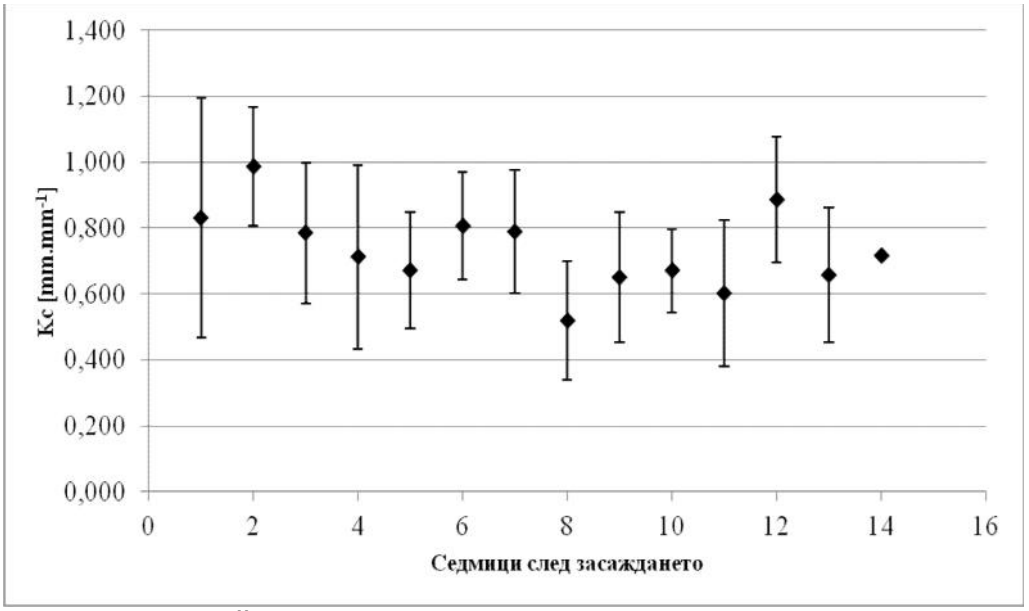
Фиг. 5 Средни стойности и средноквадратични отклонения на коефициента K_P за периода 2008-2014 г. по седмици от датата на засаждането на лозичките

Fig. 5 Mean and standard deviation of the K_P coefficient by weeks from the date of planting the vines for the period 2008-2014

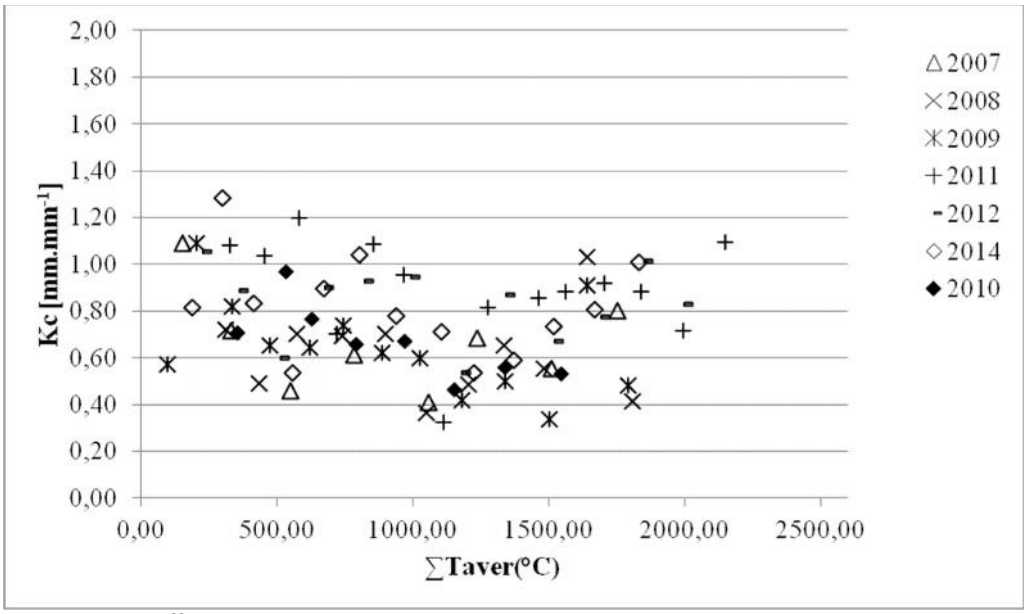


Фиг. 6 Стойности на коефициента K_P в зависимост от сумата на среднодневните (активните) температури на въздуха от датата на засаждането на лозичките за периода 2008-2014 г.

Fig. 6 Values of the K_P coefficient versus the sum of the average daily (active) air temperatures from the date of planting the vines for the period 2008-2014



Фиг. 7 Средни стойности и средноквадратични отклонения на коефициента K_C за периода 2007-2014 г. по седмици от датата на засаждането на лозичките
Fig. 7 Mean and standard deviation of the K_C coefficient by weeks from the date of planting the vines for the period 2007-2014



Фиг. 8 Стойности на коефициента K_C в зависимост от сумата на среднодневните (активните) температури на въздуха от датата на засаждането на лозичките за периода 2007-2014 г.
Fig. 8 Values of the K_C coefficient versus the sum of the average daily (active) air temperatures from the date of planting the vines for the period 2007-2014

По този начин стойностите са удобни за ползване от оперативна гледна точка, доколкото са календарно обвързани. Алтернативен подход е показан на Фигури 2, 4, 6 и 8, където стойностите на биофизичните коефициенти са представени спрямо сумата на среднодневните (активните) температури, доколкото температурата е основен фактор по отношение фенологията на растенията.

При три от четирите изследвани формули точността е практически една и съща като средният за поливния период вариационен коефициент за стойностите на Z, K_P и K_C е от порядъка на 0.29-0.31. По-ниска е точността, когато ET_C се определя въз основа на дефицита на наляганието на водните пари, където CV = 0.54 за стойностите на R. Вероятно това е следствие от влиянието на освежителните поливки, доколкото дъждуването влияе върху микроклимата на вкоренилището и най-силно върху въздушната влажност. В подкрепа на подобно предположение е посилното вариране в стойностите и на другите биофизични коефициенти през първата половина на поливния сезон, т.е. когато са прилагани освежителни поливки.

Получените резултати са в съзвучие с тези, докладвани от Давидов и Мотева (2010) и Koumanov et al. (2010).

Thus the values are calendar related and convenient for operational use. An alternative approach is shown in Figures 2, 4, 6 and 8, wherein the values of the biophysical coefficients are presented versus the sum of the average daily (active) temperatures, as far as the temperature is a major factor regarding plants phenology.

Three of the four studied formulas (for Z, K_P and K_C) showed practically the same accuracy with coefficients of variation, averaged over the whole irrigation period, ranging from 0.29 to 0.31. The accuracy was lower when ET_C was evaluated based on the water-vapor pressure deficit, where CV = 0.54 for the values of R. That was probably due to the cooling microsprinkling applied, because of its capability to affect microclimate in the nursery and in the greatest extent the air humidity.

Such an assumption was also supported by the greater variation in the values of the other biophysical coefficients during the first half of the irrigation season, i.e. when the cooling applications took place.

The obtained results were consistent with those reported by Davidov and Moteva (2010) and Koumanov et al. (2010).

ИЗВОДИ

Установеното вариране в стойностите на определените биофизични коефициенти Z, K_P и K_C е от един и същ порядък ($CV_{CP} \approx 0.30$), т.е. изборът на една от тези три формули за изчисляване на ET_C зависи най-вече от метеорологичните данни, с които се разполага.

По-голямото е варирането при стойностите на R ($CV_{CP} \approx 0.54$), вероятно в следствие на освежителните поливки.

Освежителните поливки увеличават варирането в стойностите и на останалите биофизични коефициенти.

За пълното изясняване на проблема е необходимо изследванията да се разширят и задълбочат като се включи и формулата, препоръчвана от FAO в Irrigation and Drainage Paper 56.

CONCLUSIONS

The estimated variation in the values of the studied biophysical coefficients Z, K_P and K_C was of the same order ($CV_{AV} \approx 0.30$), i.e. choosing one of the first three formulas (using Z, K_P and K_C) for ET_C calculation should be based mainly on the available meteorological data.

The R-values showed greater variation ($CV_{AV} \approx 0.54$), probably due to the cooling applications.

The cooling applications increased the variation in the values of the other biophysical factors as well.

For the full clarification of the problem, further studies should be extended deepened, including also the formula recommended by FAO in Irrigation and Drainage Paper 56.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Давидов Д., Гайдарова С.** Върху точността на формулите за изчисляване на евапотранспирацията. *В помощ на техническия прогрес във водното стопанство*, 1983, №6, 12-22.
2. **Давидов Д., Мотева М**. Сравнение на евапотранспирацията, изчислена по формулата FAO Penman-Monteith и чрез температурата на въздуха. *Селскостопанска техника*, 2010, 1, 102-106
3. **Джунински Б.** Напоителни системи. *Техника, София,* 1980, 465 стр.
4. **Магрисо Ю., Георгиев А.** Сравнително изпитване на дъждуването и гравитачното напояване на вкоренилищата. *Градинарска и*

REFERENCES

1. **Малтабар Л.** Школка привитых саженцев. Производство привитых виноградных саженцев в Молдавии. Кишенев, 1971, 213-240.
2. **Blaney H. and Criddle W.** Determining consumptive use and irrigation water requirements. *USDA Tech. Bull.*, 1962, 1275, ARS, Washington DC.
3. **Davidov D., Gaydarova S.** Referring the Accuracy of Formulas for Evapotranspiration Calculating. *In Support of Technical Progress in aquaculture*, 1983, No. 6, 12-22. (in Bulgarian)
4. **Davidov D., Moteva M.** Comparison of Evapotranspiration Calculated by the Formula FAO Penman-Monteith and by Air Temperature.

лозарска наука, 1968, 1, 43-51.
5. **Магрисо Ю., Лилов Д.** Изследване за установяване на най-благоприятния воден режим на облагородените лозички във вкоренилището. *Градинарска и лозарска наука*, 1965, 3, 361-373.
6. **Малтабар Л.** Школка привитых саженцев. Производство привитых виноградных саженцев в Молдавии. Кишенев, 1971, 213-240.
7. **Цветанов Е., Куманов К.** Подобряване поливния режим на лозово вкоренилище: модел за нарастване на активния почвен обем, *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans*, 2011, vol. 14, 5, 1099-1110.
8. **Blaney H. and Criddle W.** Determining consumptive use and irrigation water requirements. *USDA Tech. Bull.*, 1962, 1275, ARS, Washington DC.
9. **Koumanov K., Moteva M., Kazandjiev V.** Estimation of the evapotranspiration of a peach orchard from meteorological data – easy or complicated? *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans*, 2010, 13(6): 1621-1634.
10. **Sharma M.** Estimating evaporation. In: Hillel D. (Ed.), *Advances in Irrigation*, 1985, 3:213-281.

Selskostopanska technika, 2010, 1, 102-106. (in Bulgarian)
5. **Dzhuninski B.** Irrigation Systems, *Tehnika, Sofia,* 1980, pp. 465. (in Bulgarian)
6. Koumanov K., Moteva M., Kazandjiev V. Estimation of the evapotranspiration of a peach orchard from meteorological data – easy or complicated? *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans*, 2010, 13(6): 1621-1634.
7. **Magriso Y., Georgiev A.** Comparative Study of Sprinkling and Gravity Irrigation of Nurseries. *Gradinarska i Lozarska Nauka*, 1968, 1, 43-51. (in Bulgarian)
8. **Magriso Y., Lilov D.** Study for Determining the Most Favourable Water Regime for the Grafted Vines in the Nursery. *Gradinarska i Lozarska Nauka*, 1965, 3, 361-373. (in Bulgarian)
9. Sharma M. Estimating evaporation. In: Hillel D. (Ed.), *Advances in Irrigation*, 1985, 3:213-281.
10. **Tsvetanov E., Koumanov K.** Grapevine Nursery Irrigation Regime Improvement: Model of Active Soil Volume Increase, *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans*, 2011, vol. 14, 5, 1099-1110.

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, vol. 19, 4, 2016, (199-210)
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan

Влияние на *Grapevine leafroll virus-3* върху растежа и развитието на лозата (*Vitis vinifera* L.), в условия на ин витро култивиране

Николай Генов

Институт по лозарство и винарство, 5800 Плевен, България
E-mail: n_genov@mail.bg

Influence of *Grapevine leafroll associated virus*-3 on the growth and development of the grapevine (*Vitis vinifera* L.) in conditions of *in vitro* cultivation

Nikolay Genov

Institute of Viticulture and Enology, 5800 Pleven, Bulgaria

РЕЗЮМЕ

През 2014/2015 г. в ИЛВ-Плевен е проведено сравнително проучване за определяне влиянието на *Grapevine leafroll virus*-3 върху някои показатели на растежа и развитието на лозата. Наличието на вируса на листното завиване е доказан посредством DAS-ELISA протокол. Направени са биометрични измервания на лозови ин витро растения от сорт Шардоне. Резултатите показват достоверна разлика между средните стойности на показателите: брой корени, брой междувъзлия, дължина летораст, обща дължина на корени, тегло летораст и тегло корени. Установените разлики са в полза на варианта със здрави растения. Въпреки липсата на видими симптоми на болестта в условия на ин витро култивиране, резултатите показват влияние на вируса върху растежа и развитието на лозите от сорт Шардоне.

Ключови думи: лоза, Шардоне, ин витро, GLRaV-3

SUMMARY

In 2014/2015 in IVE-Pleven was conducted a comparative study to determine the impact of Grapevine leafroll virus-3 on some indicators of growth and development of the vine. The presence of GLRaV-3 was proven by DAS-ELISA protocol. Biometric measurements were made of vine *in vitro* plants of variety Chardonnay.

The results showed significant differences between the average values of indicators: number of roots, number of internodes, shoot length, total length of roots, shoot weight and root weight. The differences were in favor of variants with healthy plants. Despite the lack of visible symptoms of the disease in terms of *in vitro* cultivation, the results demonstrate the impact of the virus on the growth and development of the vines of Chardonnay.

Key words: grapevine, Chardonnay, *in vitro*, GLRaV-3

УВОД

Лозата *Vitis* spp. е обект на атака от различни неприятели и патогени в т. ч. пренасящи се с лозовия размножителен и посадъчен материал, като вируси, вирусоподобни и фитоплазми (Martelli, 2014; Naidu et al., 2014). Досега повече от 60 вируси, принадлежащи към почти 30 различни рода са били документирани (Martelli, 2012)

Листното завиване по лозата (GLD) е сред най-широко разпространените и икономически най-вредоносни вирусни болести в много от районите на света (Naidu et al., 2014). GLD се причинява от комплекс от вектор-преносими вирусни видове от семейство *Closteroviridae* (Almeida et al., 2013). Вирусите от това семейство имат нишковидна форма и спираловидно изградени частици, които варират по своята дължина от 650 nm до повече от 2000 nm, а геномът им се състои от едноверижна РНК с размери от 13000 до 19000 нуклеотида (Martelli and Candresse, 2014).

Характерните за болестта симптоми са промяна в оцветяването между главните нерви на листата в червено при червените сортове и в жълто при белите сортове, завиване краищата на листната петура към долната страна.

В България болестта е констатирана през седемдесетте и осемдесетте години на мина-

INTRODUCTION

Grapevine Vitis spp. has been the object of attack by various pests and pathogens, including those transferred with vine propagating and planting material such as viruses, virus-like and phytoplasmas (Martelli, 2014; Naidu et al., 2014). More than 60 viruses belonging to nearly 30 different genera have been reported so far (Martelli, 2012).

Grapevine leafroll disease (GLD) has been among the most widespread and most economically damaging viral diseases in many regions of the world (Naidu et al., 2014). GLD is caused by a complex of vector-carried viral species of *Closteroviridae* family (Almeida et al., 2013).

Viruses belonging to that family are filamentous with helically constructed particles, ranging in length from 650 nm to over 2000 nm, and their genome consists of single-stranded RNA with a size of 13000 to 19000 nucleotides (Martelli and Candresse, 2014).

The typical disease symptoms are the colour change in red between the main veins of the leaves for red varieties and in yellow for white varieties, as well as downward rolling of the leaf blade edges.

In Bulgaria the disease was found in the 70-ies and 80-ies of the last century (Abrasheva, 1991)

лия век (Абрашева, 1991) и е включена в схемата и методиката за санитарна селекция и получаване на свободен от вируси и други патогени сертифициран лозов посадъчен материал (Абрашева и др., 2004; Genov et al., 2009).

Сред комплекса от вируси, причинители на листното завиване по света, най-широко разпространен е *Grapevine leafroll virus*-3 (GLRaV-3), който се открива, както самостоятелно, така и в смесени инфекции с други вируси (Maree et al., 2013). Изследванията на GLRaV-3 през последните години включват производство на антитела и последващо разработване на диагностични анализи; секвенционен анализ на генома; пренасяне и епидемиологични изследвания, потвърждаващи GLRaV-3, като главен причинител на листното завиване по лозата (Maree et al., 2013).

GLRaV-3 може да причини редукция на нетния резултат от листната фотосинтеза, съдържанието на разтворими вещества и продуктивността на лозата (Basso et al., 2010, Endeshaw et al., 2014, Lee et al., 2009 and Mannini et al., 2012).

Проучване на вирусите по лозата в България показва, че от причинителите на листното завиване са представени предимно GLRaV-1 и GLRaV-3, като серотип 3 е най-силно разпространен и често се среща в смесени

and was included in the scheme and methodology for sanitary selection and obtaining certified grapevine propagation material free of viruses and other pathogens (Abrasheva et al., 2004; Genov et al., 2009).

Among the complex of viruses-agents of leafroll around the world, the most widespread was *Grapevine leafroll virus*-3 (GLRaV-3) that could be found both separately and in mixed infections with other viruses (Maree et al., 2013). The studies of GLRaV-3 in recent years have included antibodies producing and the subsequent development of diagnostic assays; sequence analysis of the genome; transferring and epidemiological investigations confirming GLRaV-3 as the main agent of grapevine leafroll (Maree et al., 2013).

GLRaV-3 might cause a reduction in the net result of the leaf photosynthesis, the soluble substances content and grapevine productivity (Basso et al., 2010, Endeshaw et al., 2014, Lee et al., 2009 and Mannini et al., 2012).

An investigation of grapevine viruses in Bulgaria showed that the leafroll agents were primarily presented by GLRaV-1 and GLRaV-3 as serotype 3 was the most common and frequently occurred in mixed infections with

инфекции с GLRaV-1 или други вируси (Genov et al., 2009). Най-много заразени с GLRaV-3 лози са установени при сортовете Дружба, Сторгозия и Рубин, поради изразената толерантност на тези сортове към заболяването.

Развитието на растителните биотехнологии през 80-те години на миналия век и в частност ин витро култивирането на лозата, дават възможност освен за ускорено размножаване на ценни генотипи, но и за изолирано изследване влиянието на различни абиотични и биотични фактори, върху растежа и физиологичните процеси при лозата. Установено е, че заразените с GLRaV-3 ин витро растения не проявяват симптоми на заболяването, въпреки многократно по-високите концентрации на вируса, в сравнение с изходните растения (Христов и Абрашева, 2001; Barba et al., 1989; Christov et al., 2007).

Настоящето изследване имаше за цел да се проучи влиянието на GLRaV-3 върху растежа и развитието на лозови растения от сорт Шардоне, в условия на ин витро култивиране.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

За проучването влиянието на вируса на листното завиване (*Grapevine leafroll virus*-3) върху растежа и развитието на лозата, в ин витро условия, през 2015 година са въведени в култура експланти от болни (*GLRaV-3*) и здрави изходни лози от сорт

GLRaV-1 or other viruses (Genov et al., 2009). The most vines infected with GLRaV-3 were found in Druzhba, Storgozia and Rubin varieties, due to the expressed tolerance of these varieties to the disease.

The development of plant biotechnology in the 1980-ies and in particular of vine *in vitro* cultivation, allowed not only the accelerated reproduction of valuable genotypes, but an isolated study the influence of various abiotic and biotic factors on vine physiological processes and growth. It was found that *in vitro* plants inoculated with GLRaV-3 did not show symptoms of the disease, regardless the much higher concentrations of the virus, compared with the stock plant (Barba et al., 1989; Christov and Abrasheva, 2001; Christov et al., 2007).

The objective of this study was to investigate the influence of GLRaV-3 on the growth and development of *in vitro* cultivated vines from Chardonnay variety.

MATERIAL AND METHODS

Explants of infected (*GLRaV-3*) and healthy stock vines of Chardonnay variety were cultured *in vitro* in 2015 for investigating the effect of *Grapevine leafroll virus-3* on vine growth and development.

Шардоне. Опитните растения баха отглеждани върху MS-среда (Murashige and Skoog, 1962), със състав: 1/2 концентрация на макросолите, пълен състав на микросоли и витамини, 25 $g.L^{-1}$ захароза и 7 $g.L^{-1}$ агар, при температура 26±1°C и фотопериод 16/8 (Христов и Абрашева, 2001).

Здравният статус на изходните растенията и ин витро културите беше определен посредством ELISA тест (Clark and Adams, 1977), с диагностични китове на фирма Agritest® (Италия). Анализите бяха проведени по протоколи на фирмата производител. Растенията бяха тестирани за късовъзлие (*Grapevine fanleaf nepovirus* – GFLV), листно завиване (*Grapevine leafroll associated viruses – GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-5, GLRaV-7)*, мраморност (*Grapevine fleck virus–GFkV*) и набраздяване на дървесината (*Rugose wood – GVA, GVB*).

След микроразмножаване и осем седмично култивиране на растенията, бяха направени биометрични измервания на опитните варианти. Отчетени бяха показателите брой корени и брой междувъзлия, дължина на летораст и обща дължина на корени, тегло на летораст и тегло на корени. Получените биометрични данни са обработени с методите на дескриптивната статистика, а разликите в средните стойности на отделните показатели са доказани с тест на *Стюдънт* (*t*-test).

The experimental plants were cultivated on MS-medium (Murashige and Skoog, 1962), consisting of 1/2 concentration of macronutrients, full composition of micronutrients and vitamins, 25 $g.L^{-1}$ and 7 $g.L^{-1}$ agar at t^{o} 26±1°C and a photoperiod of 16/8 (Christov and Abrasheva, 2001).

The health status of the stock plants and *in vitro* cultures was determined by ELISA test (Clark and Adams, 1977), with diagnostic kits of Agritest® (Italy). The assays were performed in accordance with the protocols of the manufacturer.

The plants were tested for *Grapevine fanleaf nepovirus* - GFLV, *Grapevine leafroll associated viruses – GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-5, GLRaV-7*, *Grapevine fleck virus – GFkV and Rugose wood – GVA, GVB*.

Biometric measurements of the experimental variants were made after eight weeks of micropropagation and cultivation of the plants. The indicators number of roots and number of internodes, length of shoot and total length of roots, mass per shoot and root mass were accounted. The obtained biometric data were processed by the methods of descriptive statistics, while the differences in the mean values of the individual indicators were proven by *Student* test (*t*-test).

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Получените от експланти ин витро растения не развиха характерните за болестта симптоми по време на всичките 45 дневни субкултивирания. Резултатите от диагностиката с ELISA тест потвърди здравния статус на изходните лози. Всички проби бяха отрицателни за изследваните вируси, освен пробите от варианта с *GLRaV*-3, при които бяха отчетени високи стойности на екстинкциите само за този вирус.

RESULTS AND DISCUSSION

The *in vitro* plants obtained from the explants did not develop the typical disease symptoms during all 45-day subcultures. The diagnostic results from the ELISA test confirmed the health status of the stock vines. All samples were negative for the studied viruses, except the samples from the variants with *GLRaV-3*, for which high extinction rates for this virus were reported.

Таблица 1. Средни стойности на основните биометрични показатели по варианти
Table 1. Average values for main biometric data of the variants

Биометрични данни / Biometric data	Средна ± СГ/[mean ±SE]		Значимост Significance	
	GLRaV-3	Control	$LSD_{(p=0.05)}$	
Брой корени / Roots number	2.63 ± 0.13	4.00 ± 0.29	0.65	***
Брой междувъзлия / Internodes number	8.69 ± 0.44	13.05 ± 0.72	1.72	***
Дълж. летораст / Shoot length (mm)	8.54 ± 0.40	14.82 ± 0.85	1.92	***
Обща дължина на корени / Roots total length	15.02 ± 1.36	21.01 ± 2.01	4.95	*
Тегло летораст / Shoot mass (mg)	231.8 ± 15.0	422.4 ± 37.0	0.08	***
Тегло корени / Root mass (mg)	76.1 ± 11.2	177.8 ± 29.5	0.07	**

СГ – стандартна грешка; НДР – най-малка доказана разлика /
SE – standard error of mean; LSD – least significant difference

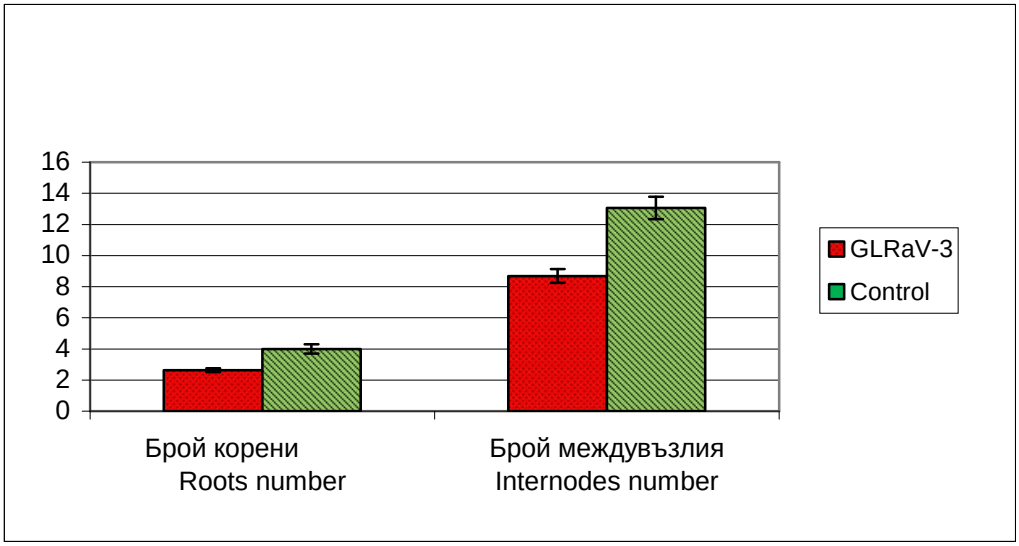
Получените резултати (Таблица 1; Фигура 1) показаха по-ниски средни стойности за брой развити корени (2.63) и за брой междувъзлия (8.69) при варианта с *GLRaV*-3 в сравнение със здравите растения, съответно (4.00 и 13.05). Разликите са много добре осигурени (p=0.001). Еднопосочни са данните (Таблица 1; Фигура 2) и за средните стойности на показателя дължина на

The results for the variant with *GLRaV-3* (Table 1; Figure 1) showed lower average values for the number of developed roots (2.63) and the number of internodes (8.69) compared to the healthy plants, (4.00 and 5.13) respectively. The differences were significant (p=0.001). Similar were the average data (Table 1; Figure 2) for the shoot length between the variants *GLRaV-3* (8.54 mm) and

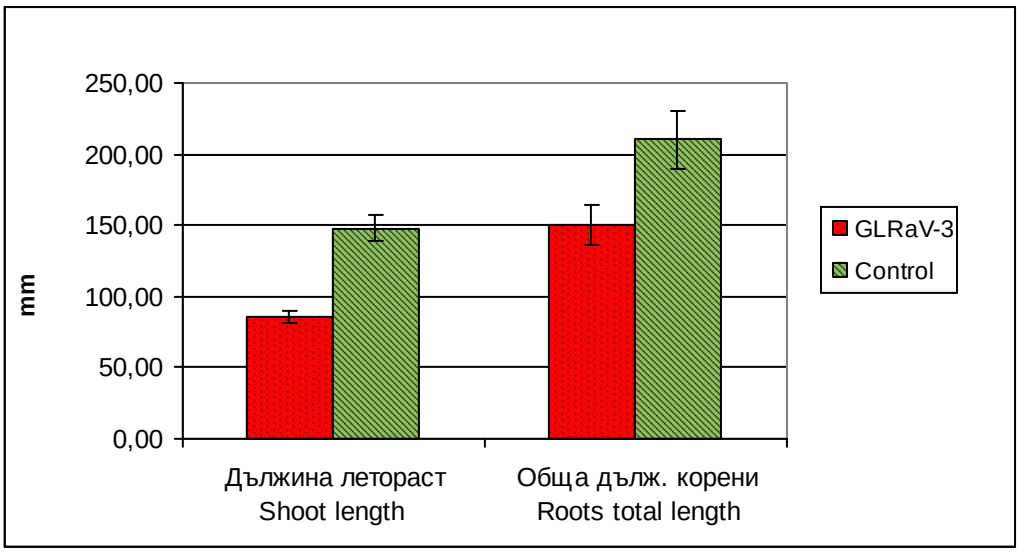
летораста, между вариантите с *GLRaV*-3 (8.54 mm) и здрави растения (14.82 mm), при които разликата също е много добре осигурена (p=0.001). Отчетената обща дължина на корените показа по-високи стойности на здравите контролни растения с добра осигуреност на разликата (p= 0.05). Релевантно на дължината, данните за тегло на летораста и тегло на корените, следват същата тенденция и показват по-малко биомаса при вариантите с *GLRaV*-3 (Фигура 3).

healthy plants (14.82 mm), where the difference was also significant (p=0.001).

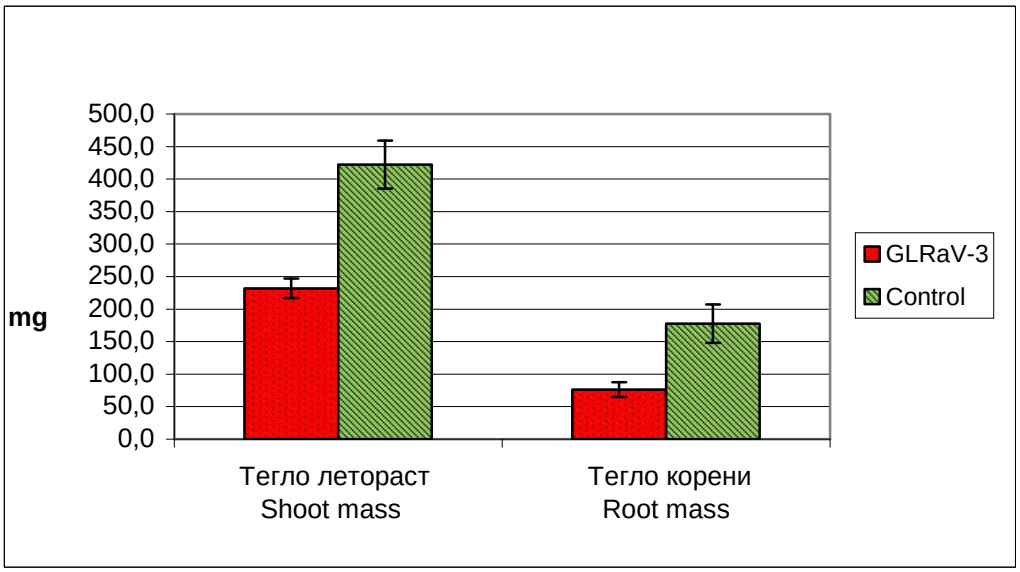
The accounted total length of the roots showed higher rates of the healthy control plants with a good significance of the difference (p = 0.05). Relevant to the length the data on the shoot mass and root mass followed the same trend with less biomass for the variants with GLRaV-3 (Figure 3)



Фиг. 1. Влияние на GLRaV-3 върху броя на корените и междувъзлията
Fig. 1. Influence of GLRaV-3 on the number and the Internodes number



Фиг. 2. Влияние на GLRaV-3 върху дължината на летораста и общата дължина на корените
Fig. 2. Influence of GLRaV-3 on the shoot length and the root total length



Фиг. 3. Влияние на GLRaV-3 върху теглото на летораста корените
Fig. 3. Influence of GLRaV-3 on the shoot mass and the root mass

Установените достоверни разлики в отчетените биометрични параметри между вариантите с вируса на листното завиване и здравите контроли, несъмнено доказват влияние на *GLRaV*-3 върху физиологичните процеси, свързани с тези параметри. Подобно негативно влияние на *GLRaV*-3 върху биосинтезата и в по-малка степен на формообразуването на лозата е установено от Христов и Абрашева (2001) и Christov et al. (2007) при ин витро растения от сорт Каберне Совиньон. Колективът от автори също констатира, че в условия на ин витро култивиране вирусните заболявания не предизвикват видими симптоми по лозовите растения, въпреки по-високите концентрации на вирусни частици в ин витро растенията, в сравнение с изходните лози, което обясняват с хипотезата, че при този тип култивиране се повтарят многократно само началните фази от развитието на пъпките и фазата на проявление на симптоми не може да бъде достигната (Христов и Абрашева, 2001).

The significant differences found in the reported biometric indicators between the variants with grapevine leafroll virus and the healthy controls undoubtedly proved the influence of *GLRaV-3* on the physiological processes associated with these indicators. Similar negative impact of *GLRaV-3* on biosynthesis and to a lesser extent on the vine formation was found by Christov and Abrasheva (2001) and Christov et al. (2007) in *in vitro* plants of Cabernet Sauvignon variety. The authors had also found that in the conditions of *in vitro* cultivation viral diseases did not cause visible symptoms on the vine plants, despite the higher concentrations of viral particles on *in vitro* plants compared to the stock vines, which was explained by the hypothesis that with this type of culturing only the initial phases of the bud development were repeated many times and the phase of the symptoms manifestation could not be reached (Christov and Abrasheva, 2001).

ИЗВОДИ

- Вирусът на листното завиване (*GLRaV*-3) не предизвиква проявление на видими симптоми в култивираните при ин витро условия растения от сорт Шардоне.
- Инфектираните с *GLRaV*-3

CONCLUSIONS

- Grapevine leafroll associated virus (*GLRaV-3*) did not cause visible manifestation of symptoms in plants of Chardonnay variety in conditions of *in vitro* cultivation.
- *GLRaV-3* infected plants of

растения от сорт Шардоне се характеризират с по-малък среден брой корени и междувъзлия, по-малка дължина на летораста и обща дължина на корените, по-малко тегло на летораста и на корените в сравнение със здравите контроли.

- Въпреки липсата на видими симптоми на болестта в условия на ин витро култивиране, *GLRaV*-3 влияе негативно върху физиологичните процеси, свързани с биосинтезата формообразуването на лозата.

Chardonnay variety were characterized by a smaller average number of roots and internodes, shorter shoot length and total root length, less shoot and root mass compared to the healthy controls.

- Despite the lack of visible symptoms of the disease in terms of *in vitro* cultivation, GLRaV-3 had a negative impact on the physiological processes associated with the vine biosynthesis and formation.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Абрашева П.** Проучвания върху някои вирусни и вирусоподобни заболявания по лозата в България и борба с икономически важните от тях. *Докторска дисертация*, 1991, Плевен, 342с.
2. **Абрашева П., Тодорова М., Генов Н.** Методика за получаване и производство на базов и сертифициран лозов материал. *Растениевъдни науки*, 2004, XLI, №2, 128-132.
3. **Христов И., Абрашева П.** Влияние на *Grapevine fanleaf virus* и *Grapevine leafroll associated virus* 3 върху лозата в условия на ин витро култивиране. *Растениевъдни науки*, 2001, 38, 269-274.
4. **Almeida RPP, Daane KM, Bell VA, Blaisdell GK, Cooper ML, Herrbach E, Pietersen G.** Ecology and management of grapevine leafroll disease. *Front. Microbiol.* 2013, 4: 94. doi:10.3389/fmicb.2013.00094
5. **Barba M., Cupidi A., Faggioli F.** In vitro Culture of Grapevine Infected by Closterovirus Type III. *Journal of Phytopathology*, 1989, 126: 225-230.
6. **Basso M.F., Fajardo T.V.M., Eiras M., Ayub R.A., Nickel Detecção O.** Le identificação molecular de vírus

REFERENCES

1. **Abracheva P.** Studies of some virus and virus-like diseases of grapevine in Bulgaria and control of economically important of them. *Doctoral Dissertation*, 1991, Pleven, 342. (in Bulgarian)
2. **Abracheva P., Todorova M., Genov N.** Methods for obtaining and production of basic and certified grapevine material. *Rastenievadni Nauki* (*Plant Science*), 2004, XLI, 2 128-132. (in Bulgarian)
3. **Almeida RPP, Daane KM, Bell VA, Blaisdell GK, Cooper ML, Herrbach E, Pietersen G.** Ecology and management of grapevine leafroll disease. *Front. Microbiol,* 2013, 4: 94. doi:10.3389/fmicb.2013.00094
4. **Barba M., Cupidi A., Faggioli F.** In vitro Culture of Grapevine Infected by Closterovirus Type III. *Journal of Phytopathology*. 1989, 126: 225-230.
5. **Basso M.F., Fajardo T.V.M., Eiras M., Ayub R.A., Nickel Detecção O.** Le identificação molecular de vírus associados a videiras sintomáticas e assintomáticas. *Ciencia Rural*, 2010, 40, pp. 2249-2255.
6. **Christov I., Abrasheva P.** Effect of grapevine fanleaf virus and grapevine leafroll associated virus 3 on vine plants

associados a videiras sintomáticas e assintomáticas. *Ciencia Rural,* 2010, 40, pp. 2249-2255.

7. **Christov I, Stefanov D, Goltsev V, Abracheva P.** Effects of grapevine fanleaf and stem pitting viruses on the photosynthetic activity of grapevine plants grown in vitro. *Russ J Plant Physiol,* 2001, 48:473-477.

8. **Christov I., Stefanov D., Velinov T., Goltsev V., Georgieva K., Abracheva P., Genova Y., Christov N.** The symptomless leaf infection with grapevine leafroll associated virus 3 in grown in vitro plants as a simple model system for investigation of viral effects on photosynthesis. *Journal of Plant Physiology*, 2007, 164 (9), pp. 1124-1133.

9. **Clark M.F., Adams A.N.** Characteristics of the microplate method of ELISA for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.,* 1977, 34, 475-483.

10. **Endeshaw S.T., Sabbatini P., Romanazzi G., Annemiek C., Schilder A.C., Neri D.** Effects of grapevine leafroll associated virus 3 infection on growth, leaf gas exchange, yield and basic fruit chemistry of Vitis vinifera L. cv. Cabernet Franc, *Scientia Horticulturae*, 2014, 170, pp. 228-236.

11. **Genov N., Lubenova Ts., Todorova M., Nakov Z.** Sanitary selection and investigations for obtaining and maintenance of grapevine certified propagating material in Bulgaria. *Acta horticulturae et regiotecturae,* 2009, 12, 127-129.

12. **Lee J., Keller K.E., Rennaker C., Martin R.R.** Influence of grapevine leafroll associated viruses (GLRaV-2 and -3) on the fruit composition of Oregon Vitis vinifera L. cv. Pinot noir: Free amino acids, sugars, and organic acids. *Food Chemistry,* 2009, 117, pp. 99-105.

13. **Mannini F., Mollo A., Credi R.** Field performance and wine quality modification in a clone of Vitis vinifera cv. Dolcetto after GLRaV-3 elimination *American Journal of Enology and Viticulture,* 2012, 63, 144-147.

under conditions of in vitro cultivation. *Rastenievadni Nauki* (*Plant Science*), 2001, Bulgaria, 38, 269-274. (in Bulgarian)

7. **Christov I, Stefanov D, Goltsev V, Abracheva P.** Effects of grapevine fanleaf and stem pitting viruses on the photosynthetic activity of grapevine plants grown in vitro. *Russ J Plant Physiol,* 2001, 48:473-7.

8. **Christov I., Stefanov D., Velinov T., Goltsev V., Georgieva K., Abracheva P., Genova Y., Christov N.** The symptomless leaf infection with grapevine leafroll associated virus 3 in grown in vitro plants as a simple model system for investigation of viral effects on photosynthesis. *Journal of Plant Physiology*, 2007, 164 (9), pp. 1124-1133.

9. **Clark M.F., Adams A.N.** Characteristics of the microplate method of ELISA for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.,* 1977, 34, 475-483.

10. **Endeshaw S.T., Sabbatini P., Romanazzi G., Annemiek C., Schilder A.C., Neri D.** Effects of grapevine leafroll associated virus 3 infection on growth, leaf gas exchange, yield and basic fruit chemistry of Vitis vinifera L. cv. Cabernet Franc, *Scientia Horticulturae*, 2014, 170, pp. 228-236.

11. **Genov N., Lubenova Ts., Todorova M., Nakov Z.** Sanitary selection and investigations for obtaining and maintenance of grapevine certified propagating material in Bulgaria. *Acta horticulturae et regiotecturae,* 2009, 12, 127-129.

12. **Lee J., Keller K.E., Rennaker C., Martin R.R.** Influence of grapevine leafroll associated viruses (GLRaV-2 and -3) on the fruit composition of Oregon Vitis vinifera L. cv. Pinot noir: Free amino acids, sugars, and organic acids. *Food Chemistry,* 2009, 117, pp. 99-105.

13. **Mannini F., Mollo A., Credi R.** Field performance and wine quality modification in a clone of Vitis vinifera cv. Dolcetto after GLRaV-3 elimination *American Journal of Enology and*

14. **Maree H. J., Almeida R. P. P., Bester R., Chooi K. M., Cohen D., Dolja V. V., Burger J. T.** Grapevine leafroll-associated virus 3. *Frontiers in Microbiology,* 2013, 4, 82. http://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00082
15. **Martelli G. P.** Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents. *J. Plant Pathol.* 2014, 96 (suppl. 1):1-136.
16. **Martelli G. P.** Grape virology highlights: 2010-2012. Pages 13-31 *in: Proc. 17th Congr. Int. Counc. Study Virus Virus-like Dis. Grapevine (ICVG),* 2012, Davis, California, USA.
17. **Martelli G. P. and Candresse T.** Closteroviridae. *eLS*, 2014.
18. Murashige, T. and Skoog, F., A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. Physiologia Plantarum, 1962, 15: 473-497.
19. **Naidu R., Rowhani A., Fuchs M., Golino D., Martelli G.P.** Grapevine Leafroll: A Complex Viral Disease Affecting a High-Value Fruit Crop. *Plant Disease*, 2014, 98:9, 1172-1185.

Viticulture, 2012, 63, 144-147.
14. **Maree H. J., Almeida R. P. P., Bester R., Chooi K. M., Cohen D., Dolja V. V., Burger J. T.** Grapevine leafroll-associated virus 3. *Frontiers in Microbiology,* 2013, 4, 82. http://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00082
15. **Martelli G. P.** Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents. *J. Plant Pathol.*, 2014, 96 (suppl. 1):1-136.
16. **Martelli G. P.** Grape virology highlights: 2010-2012. Pages 13-31 *in: Proc. 17th Congr. Int. Counc. Study Virus Virus-like Dis. Grapevine (ICVG),* 2012, Davis, California, USA.
17. **Martelli G. P. and Candresse T.** Closteroviridae. *eLS*, 2014.
18. Murashige, T. and Skoog, F., A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. Physiologia Plantarum, 1962, 15: 473-497.
19. **Naidu R., Rowhani A., Fuchs M., Golino D., Martelli G.P.** Grapevine Leafroll: A Complex Viral Disease Affecting a High-Value Fruit Crop. *Plant Disease*, 2014, 98:9, 1172-1185.