Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, vol. 19, 1, 2016, (227-245)
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan

Растежни прояви при тагетес (*Tagetes Patula* L.) в условия на почвено замърсяване с Cd, Al и Zn

Деница И. Милушева*, Елена Т. Якимова**, Бистра Я. Атанасова

Институт по декоративни растения, 1222, Негован, София, България

**Представящ автор E-mail: d.i.milusheva@abv.bg*
***Кореспондиращ автор E-mail: elena_iakimova@abv.bg*

Growth performance of marigold (*Tagetes Patula* L.) at conditions of soil contamination with Cd, Al and Zn

Denitza I. Milusheva*, Elena T. Iakimova**, Bistra Y. Atanassova

Institute of ornamental plants, 1222, Negovan, Sofia, Bulgaria

**Presenting author E-mail: d.i.milusheva@abv.bg*
***Corresponding author E-mail: elena_iakimova@abv.bg*

РЕЗЮМЕ

Отглеждането на растителни култури за храна, върху почви замърсени с тежки метали, създава сериозен риск за здравето на хората и животните. Декоративните растения могат да бъдат добра алтернатива за замърсените райони. Тагетесът е атрактивен вид, подходящ за отглеждане на открити площи. Целта на проучването е да се установи влиянието на тежките метали Cd, Al и Zn върху растежа и развитието на тагетеса (*Tagetes patula* L.). Растенията (сорт 'Janie Primrose') бяха отгледани в съдове, при оранжерийни условия. Металите бяха внесени в почвения субстрат под формата на солеви разтвори в крайни концентрации, съответстващи на пределно допустимата концентрация (ПДК) за страната, по-ниски и по-високи от нея. Отчитани бяха височината и ширината на растенията, и дължината и диаметъра на корените. Установено беше, че при замърсяване с всички изпитани концентрации на Cd и Al, и при нива на Zn до ПДК (pH на почвата 6.2), размерите на растенията не се

SUMMARY

Cultivation of food crops on soils contaminated with heavy metals may cause a serious risk for human and animal health. The ornamental plants can be a good alternative for polluted areas.

Marigold is an attractive flower species, appropriate for growing in open fields. The aim of this study was to determine the influence of heavy metals Cd, Al and Zn on growth and development of marigold (*Tagetes patula* L.). The plants (cv. 'Janie Primrose') were grown in containers at greenhouse conditions. The metals were introduced into the soil in the form of salt solutions at final concentrations corresponding to maximum permissible concentration (MPC) for the country, lower and higher than it.

Height and width of the plants and root length and diameter were measured. It was established that at soil substrates contaminated with any of the tested Cd and Al concentrations (soil pH 6.2) and with Zn at levels below and at MPC, plant height and width were not affected, in повлияват значително. Стимулиране на растежа беше наблюдавано във фазата на вегетация, при дози на металите до ПДК. Не бяха забелязани отклонения при настъпването и продължителността на фазите бутонизация и цъфтеж. При третиране с концентрации на Zn превишаващи ПДК, растенията загинаха във фаза на цъфтеж. При всички дози на Cd, Al и Zn бяха наблюдавани изменения в кореновата система. Те се проявиха като силно скъсяване на централния корен и растеж на удължени странични корени. Получените резултати показват, че изследваният сорт тагетес е толерантен към високи нива на замърсяване с Cd и Al, но е силно чувствителен към концентрации на Zn над ПДК.

Ключови думи: тагетес, тежки метали, кадмий, алуминий, цинк

comparison to controls grown on non-contaminated substrate.

Variations in the timing of bud formation and flowering were not noticed. Plants treated with Zn exceeding MPC died in the stage of flowering.

At all concentrations of Cd, Al and Zn, changes of root system were observed. They appeared as reduction of the length of the central root and enhanced growth of elongated lateral roots.

The obtained results suggested that, at applied cultivation conditions, the investigated marigold cultivar is tolerant to high levels of Al and Cd, but is highly sensitive to Zn exceeding MPC.

Key words: Marigold, heavy metals, cadmium, aluminum, zinc

УВОД

Замърсяването на почвите с тежки метали е един от съвременните проблеми на околната среда, дължащ се на урбанизацията. Замърсените райони са предимно в близост до магистрали, мини, предприятия за преработка на течни горива и др.

Натрупването на тежки метали в почвите е опасно за земеделското производство, поради неблагоприятното въздействие върху качеството на културите, живота на почвените микроорганизми и безопасността на храните за здравето на хората и животните. Някои тежки метали като Cu, Zn, Fe, Mn, Mo, Ni and Co във физиологични концентрации изпълняват важни функции в растението като микроелементи и ензимни кофактори, но при

INTRODUCTION

Soil pollution with heavy metals is one of nowadays environmental problems related to urbanization. In most cases the contaminated areas are in vicinity to industrial sites, highways, mines, fuel processing enterprises and others.

The accumulation of heavy metals in the soils is dangerous for the agricultural production due to unfavorable effects on crop quality and yield, life of the soil microorganisms and on food safety for humans and animals.

In physiological concentrations some heavy metals such as Cu, Zn, Fe, Mn, Mo, Ni and Co play important functions as trace elements and enzyme cofactors, but at elevated levels may cause повишени концентрации могат да доведат до необратими метаболитни нарушения и смърт (Nagajyoti et al., 2010)

Едни от основните замърсители на околната среда, особено в райони със засилена антропогенна дейност са Cd, Zn, Pb, Cr, Hg. Замърсяването с високи дози от тези тежки метали, както и с Ni, Cu, Co, Mn, As и Fe се счита за особено вредно (Nagajyoti et al., 2010).

Замърсените с тежки метали площи в Западна Европа са около 140 000 ha (McGrath, 1998). У нас замърсените почви с тежки метали и металоиди над пределно допустимите концентрации (ПДК) възлизат на 43 660 ha, което представлява 0.7% от земеделските територии на страната. От тях 7 985 ha са замърсени с повече от 5 пъти над ПДК, основно с Pb, Cd, Cu, Zn и As (Dinev et al., 2008).

Високи нива на Zn и Cd в почвата предизвикват сериозни отклонения във физиологичните процеси, нарушения на нормалните метаболитни функции в растенията и водят до фенотипни изменения (Cakmak and Marshner, 1993; Sanita di Toppi and Gabbrielli, 1999). Проучванията са показали, че фитотоксичността на тези два метала се изразява в забавяне на растежа и развитието, нарушаване обмяната на веществата и стимулиране на неблагоприятни процеси, дължащи се на оксидативен

irreversible metabolic disturbances and death of the plant (Nagajyoti et al., 2010).

Cadmium, Zn, Pb, Cr and Hg are the main polluters of the environment, especially in areas with increased human activity. Contamination with high doses of these heavy metals, as well as with Ni, Cu, Co, Mn, As and Fe are considered as particularly harmful (Nagajyoti et al., 2010).

In Western Europe the areas polluted with heavy metals are about 140 000 ha (McGrath, 1998). In Bulgaria the soils contaminated with heavy metals and metalloids exceeding maximum permissible concentrations (MPC) amounted to 43 660 ha, which represents 0.7% of the agricultural territory of the country. About 8000 ha are contaminated with more than 5 times MPC, mainly Pb, Cd, Cu, Zn and As (Dinev et al., 2008).

High levels of Zn and Cd in the soil can cause serious physiological disorders, violations of normal metabolic functions in the plant and may lead to phenotypic changes (Cakmak and Marshner, 1993; Sanita di Toppi and Gabbrielli, 1999).

Studies have shown that the phytotoxicity of these two metals is commonly expressed in retarded growth and development, metabolic disruption and stimulation of adverse processes related to induction of oxidative стрес (Cakmak and Marshner, 1993; Prasad et al., 1999). Има сведения, че високи концентрации на Cd в почвата затрудняват приемането на Ca, Mg, K, P и водата (Das et al., 1997). Излишъкът на Cd води до забавяне и подтискане на растежа и развитието на корените и надземните части на растението, което в редица случаи може да бъде летално (Lux et al., 2001).

В някои замърсени почви са измерени значително високи концентрации на Zn – в диапазон от 150 – 300 $mg.kg^{-1}$ (Warne et al., 2008). Високите нива на Zn подтискат редица метаболитни процеси, водят до забавяне на растежа и причиняват ранно стареене. Цинковата токсичност в растенията ограничава растежа на корените и надземните органи (Choi et al., 1996; Ebbs and Kochian, 1997; Fontes and Cox, 1998) и води до хлороза на по-младите листа, която след продължително излагане на високи нива на Zn може да се разпространи и към по-старите листа (Ebbs and Kochian, 1997).

Характерно за фитотоксичността на Al е, че тя се проявява при кисели почви (с pH под 5.5). Неблагоприятното влияние се отразява предимно на кореновата система, но повреди могат да се появят също по стъблата, листата и цветовете. Установени са значителни генотипно обусловени прояви на толерантност и чувствителност на селскосто-

stress (Cakmak and Marshner, 1993; Prasad et al., 1999). High Cd levels in the soil can prevent the uptake of Ca, Mg, K, P and water (Das et al., 1997).

The excess of Cd inhibits the growth and development of roots and the aerial parts of the plant, which can even be lethal (Lux et al., 2001)

In some contaminated soils significantly high concentrations of Zn (in range from 150 to 300 $mg.kg^{-1}$) have been detected (Warne et al., 2008). High levels of Zn suppress various metabolic processes, negatively affect the growth and stimulate early senescence. Zinc toxicity in plants restricts the growth of roots and above-ground organs (Choi et al., 1996; Ebbs and Kochian, 1997; Fontes and Cox, 1998), and leads to chlorosis of young leaves which, at prolonged exposure to this contaminant may spread toward the older leaves (Ebbs and Kochian, 1997).

Typical for Al phytotoxicity is that it is expressed on plants growing in acidic soils (pH below 5.5). The detrimental influence occurs primarily in the root system, but the damage can affect also the stems, leaves and flowers. Significant genotype related differences in the tolerance and sensitivity of agricultural crops to high Al levels have been панските култури към повишени нива на Al (Berzonsky, 1992; Meriño-Gergichevich et al., 2010). Токсичното въздействие на Al е съпроводено с оксидативен стрес, намаляване на фотосинтетичната активност, негативен ефект върху метаболитните процеси в корените и затруднено поглъщане на вода и хранителни вещества (Meriño-Gergichevich et al., 2010).

Култивирането на растения непредназначени за консумация е един от подходите за решаване на проблема с използването на замърсени територии и да се намали риска в екологичен аспект. Фиторемедиацията, чрез отглеждане на растения способни да натрупват тежки метали и да ги обезвреждат, чрез трансформиране в безвредни за растението съединения е ефективен подход за пречистване на почвите от тежки метали (Salt et al., 1995; McGrath, 1996; Susarla et al., 2002; Nagajyoti et al., 2010).

Декоративните растения могат да бъдат подходящи за озеленяване на замърсени с тежки метали зони, но сведенията за възможността за отглеждане на едногодишни цветни видове върху замърсени почви са незадоволителни. Информацията за ефекта на тежките метали върху жизнения цикъл на цветята и за толерантността на тези растения към повишени нива на замърсяване е ограничена. Едногодишната декоративна култу-

established (Berzonsky, 1992; Meriño-Gergichevich et al., 2010).

The toxic effect of Al is accompanied with oxidative stress, decrease of photosynthetic activity, negative deviations in the metabolic processes in the roots and impeded absorption of water and nutrients (Meriño-Gergichevich et al., 2010).

Cultivation of plants not used by humans and animals food is an option to mitigate the problem with the use of contaminated areas and to reduce the risk in environmental aspect. Phytoremediation, by growing plants that are able to accumulate heavy metals and detoxify them by transformation into harmless for the plant compounds, is an efficient approach for restoration and utilization of polluted soils (Salt et al., 1995; McGrath, 1996; Susarla et al., 2002; Nagajyoti et al., 2010).

The ornamental plants can be suitable for landscaping of polluted with heavy metals areas. However, limited information is available about the effect of heavy metals on the life cycle of flowers and their tolerance to elevated levels of contamination. The possibility for growing annual flowers in polluted soils has not been satisfactory researched.

Marigold (*Tagetes patula* L.) is an attractive ornamental species ра тагетес е атрактивен вид, подходящ за отглеждане на открити площи. Има някои експериментални данни за реакцията на *Tagetes patula*, сорт ‘Roodkapje’ и *Ageratum houstonianum* при отглеждането им върху почви замърсени с различни концентрации на Pb, Zn, Cu и техни комбинации. Отчетен е стимулиращ ефект на ниски дози от металите върху броя на съцветията (Ivanova et al., 2007). При повишени концентрации са наблюдавани морфологични изменения на стъблата и цветовете. Резултатите са показали, че високи дози на Cu и Pb инхибират развитието на стъблени израстъци при *T. patula* и *A. houstonianum.* Установена е тенденция към намаляване броя на цветовете с увеличаване концентрацията на металите, като при *T. patula* инхибирането на растежа достига до 12.9% при Cu, 35,5% при Zn и 38,7% при Pb. В сравнение с нетретираните растения, при *A. houstonianum* отгледан в присъствие на Cu, Zn и Pb са наблюдавани по-слабо изразено подтискане на растежа (до 4.8%) и незначителен ефект върху фенотипната проява на растенията (Ivanova et al., 2007). В други проучвания *Tagetes erecta* е отглеждан в саксии с изкуствено замърсена почва с концентрации на Cd 1, 5 и 10 mg.m^{-3} почва и Pb 100, 500 и 1000 mg.m^{-3} почва. При изслед-

suitable for growing in open field. Some experimental data for the reaction of *Tagetes patula*, cv. ’Roodkapje’ and *Ageratum houstonianum* cultivated on soils contaminated with different concentrations of Pb, Zn, Cu and their combinations have been reported.

It has been found that low doses of these metals exert stimulating effect on the number of inflorescences (Ivanova et al., 2007). At elevated concentrations morphological changes of the stems and flowers have been observed. The results have also shown that high doses of Cu and Pb inhibit the branching in both *T. patula* and *A. houstonianum*. Concomitant with the increase of the concentration of the metals, the number of flowers has been reduced. For *T. patula* the growth inhibition has been 12.9% at Cu, 35.5% at Zn and 38.7% at Pb. In comparison to non-treated plants, in *A. houstonianum* grown in presence of Cu, Zn and Pb, less expressed growth inhibition (up to 4.8%) and negligible effect on the phenotypic appearance of the plants has been documented (Ivanova et al., 2007).

In other studies *Tagetes erecta* has been cultivated in pots with soils contaminated with Cd concentrations of 1, 5 and 10 mg.m^{-3} soil and Pb of 100, 500 and 1000 mg.m^{-3} soil. In the tested ваните сортове най-високо съдържание на Cd е било измерено в листата, по-малки количества в стъблата и най-ниски нива са установени в съцветията. Подобна тенденция на акумулиране е наблюдавана и при Pb. Изследваните сортове на *Tagetes erecta* са препоръчани за възстановяване на почви, замърсени с тези тежки метали (Bosiacki, 2009). Съществуват някои данни за влиянието на тежки метали и при други едногодишни декоративни видове. Така например, при *Salvia splendens* е установено, че висока степен на замърсяване със соли на Pb, Zn и Cu води до намаляване на височината на растенията и редуциране на броя на страничните разклонения (Atanassova and Zapryanova, 2009). Подобни ефекти на тези метали са наблюдавани и при *Callistephus sinensis*, но не е отчетено влияние върху времето на бутонизация и цъфтеж (Ivanova et al., 2006). В проучвания с растения от *Zinnia marylandica*, cv. 'Zahara Yellow' отгледани в саксии с почвен субстрат замърсен с Cd и Pb беше установена толерантност на този сорт циния към нива на Cd превишаващи ПДК и чувствителност към дози на Pb над ПДК (Milusheva et al., 2015). Не са ни известни сведения за влиянието на Al върху растежа и развитието на *Tagetes patula* и други едногодишни декоративни видове.

varieties the highest content of Cd has been measured in leaves, less in the stems and the lowest has been found in the inflorescences.

In presence of Pb similar tendency of metal accumulation has been detected. The studied varieties of *Tagetes erecta* have been recommended for restoration of soils contaminated with these heavy metals (Bosiacki, 2009). For other annual ornamentals, for example *Salvia splendens*, it has been reported that treatment with solutions containing high concentrations of Pb, Zn and Cu leads to diminution of plant height and reduction of the number of lateral branches (Atanassova and Zapryanova, 2009). Similar growth suppression effect of the same metals has been established on *Callistephus sinensis* but no changes in the timing of bud formation and flowering of this species have been observed (Ivanova et al., 2006).

In studies with *Zinnia marylandica*, cv. 'Zahara Yellow', grown in pots with soil substrate contaminated with Cd and Pb, a tolerance of this cultivar to Cd levels exceeding MPC and sensitivity to doses of Pb over MPC was established (Milusheva et al., 2015). No information is available about the influence of Al on growth and development of *Tagetes patula* and other annual ornamental species.

Като цяло, изследванията показват, че поведението на растенията в условия на стрес от тежки метали зависи в голяма степен от генотипа, нивата на тежките метали в почвата и способността да поглъщат, усвояват и детоксикират тези химически елементи.

Целта на настоящото проучване е да се установи влиянието на тежките метали Cd, Al и Zn върху растежа и развитието на тагетес (*Tagetes patula* L.).

Cumulatively the studies indicate that the plant behavior under heavy metal stress is to a large extent dependent on the genotype, the levels of heavy metals in the soil and the ability of the plants to acquire and detoxify these chemical elements.

The aim of this study was to explore the influence of the heavy metals Cd, Al and Zn on the growth and development of marigold (*Tagetes patula* L.).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Опитите бяха изведени в Института по декоративни растения (ИДР), София, с тагетес (*Tagetes patula* L.), сорт 'Janie Primrose'. Семената бяха засяти в субстрат от почва и торф в съотношение 1:1.След появата на първите същински листа, растенията бяха пикирани в саксии, всяка от които съдържа 350 g субстрат с pH 6.2 и кондуктивност 0.49 $mS.cm^{-1}$ Третирането на растенията с тежки метали беше извършено 20 дни след пикирането на разсада. Тежките метали Al, Cd и Zn бяха внесени в почвената смеска под формата на разтвори на сулфатни соли – с по 100 ml разтвор за постигане на крайни концентрации на солите в субстрата съответстващи на ПДК, по-ниски и по-високи от нея. както следва: $CdSO_4$ – 1, 2 (ПДК), 50, 100 и 250 $mg.kg^{-1}$ почва, $Al_2(SO_4)_3$ - 5,10 (ПДК),100, 200 и 500 $mg.kg^{-1}$ и

MATERIAL AND METHODS

The experiments were carried out in the Institute of Ornamental Plants (IOP), Sofia with marigold (*Tagetes patula* L.), cv. 'Janie Primrose'. The seeds were sown in a substrate consisting of soil and peat in ratio 1:1. After the appearance of the first true leaf the plants were transferred in pots, each containing 350 g of the substrate with pH 6.2 and conductivity 0.49 $mS.cm^{-1}$. Twenty days after the transfer the plants were treated with a range of concentrations of heavy metals. The metals Al, Cd and Zn were introduced into the soil mixture in the form of solutions of sulfate salts. For achieving final concentrations of the salts in the substrate corresponding to the MPC, lower and higher than it, 100 ml of stock solutions were used. The final concentrations were as follows: $CdSO_4$ - 1, 2 (MPC), 50, 100 and 250 $mg.kg^{-1}$ soil; $Al_2(SO_4)_3$

$ZnSO_4$ – 100, 250 (ПДК), 3500, 7000 и 27500 $mg.kg^{-1}$. Растенията са отглеждани в оранжерия при температура на въздуха през вегетационния период 21-22 ^oC и на почвата 19-20 ^oC; през периода на формирането на цветните бутони температурата на въздуха беше поддържана в диапазон 25-27 ^oC, а на почвата 19-23 ^oC. Въздушната влажност в оранжерията е поддържана около 70% за целия период на експеримента, при естествен фотопериод за месеците от април до юли. Растенията са поливани редовно с 200 ml вода на саксия. Контролните растения са отгледани при същите условия но не са третирани с тежки метали.

Ефектът на тежките метали върху растежа и развитието на тагетеса е определян чрез измервания на височината и ширината на растенията и корените. Извършени са наблюдения за проява на токсичност по листата и цветовете и времето на бутонизация и цъфтеж. Декоративните качества на растенията са оценени визуално.

Представените биометрични данни са снети на 40^{я} ден след третирането с металните соли. Стойностите в графиките са средни от 2 независими експеримента, всеки с по 10 повторения за вариант. Обработката на данните е извършена с Microsoft Office Excel. Верти-

- 5.10 (MPC) 100, 200 and 500 $mg.kg^{-1}$ soil and $ZnSO_4$ - 100, 250 (MPC), 3500, 7000 and 27500 $mg.kg^{-1}$ soil. The pots were placed in plastic greenhouse at air temperature during vegetative stage 21-22^o C and soil temperature 19-20° C; during bud formation and flowering the air temperature was 25^o-27^o C and soil temperature was 19^o-23^o C. The relative air humidity in the greenhouse was maintained around 70% for the entire period of the experiment, under natural photoperiod for the months from April to July. The plants were watered regularly with 200 ml water per pot. Control plants were grown at the same conditions but were not treated with heavy metals.

The effect of heavy metals on the growth and development of marigold was estimated by the biometrical indexes length and width of the plant and length and diameter of roots. Information on the influence of the metals on the occurrence of phenological phases bud formation and flowering was collected by visual observations. The ornamental qualities of the plants were also visually evaluated.

The presented data were collected 40 days post treatments. The values in the graphs are means of two independent experiments each consisting of 10 replicates per variant of treatment. Data processing was performed калните линии на стълбчетата във фигури 1, 4 и 5 показват стойностите на стандартното отклонение (±SD)

with Microsoft Office Excel. Vertical lines on the bars in Figures 1, 4 and 5 show the standard deviation (±SD).

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

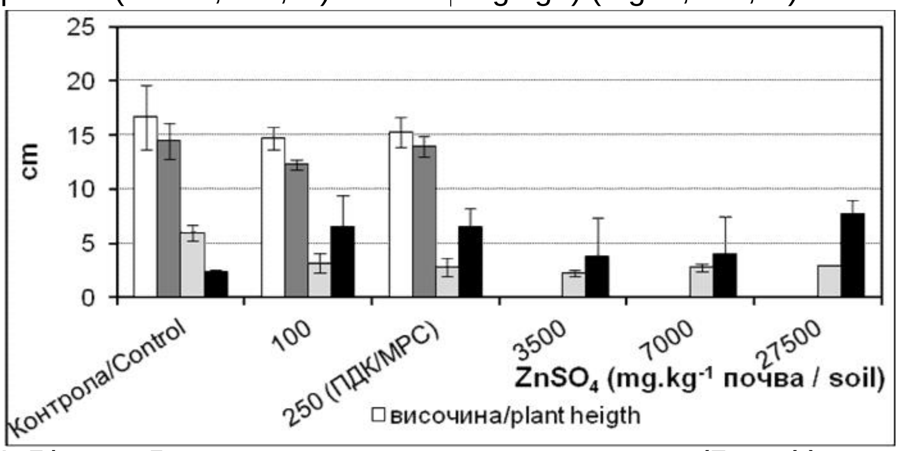
В това проучване е тестирано влиянието на Al, Cd и Zn върху растежа и развитието на тагетес (*Tagetes patula*), сорт ‘Janie Primrose’ при отглеждане върху почвен субстрат, в който тежките метали бяха внесени под формата на $Al_2(SO_4)_3$, $CdSO_4$ и $ZnSO_4$. Поведението на растенията в замърсените почви беше сравнявано с това на нетретираната контрола и с ефекта на концентрации на металите съответстващи на ПДК.

Установено беше, че 40 дни след третирането с концентрация на Zn под ПДК (100 mg.kg^{-1}) и равна на ПДК (250 mg.kg^{-1}), височината и ширината на растенията не се променят значително спрямо тези на контролата (Фиг. 1, 2 B, C).

RESULTS AND DISCUSSION

In this study the influence of Al, Cd and Zn on growth and development of marigold (*Tagetes patula*) was tested with cv. ’Janie Primrose’ grown on soil substrate in which the heavy metals were introduced in the forms of $Al_2(SO_4)_3$, $CdSO_4$ and $ZnSO_4$. The behavior of plants in contaminated soils was compared to not-treated control, and to the effect of concentrations of the metals corresponding to MPC.

It was found that 40 days after the treatment, the height and width of plants, in reference to non-treated control, were not significantly changed at Zn concentrations below MPC (100 mg.kg^{-1}) and equal to MPC (250 mg.kg^{-1}) (Fig. 1, 2 B, C).

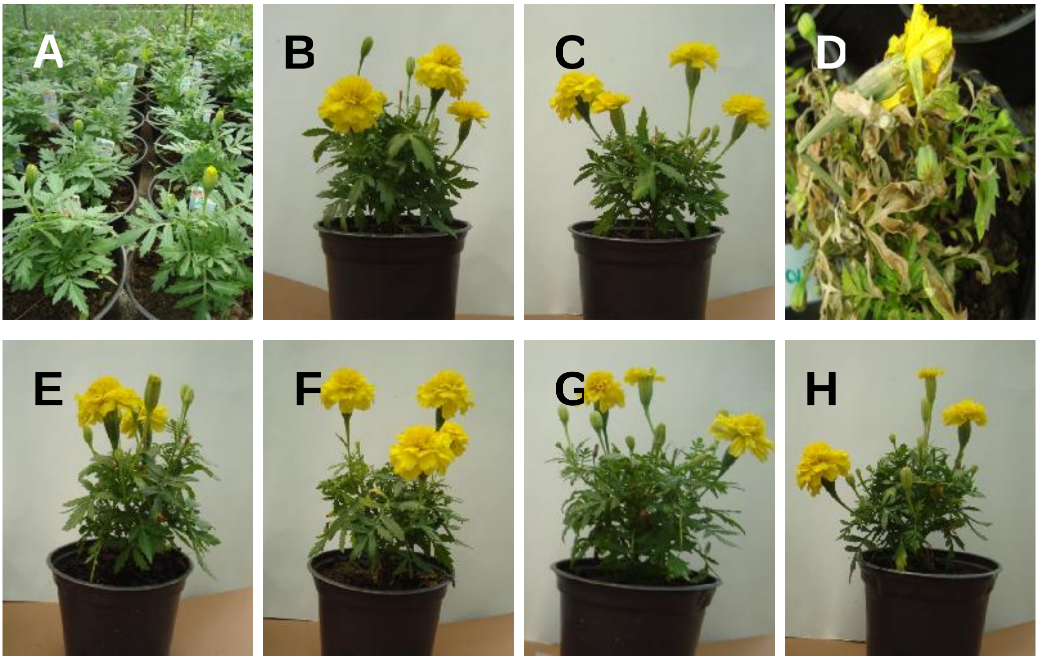


Фиг. 1. Ефект на Zn върху показатели на растежа при тагетес (*T. patula*), сорт ‘Janie Primrose’

Fig. 1. Effect of Zn on growth parameters of marigold (*T. patula*), cv. ‘Janie Primrose’

При замърсяване на почвата с концентрации на Zn 14, 28 и 110 пъти по-високи от ПДК растенията загинаха във фаза на цъфтеж (Фиг. 2 D).

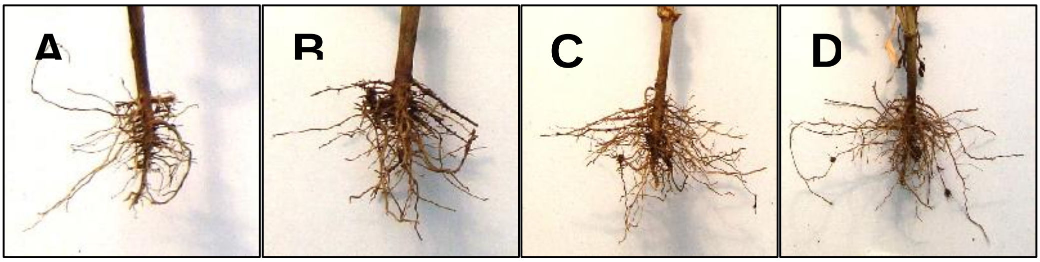
When the soil was polluted with Zn dozes 14, 28 and 110 times higher than MPC the plants died in the stage of flowering (Fig. 2 D).



Фиг. 2. Растежни прояви във фази на бутонизация и цъфтеж при третирани с Zn, Cd и Al растения от *T. patula*, сорт 'Janie Primrose'.
(A) фаза бутонизация; (B) контрола – нетретирана; (C) 250 mg.kg^{-1} $ZnSO_4$ - ПДК; (D) 3500 mg.kg^{-1} $ZnSO_4$; (E) 2 mg.kg^{-1} $CdSO_4$ - ПДК; (F) 50 mg.kg^{-1} $CdSO_4$; (G) 10 mg.kg^{-1} $Al_2(SO_4)_3$ - ПДК; (H) 100 mg.kg^{-1} $Al_2(SO_4)_3$. Снимки B - F – фаза на цъфтеж.
Fig. 2. Growth performance in the stages of bud formation and flowering of marigold (*T. patula)*, cv. 'Janie Primrose' exposed to treatments with Zn, Cd and Al.
(A) phase of bud formation; (B) control – non-treated; (C) 250 mg.kg^{-1} $ZnSO_4$ - MPC; (D) 3500 mg.kg^{-1} $ZnSO_4$; (E) 2 mg.kg^{-1} $CdSO_4$ - MPC; (F) 50 mg.kg^{-1} $CdSO_4$; (G) 10 mg.kg^{-1} $Al_2(SO_4)_3$ - MPC; (H) 100 mg.kg^{-1} $Al_2(SO_4)_3$. Images B - F – stage of flowering.

Ефект на Zn беше отчетен върху развитието на кореновата система. Третирането с всички изпитани концентрации на този метал доведе до значително увеличаване на диаметъра и силно изразено скъсяване на централния корен. Наблюдаван беше засилен растеж на странични корени, превишаващи по дължина тези при контролата (Фиг. 1, 3 A, B).

An effect of Zn was established on the development of root system. Treatments with any tested concentration of this metal led to significant increase of root diameter and well pronounced shortening of the central root. Enhanced growth of the lateral roots in length exceeding that of the control was observed (Fig. 1, 3 A, B).

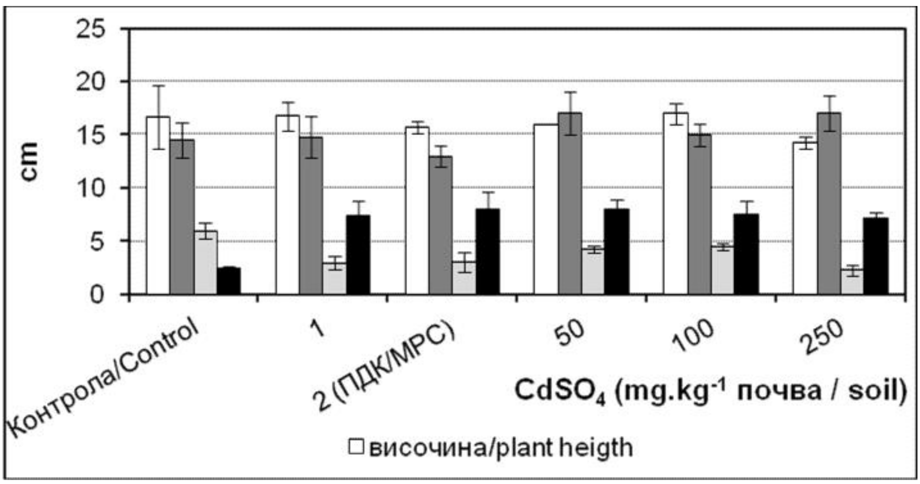


Фиг. 3. Влияние на ПДК от Zn, Cd и Al върху растежа на корените при тагетес (*T. patula*), сорт 'Janie Primrose' (A) контрола – нетретирана; (B) 250 mg.kg^{-1} $ZnSO_4$; (C) 2 mg.kg^{-1} $CdSO_4$; (D) 10 mg.kg^{-1} $Al_2(SO_4)_3$.

Fig. 3. Influence of MPC of Zn, Cd and Al on root growth of marigold (*T. patula*), cv. 'Janie Primrose' (A) control – non-treated; (B) 250 mg.kg^{-1} $ZnSO_4$; (C) 2 mg.kg^{-1} $CdSO_4$; (D) mg.kg^{-1} $Al_2(SO_4)_3$.

При всички концентрации на $CdSO_4$, включително под, над и при дозата на ПДК (диапазон 1-250 mg.kg^{-1}) не беше установено влияние върху височината и ширината на третираните растения в сравнение с контролата (Фиг. 2 B, E, F, 4). Като ефект на Cd, при кореновата система беше отчетено увеличаване на диаметъра поради развитие на множество удължени, но по-тънки странични корени. Наблюдавано беше и силно изразено скъсяване на централния корен (Фиг. 3 A, C, 4).

At $CdSO_4$ in concentrations ranging from 1 to 250 mg.kg^{-1}, including lower and over MPC, an influence of the metal on the width and height of treated plants, in comparison to control, was not found (Fig. 2 B, E, F, 4). In response to Cd, an increase of root system diameter due to development of a number of elongated but thinner lateral roots was recorded. Strongly expressed shortening of the central root was established (Fig. 3 A, C, 4).

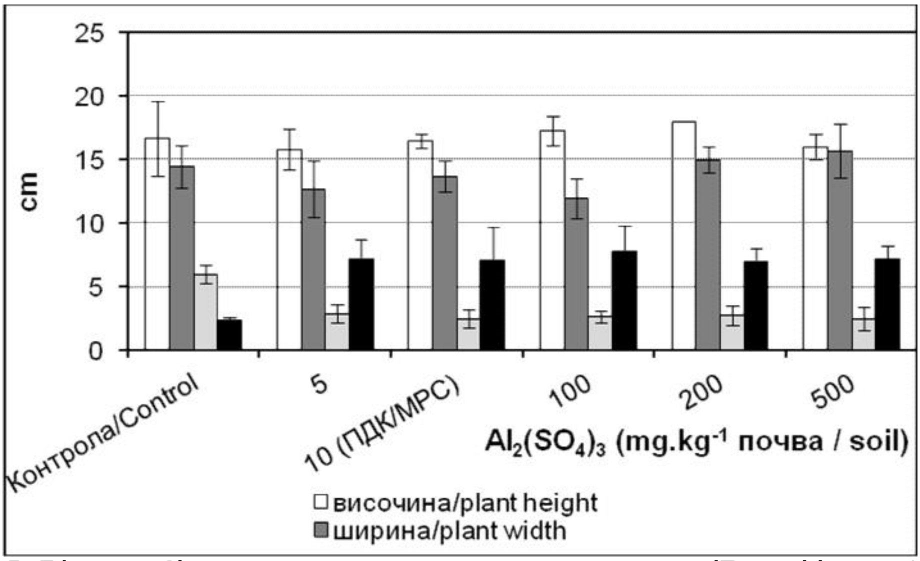


Фиг. 4. Ефект на Cd върху показатели на растежа при тагетес (*T. patula*), сорт 'Janie Primrose'

Fig. 4. Effect of Cd on growth parameters of marigold (*T. patula*), cv. 'Janie Primrose'

По подобие на растенията отгледани върху субстрат замърсен с Cd и Zn, в присъствие на $Al_2(SO_4)_3$, височината на растенията остана непроменена, независимо от приложената концентрация. Слабо намаляване на ширината беше отчетено при концентрация от 100 $mg.kg^{-1}$ (Фиг. 2 H, 5). Установено беше, че при дози на Al по-ниски, равни на ПДК и няколкократно по-високи от ПДК дължината на корените намаляваше приблизително 2 пъти, докато ширината нарастваше повече от 2 пъти в сравнение с контролата (Фиг. 3 A, D, 5).

In similarity to the plants grown on substrate contaminated with Cd and Zn, in presence of $Al_2(SO_4)_3$, irrespective on the concentration applied, the plant height remained unchanged (Fig. 2 G, 5). Slight reduction of plant width was measured at Al concentration of 100 $mg.kg^{-1}$ (Fig. 2 H, 5). It was found that, in comparison to non-treated control, at Al doses lower, equal to MPC and much higher than it, the root length decreased approximately 2 folds and the root diameter increased more than 2 folds (Fig. 3 A, D, 5).



Фиг. 5. Ефект на Al върху показатели на растежа при тагетес (*T. patula*), сорт ‘Janie Primrose’.
Fig. 5. Effect of Al on growth parameters of marigold (*T. patula*), cv. ‘Janie Primrose’

Стимулиране на растежа във фазата на вегетация беше наблюдавано при прилагането на всички тестирани метали при дози под и до ПДК.

In vegetative stage the application of all tested metals in doses below and at MPC resulted in stimulation of plant growth.

В условия на кисели почви най-ясно негативно влияние на Al токсичност се проявява при корените. Това се прявява в намаляване на дължината им, поради подтискане на деленето на клетките в кореновата меристема и на процеса на удължаването на клетките. Поради затруднения в приемането на вода и хранителни вещества, дължащи се на неблагоприятни взаимодействия на Al с други съединения в почвата корените обикновено стават по-тънки и покафеняват (Meriño-Gergichevich et al., 2010). Предположено е, че добавянето на Ca^{2+} може да облекчи вредния ефект на Al (Meriño-Gergichevich et al., 2010). Нашите експерименти бяха проведени с почвен субстрат с pH 6.2, което може да обясни липсата на ясно изразен негативен ефект на Al върху кореновата система и надземните части на растението, дори при дози на метала многократно над ПДК.

Намаляването на дължината на централния корен в присъствие на Al се прояви също при Cd и Zn. Установената в нашите експерименти характерна особеност в морфологията и растежа на кореновата система на тагетеса при замърсяване на почвата с всеки от трите тежки метала предполага известно сходство в реакцията на това растение към приложения стрес. При други култури, в присъствие на повишени нива на Cd и Pl

At condition of acidic soils the negative impact of Al toxicity occurs mainly on the roots. It is expressed in decrease of root length due to inhibition of cell division in root meristem and suppression of cell elongation.

Due to impeded uptake of water and nutrients, provoked by unfavorable interactions of Al with other compounds in the soil, the roots usually become thinner and show browning (Meriño-Gergichevich et al., 2010).

It has been suggested that the addition of Ca^{2+} can alleviate the harmful effects of Al (Meriño-Gergichevich et al., 2010). Our experiments were conducted with soil substrate with pH 6.2 which, at least partially, may explain the lack of negative effect of Al on the root system and aerial parts of the plant, even at metal levels much over MPC.

The reduction of the length of the central root in presence of Al appeared also in presence of Cd and Zn. Therefore the established in our experiments characteristic morphology and growth of the root system of marigold at soil contamination with each of the three heavy metals suggests a similarity in the response of this plant to the applied stress. For other crops, exposed to elevated levels of Cd and Pb, morphological changes and growth of roots in морфологични изменения и нарастване на корените в хоризонтална посока са описани като проява на индуциран от металите отрицателен геотропизъм (Filippenko, 2001). Добре изразеното скъсяване на централния корен и удължаването на страничните корени може евентуално да се разглежда като механизъм на адаптиране към условията на потенциално затруднени от тежките метали достъп до и усвояване на минерални елементи от почвата. Изясняването на този процес обаче, изисква допълнителни проучвания.

В сравнение с контролните растения, не беше установено влияние на Cd и Al върху настъпването и продължителността на фенофазите бутонизация и цъфтеж. Броят на страничните разклонения, броят на цветовете и декоративните качества на тегетеса не бяха повлияни от приложените тежки метали (Фиг. 2 A, B, C, E-H). Изключение беше отчетено при Zn, където при концентрации превишаващи ПДК растенията загинаха в цъфтежния период (Фиг. 2 D). При концентрациите на Zn под и при ПДК фенофазите протичаха нормално при запазена обща декоративност на растенията (Фиг. 2 A, C). Интересна проява беше наблюдаваното стимулиране на растежа във фазата на вегетация при концентрации на Cd, Al и Zn под и при ПДК. Подобен ефект на

horizontal direction are described as metal-induced negative gravitropism (Filippenko, 2001).

The well expressed shortening of the central root and the elongation of the lateral roots might be eventually considered as a mechanism of adaptation to conditions of potentially hampered by the heavy metals access to and acquisition of mineral elements from the soil. The elucidation of this process, however, requires additional studies.

In comparison to control plants, no influence of Cd and Al was detected on the onset and duration of bud formation and of the flowering period. Stem branching, the number of flowers and the ornamental quality of marigold plants appeared unaffected by the applied heavy metals (Fig. 2 A, B, C, E-H).

An exception was the treatment with Zn in concentrations exceeding MPC, at which the plants died during flowering (Fig. 2 D). Zink doses below MPC did not cause disturbance of phenophases and deterioration of ornamental value (Fig. 2 A, C).

Interesting event was the observed growth stimulation in the vegetative stage, established at contamination with Cd, Zn and Al concentrations below and same as MPC. Similar effect of low doses ниски дози на Pb, Zn и Cu е отбелязан при *T. patula,* сорт ‘Roodkapje’, *A. houstonianum* и *Callistephus sinensis*, сорт ‘Royal Red Ball’, където при ниски нива на тези метали е установено стимулиране на вегетативния растеж и увеличаване на броя на съцветията (Ivanova et al., 2006, 2007). Слабо изразена Zn токсичност е установена при *T. patula,* сорт ‘Roodkapje’ (Ivanova et al., 2007). При други култури, например *Hellianhus annuus* също е описан слаб цитотоксичен ефект на повишени нива на Zn (Chakravarty et al., 1992). При проучвания от нас тагетес, сорт ‘Janie Primrose’, беше установен токсичен ефект при дози на Zn превишаващи ПДК и растенията загинаха във фаза на цъфтеж. В други изследвания с тагетес е наблюдавана цинкова токсичност изразена в ограничаване на растежа на корените и надземните органи (Choi et al., 1996).

При *Zinnia merylandica*, сорт ‘Zahara Yellow’, подложен на Cd стрес при концентрации на метала превишаващи повече от 25 пъти ПДК е установено, че Cd води до растеж на стъблата в хоризонтална посока (наподобяващо отрицателен геотропизъм) (Milusheva et al., 2015). Отчетеният в настоящите експерименти хоризонтален растеж на страничните корени показва известно сходство в реакцията на тагетеса в присъствието на Cd, Zn и Al. Експерименти с *Z.*

of Pb, Zn and Cu has been recorded in *T. patula*, cv. ’Roodkapje’, *A. houstonianum* and *Callistephus sinensis*, cv. ’Royal Red Ball’, where the treatments resulted in enhanced vegetative growth and increased number of flowers (Ivanova et al., 2006, 2007). Slight Zn toxicity was observed in *T. patula*, cv. ’Roodkapje’ (Ivanova et al., 2007). In other plants, e.g., *Helianthus annuus*, a weak cytotoxic effect of elevated levels of Zn has been also described (Chakravarty et al., 1992). In our experiments with marigold cv. ’Janie Primrose’, Zn in doses exceeding MPC was highly toxic and plants died in a phase of flowering.In studies with other marigold varieties zinc toxicity appearing in limited growth of roots and above-ground organs has been observed (Choi et al., 1996).

In *Zinnia marylandica*, cv. ’Zahara Yellow’, subjected to Cd stress, at concentrations of the metal exceeding more than 25 times MPC, horizontal growth of the stems (resembling negative gravitropism) was established (Milusheva et al., 2015).

The observed in current experiments horizontal growth of lateral roots suggests some similarity of the reaction of marigold to Cd, Zn and Al.

Experiments with *Z. elegans*

elegans отглеждана в саксии с почва замърсена с Cd в нива 5-10 пъти над ПДК са показали подтискане на кълняемостта на семената, намаляване на дължината на стъблата и корените, намаляване на броя на листата и намаляване на количеството на пластидните пигменти (Thamayanthi et al., 2011).

Съществуващата информация ясно показва видова и сортова специфичност на реакцията на растенията към вида на тежкия метал и степента на замърсяване. За определяне на толерантност, чувствителност или устойчивост това налага проучвания при всеки отделен генотип, включително при декоративните култури.

grown in pots with soil containing Cd at levels 5-10 times higher than MPC have shown inhibition of seed germination, reduction of stem and root length, decrease of the number of leaves and lower content of plastid pigments (Thamayanthi et al., 2011).

The existing information soundly indicates species and cultivar specificity of plant response to the type of heavy metal and degree of soil pollution. To determine the tolerance, sensitivity or resistance, studies with each individual genotype, including ornamental crops, is necessary.

ИЗВОДИ

Tagetes patula, сорт ‘Janie Primrose’ проявява толерантност към повишени нива на Cd и Al (при pH 6.2) в почвата и е силно чувствителен към концентрации на Zn, превишаващи ПДК. Установен е подобен ефект на Cd, Zn и Al върху кореновата система, проявяващ се в силно скъсяване на дължината на централния корен и растеж на странични корени с дължина значително превишаваща тази при нетретираните растения. Декоративните качества на тагетеса и протичането на фенофазите бутонизация и цъфтеж не се повлияват отрицателно от приложените концентрации на Cd и Al, както и

CONCLUSIONS

Tagetes patula, cv. ’Janie Primrose’ shows tolerance to elevated levels of Cd and Al (pH of soil substrate 6.2) and is highly sensitive to concentrations of Zn, exceeding MPC. Cadmium, Zn and Al exert similar effect on the root system appearing in a shortening of the length of the central root and enhanced growth of lateral roots considerably exceeding the length of lateral roots of non-treated plants. The ornamental quality of marigold, the timing and occurrence of bud formation and flowering were not negatively affected by applied Cd and Al concentrations and at Zn levels not higher than MPC.

при нива на Zn не по-високи от ПДК. Получените резултати ни дават основание да считаме, че изследваният сорт тагетес е подходящ за отглеждане в условия на замърсяване на почвата при установените в това изследване безвредни нива на Cd, Zn и Al (за Al при почвено pH 6.2)

The results give us reason to assume that the investigated marigold cultivar is suitable for cultivation at the applied conditions of soil contamination with the established in this study harmless doses of Cd, Zn and Al.

БЛАГОДАРНОСТИ

Настоящото проучване е извършено в рамките на докторска програма 'Изпитване влиянието на тежки метали върху растежа и развитието на едногодишни цветя' в ИДР, София

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was conducted within PhD program of IOP, Sofia 'Testing the influence of heavy metals on growth and development of annual flowers'.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Atanassova B., Zapryanova N.** Influence of heavy metal stress on growth and flowering of *Salvia splendens* Ker.-Gawl. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2009, № 23, Suppl. 1, pp. 173-176.
2. **Berzonsky W.A.** The genomic inheritance of aluminum tolerance in "Atlas 66" wheat. *Genome*, 1992, 35, № 4, pp. 689-693.
3. **Bosiacki M.** Phytoextraction of cadmium and lead by selected cultivars of *Tagetes erecta* L. Part II. Contents of Cd and Pb in plants*. Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 2009, 8, № 2, pp. 15-26.
4. **Cakmak I., Marshner H.** Effect of zinc nutritional status on superoxide radical and hydrogen peroxide scavenging enzymes in bean leaves. In: Barrow N.J. (ed.) *Plant nutrition-from genetic engineering field practice.* 1993, Kluwer, The Netherlanads, pp. 133-137.
5. **Chakravarty B., Srivastava S.** Toxicity of some heavy metals in vivo and *in vitro* in *Hefianthus*v *annuus*. *Mutations Research Letters*, 1992, 283, № 4, pp. 287-294.
6. **Choi J.M., Pak C.H., Lee C.W.** Micronutrient toxicity in French marigold. *Journal of Plant Nutrition*, 1996, 19, № 6, pp. 901-916.
7. **Das P., Samantaray S., Rout G.R.** Studies on cadmium toxicity in plants: A review. *Environmental Pollution*, 1997, 98, №. 1, pp. 29-36.
8. **Dinev N., Banov M., Nikova I.** Monitoring and risk assessment of contaminated soils.
9. **Ebbs S.D., Kochian L.V.** Toxicity of zinc and copper to Brassica species: implications for phytoremediation. *Journal of Environmental Quality*, 1997, 26, № 3, pp. 776-781.
10. **Filippenko V.N.** Gravi- and chemotropisms of the primary maize roots when affected by lead and cadmium. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2001, 48, № 1, pp. 12-18.

11. **Fontes R.L.S., Cox F.R.** Zinc toxicity in soybean grown at high iron concentration in nutrient solution. *Journal of Plant Nutrition*, 1998, 21, № 8, pp. 1723-1730. *General and Applied Plant Physiology,* 2008, 34, № 3-4, pp. 389-396.
12. **Ivanova V., Alandjiiski D., Tafranjiski O., Lykojanellos G.** Biometrical responses of *Callistephus sinensis* Nees grown on polluted with heavy metals soils. *Journal of Environmental Protection and Ecology*, 2006, 7, № 4, pp. 776-777.
13. **Ivanova V., Tafranjiski O., Alandjiiski D.** Possibilities for using soils polluted with heavy metals for seedlings production of annual flowers. *Proceedings 42nd Croatian and 2nd International Symposium on Agriculture*, 2007, February 13-16, Zagreb, Croatia, pp. 92-96.
14. **Lux A., Martinka M., Vaculík M., White P.J.** Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review. *Journal of Experimental Botany*, 2001, 62, № 1, pp. 21-37.
15. **McGrath S.P.** Phytoextraction for soil remediation. In Brooks R.R. (ed.) *Plants that hyperaccumulate heavy metals*. 1998, CAB Int., Wallingford, UK, pp. 261-287.
16. **Meriño-Gergichevich C., Alberdi M., Ivanov A.G., Reyes-Díaz M.** Al_3+- Ca_2+ interaction in plants growing in acid soils: al-phytotoxicity response to calcareous amendments. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 2010, 10, № 3, pp. 217 -243.
17. **Milusheva D.I., Iakimova E.T., Atanassova B.Y.** Cadmium and lead effects on growth performance of zinnia (*Zinnia marylandica*). *Ornamental and Subtropical Horticulture*, 2015, 54, pp. 175-184.
18. **Nagajyoti P.C., Lee K.D., Sreekanth T.V.M.** Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 2010, 8, № 3, pp. 199-216.
19. **Prasad K.V.S.K., Paradha Saradhi P., Sharmila P. Concerted action of antioxidant enzymes and curtailed growth under zinc toxicity in *Brassica juncea*.** *Environmental and Experimental Botany,* 1999, 42, № 1, pp. 1-10.
20. **Salt D.E., Blaylock M., Kumar N.P.B.A., Dushenkov V., Ensley D., Chet I., Raskin I.** Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Nature Biotechnology*, 1995, 13, pp. 468-474.
21. **Sanita di Toppi L., Gabbrielli R.** Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany*, 1999, 41, № 2, pp. 105-130.
22. **Susarla S., Medina V.F., McCutcheon S.C.** Phytoremediation: An ecological solution to organic chemical contamination. *Ecological Engineering*, 2002, 18, № 5, pp. 647-658.
23. **Thamayanthi D., Sharavanan P.S., Vijayaragavan M.** Effect of cadmium on seed germination, growth and pigments content of Zinnia plant. *Current Botany*, 2011, 2, № 8, pp. 8-13.
24. **Warne M.S., Heemsbergen D., Stevens D., McLaughlin M., Cozens G., Whatmuff M., Broos K., Barry G., Bell M., Nash D., Pritchard D., Penney N.** Modeling the toxicity of copper and zinc salts to wheat in 14 soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2008, 27, № 4, pp. 786-792.

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, vol. 19, 1, 2016, (246-255)
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan

Мултипликация при лилиум (Lilium) в ин витро условия

Надежда Запрянова* и Иванка Иванова

Институт по декоративни растения, 1222, Негован, София, България
**E-mail: nadejda_zaprianova@abv.bg*

Multiplication of lilies (Lilium) in vitro conditions

Nadejda Zaprianova* and Ivanka Ivanova

Institute of ornamental plants, 1222, Negovan, Sofia, Bulgaria

РЕЗЮМЕ

Лилиумът е една от водещите в света цветна култура, характеризираща се с висок декоративен ефект на цветовете, с висок капацитет на рехидратация след дълго транспортиране и дълготраен живот на отрязания цвят във вода.

Въведени в *ин витро* култура чрез люспи от луковица са пет български сорта лилиум „Андрос”, „Марина”, „Поли”, „Негован” и „Ана-Мария” и 3 диви вида лилиум: *Lilium rhodopaeum Delip., Lilium albanicum Griseb., Lilium martagon L..*

В процесът на стерилизация са използвани два вида стерилизиращи агенти. $HgCl_2$ и NaOCl. Успешен за всички изпитани видове и сортове е вариант 1 $HgCl_2$- 0.1 % (1мин спирт $CH_2(OH)$, 3мин- $HgCl_2$- 0.1 % и трикратно промиване на експлантите със стерилна вода).

Експлантите се поставят в среда MS без растежни хормони за установяване естествения размножителен процес на заложеният растителен материал.

Най-висок мултипликационен коефициент, установен за дивите видове е на *Lilium albanicum Griseb* – 4.68% със среден брой новообразувани луковички 5.2. При българските сортовете най-висок мултипликационен коефициент е установ-

SUMMARY

Lilium is one of the world’s leading plant crops. It is characterised with high ornamental value of the blossoms, as well as high capacity of rehydration after long period of transportation and also long life of the cut flower in water.

Five Bulgarian Lilium species:“Andros”, ”Marina”, ”Poli”, ”Negovan”, ”Ana Maria” together with 3 wild *Lillium species: Lilium rhodopaeum Delip., Lilium albanicum Griseb., Lilium martagon L.,* are developed by bulb scales and are used as *in vitro* culture.

In the process of sterilization, two sterilization agents are used: $HgCl_2$ and NaOCl. A successful method for all plant species is using $HgCl_2$- 0.1 % var.1 (1 minute under treatment with $CH_2(OH)$, 3 minutes with $HgCl_2$- 0.1 % and three time rinsing of the explants with distilled water).

The explants are placed in MS environment without growth hormones. In that way the natural reproduction process of the plants can be determined.

The highest multiplication coefficient established in wild species of *Lillium* is the one *Lilium albanicum Griseb* has – 4.68%, with average number of new bulbs 5.2. Among the Bulgarian varieties:

вен при сорт „Поли" – 2.22%, със среден брой новообразувани луковички 3,7.

Ключови думи: Лилиум, ин витро култура, стерилизация, мултипликация

“Poli “– 2.22% with average number of newly formed bulbs 3.7.

Key words: *Lillium, in vitro* culture, sterilization, multiplication

УВОД

Лилиумът е една от водещите култури в световното цветопроизводство. Това се дължи както на декоративността на цвета, така и на високия му капацитет на рехидратация след дълго транспортиране, дълготрайния живот на отрязания цвят във вода и добрата икономическата ефективност от отглеждането му (Pandey et al., 2009). По производство на отрязан цвят той заема седмо място в света (Kumar et al., 2007).

През последните години методът на тъканните култури се наложи като най-подходящ за видовете от р. Лилиум (Pelkonen, 2005). Този метод се използва както за получаване на качествен посадъчен материал (Kanchanapoom et al., 2011; Saifullah et al., 2010), така и за поддържане на зародишна плазма от застрашени, ендимитни видове (Arzate-Fernández et al., 2007; Parić et al., 2011; Skorić et al., 2014).

За въвеждане в култура *in vitro* се използват различни растителни материали: семена, стъблени резници, луковички, но един от най-широко използваните експланти са люспи от луковица (Chang et al., 2000; Pandey et al., 2009; Lian et al., 2002).

Целта на проучването е да

INTRODUCTION

Lilies (*Lilium)* are one of the main species used in flower production around the world. That’s due to the following factors – high ornamental value of the blossoms, high rehydration capacity after prolonged transportation, long life of the cut flowers in water and good economic efficiency for cultivation (Pandey et al., 2009). In terms of cut flowers production, Lilies (*Lilium*) takes the seventh place in the world (Kumar et al., 2007).

In recent years, the method for tissue cultures has proven as being most efficient and suitable for species of the *Lilium* genus (Pelkonen, 2005). This method is used for creation of high quality seedlings (Kanchanapoom et al., 2011; Saifullah et al., 2010), as well as for maintaining germplasm of endangered and endemic species (Arzate-Fernández et al., 2007; Parić et al., 2011; Skorić et al., 2014).

Different plant materials are used for introduction in in vitro cultures – seeds, stem cuttings, bulbs. However one of the most widely used explants is the bulb scales (Chang et al., 2000; Pandey et al., 2009; Lian et al., 2002).

The purpose of this research

се установи, естествения размножителен потенциал на заложения материал от *Lilium*, включващ диви видове от флората на България и български сортове Лилиум в условия *in vitro*.

is to assess the natural generative potential of *Lilium*. Test material being used involves 3 wild species native to Bulgaria's Flora and 5 Bulgarian varieties of *Lilium* placed in in vitro conditions.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Растителният материал използван в изследването са люспи от луковици от лилиум (3 диви вида от флората на България и от 5 български сорта).

Lilium rhodopaeum Delip и Lilium albanicum Griseb са балкански ендимити, включени в Червената книга на България.

Те са с жълта багра на цветовете. *Lilium martagon* L. не е защитен вид и се характеризира с розово червена багра на цвета.

Сортовете спадат към групата на азиатските хибриди. „Андрос", „Негован" са междувидови, а „Марина", „Поли" и „Ана Мария"са вътревидови хибриди.

За въвеждане на растителния материал в *in vitro* условия са изпитани два стерилизиращи агента: живачен двухлорид и натриев хипохлорид (белина АСЕ) с допълнително участие на 70% етанол и трикратно промиване със стерилна вода.

Изпитани са 4 варианта за повърхностна стерилизация на люспите, представени на Таблица 1.

MATERIAL AND METHODS

The plant material used in the research includes Lilium bulb scales taken from 3 wild species native to Bulgaria's Flora and 5 Bulgarian varieties. The wilds species are as follows: *Lilium rhodopaeum Delip and Lilium albanicum Griseb* are endangered endemic species local to the Balkans and are included in the Red Data Book of the Republic of Bulgaria. Their blossoms are colored in yellow. *Lilium martagon* L. is not a protect species and its blossoms are colored in pink-red.

The other five *Lilium* varieties are part of Asian hybrids group. "Andros" and "Negovan" are interspecies, while "Marina", "Poli" and "Ana Maria" are intraspecies hybrids.

Two sterilizing agents are tested for the introduction of the plant material in *in vitro* conditions– Mercuric Chloride ($HgCl_2$) and Sodium Hypochlorite (NaOCl) (in the form of commercial bleach containing 4% active Chlorine) with additional usage of 70% ethanol and triple wash with sterile water.

Four types of surface sterilization of the bulb scales are tested, represented in Table 1.

Таблица 1. Варианти на стерилизация на люспи от Лилиум
Table 1. Variants of sterilization of bulb scales *Lilium*

Вариант № Variant №	70% $CH_2(OH)_5$	$HgCl_2$ 0.1 %	NaOCl1%	Стерилна H_2O Sterile H_2O
Вариант / Variant 1	1min	3 min	-	3x15
Вариант / Variant 2	1min	10min	-	3x15
Вариант / Variant 3	1min	-	3 min	3x15
Вариант / Variant 4	1min	-	10min	3x15

Стериализираните експланти се поставят в хранителна среда съдържаща MS (соли и витамини)(Murashige and Skoog 1962)агар 6g/l $^{-1}$ и захароза 30g/l $^{-1}$ при pH – 5.7.

Растенията се отглеждат в култивационно помещение при температура – 22 ^{0}C, фотопериод 16:8 (ден:нощ) часа и осветление 30μmol.m^{-2} .s^{-1}.

Отчетени са следните показатели: брой на заразените и стерилни експланти, брой на стерилните – жизнени експланти и брой новообразувани луковички.

Мултипликационният коефициент е изчислен по формулата: MK%=NxA/100,
където N – брой новообразувани издънки (луковички), А-% мултиплицирани растения (Tsvetkov, 1998)

Данните, представени на фигурите са изразени като средна стойност ± SE от два независими експеримента, изведени в десет повторения за вариат. Анализирани са за достоверност чрез t тест на програмата GraphPad Prizm.

The sterilizing explants are placed in culture medium containing MS (salts and vitamins) (Murashige and Skoog, 1962), agar 6g/l $^{-1}$ and sucrose 30g/l $^{-1}$ at pH – 5.7.

The plants are grown in cultivation facilities at 22 ^{0}C, photoperiod of 16:8 (day: night hours) and Illuminance of 30μmol.m^{-2} .s^{-1}.

The following indicators are reported: number of infected and sterile explants, number of sterile and vital explants, and number of newly formed bulbs.

The multiplication factor is calculated using the following formula: MK%=NxA/100,

where N is number of newly formed bulbs (cuttings), A is percentage of multiplied plants. (Tsvetkov, 1998)

The diagrams represent average values ± SE from two separate independent experiments, with ten repetitions per variant. The authenticity of the data is analyzed through t test using the GraphPad Prizm software.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Направените изследвания установиха, че най-подходящ стерилизиращ агент е живачния двухлорид $HgCl_2$. – 0,1% с продължителност на действие върху растителните експланти 3 мин. – вар. 1. При по-дългия период на въздействие се получава по-голям брой стерилни експланти, които обаче не са жизнени за по-нататъчно развитие (Таблици 2 и 3). Загиването на експлантите вероятно се дължи на фитотоксичния ефект, който проявява $HgCl_2$.(Singh and Tiwari, 1998; Pandey et al., 2009).

Използваната концентация на белината (NaOCl-1%) не показа по-добри резултати от използването на $HgCl_2$. При нея се наблюдава получаване на по-голям брой нестерилни експланти при краткотрайното третиране и занижаване на броя на жизнените стерилни експланти при удължаване периода на третиране.

При дивите видове лилиум най-голям брой жизнени стерилни експланти са получени при *Lilium rhodopaeum* – 18 (Таблица 2). От сортовете лилиум с най-добри резултати се откроява сорт Ана-Мария – 19 (Таблица 3).

RESULTS AND DISCUSSION

The research shows that most effective sterilizing agent is the Mercuric Chloride, applied at 0,1% concentration over a period of 3 minutes on the plant explants (Variant 1).

If it is applied for a longer period, higher numbers of sterile explants are produced, but they are not vital for further growth. (Tables 2 and 3).

Destruction of explants likely due to the phytotoxic effect of HgCl2. (Singh and Tiwari, 1998, Pandey et al. 2009).

The experiments involving usage of Sodium Hypochlorite (NaOCl-1%) in the form of commercial bleach do not show better results: a greater number of non-sterile explants in the short-term treatment and reduction of the vital sterile explants during extended treatment periods.

Within the wild varieties of Lilium, the highest number of sterile explants is received from *Lilium rhodopaeum* -18. (Table 2). From the Bulgarian varieties of Lilium, best results are obtained from Ana-Maria variety – 19 (Table 3).

Таблица 2. Стерилизация при лилиум – Диви видове
Table 2. Sterilization at lilies – Wilds species

Вариант№ Variant №	I отчитане / I reporting (5 ден / 5 days)		II отчитане / II reporting (14 ден / 14 days)		Живи стерилни експланти Брой Live sterile explants number
	Заразени Infected Брой / Number	Стерилни Sterile Брой / Number	Заразени Infected Брой / Number	Стерилни Sterile Брой / Number	
		LILIUM RHODOPAEUM			
Вар.1 / $HgCl_2$ 0.1 % -3min/	2	28	12	18	18
Вар.2/$HgCl_2$ 0.1 % -10min/	0	30	5	25	10
Вар. 3/NaOCl 1 %-3min/	13	17	22	8	8
Вар. 4/ NaOCl 1 %-10min/	5	25	9	21	10
		LILIUM ALBANICUM			
Вар.1 / $HgCl_2$ 0.1 % -3min/	5	25	15	15	15
Вар.2/$HgCl_2$ 0.1 % -10min/	0	30	10	20	13
Вар. 3/NaOCl 1 %-3min/	17	13	21	9	9
Вар. 4/ NaOCl 1 %-10min/	8	22	12	18	11
		LILIUM MARTAGON			
Вар.1 / $HgCl_2$ 0.1 % -3min/	11	19	13	17	16
Вар.2/$HgCl_2$ 0.1 % -10min/	2	28	15	15	13
Вар. 3/NaOCl 1 %-3min/	11	17	21	9	8
Вар. 4/ NaOCl 1 %-10min/	1	29	9	21	10

Таблица 3. Стерилизация при лилиум – Български сортове
Table 3. Sterilization at lilies – Bulgarian varieties

Вариант№ Variant №	I отчитане / I reporting (5 ден / 5 days)		II отчитане / II reporting (14 ден / 14 days)		Живи стерилни експланти Брой Live sterile explants number
	Заразени Infected Брой / Number	Стерилни Sterile Брой / Number	Заразени Infected Брой / Number	Стерилни Sterile Брой / Number	
		АНДРОС /ANDROS			
Вар.1 / $HgCl_2$ 0.1 % -3min/	9	20	12	18	18
Вар.2/ $HgCl_2$ 0.1 % -10min/	2	28	16	14	9
Вар. 3/ NaOCl 1 %-3min/	18	12	21	8	8
Вар. 4/ NaOCl 1 %-10min/	5	25	12	18	10
		НЕГОВАН /NEGOVAN			
Вар.1 / $HgCl_2$ 0.1 % -3min/	10	20	15	15	15
Вар.2/$HgCl_2$ 0.1 % -10min/	0	30	17	13	9
Вар. 3/NaOCl 1 %-3min/	16	14	26	4	4
Вар. 4/ NaOCl 1 %-10min/	10	20	15	15	9
		МАРИНА /MARINA			
Вар.1 / $HgCl_2$ 0.1 % -3min/	9	21	13	17	17
Вар.2/$HgCl_2$ 0.1 % -10min/	3	27	18	12	10
Вар. 3/NaOCl 1 %-3min/	12	18	23	7	7
Вар. 4/ NaOCl 1 %-10min/	5	25	14	16	8
		ПОЛИ /POLI			
Вар.1 / $HgCl_2$ 0.1 % -3min/	15	15	17	13	13
Вар.2/$HgCl_2$ 0.1 % -10min/	6	24	18	12	10
Вар. 3/NaOCl 1 %-3min/	19	11	25	5	5
Вар. 4/ NaOCl 1 %-10min/	7	23	11	19	10
		АНА-МАРИЯ /ANA MARIA			
Вар.1 / $HgCl_2$ 0.1 % -3min/	10	20	11	19	19
Вар.2/$HgCl_2$ 0.1 % -10min/	5	25	15	15	9
Вар. 3/NaOCl 1 %-3min/	14	16	22	8	8
Вар. 4/ NaOCl 1 %-10min/	6	24	14	16	11

В направеното изследване се установи видова и сортова разлика в процеса на мултипликация в ин витро условия. При дивите видове най-висок мултипликационен коефициет е отбелязан за *Lilium albanicum Griseb* – 4.68% със среден брой новообразувани луковички 5.2 (Фигура 1).

Arzate-Fernández et al. (2007) също получава голям брой новообразувани луковички 4±0.2 от *L. maculatum* var. *Bukosanense* залагайки изходния материал от люспи, в среда без растежни регулатории и на светло.

При българските сортовете най-висок мултипликационен коефициент е установен при сорт „Поли” – 2.22%, със среден брой новообразувани луковички 3,7 (Фигура 2).

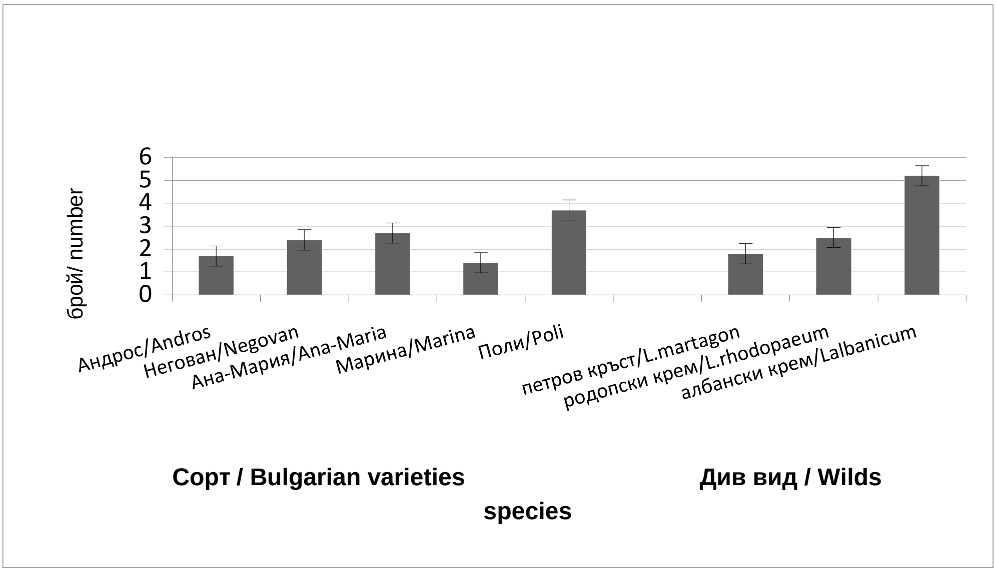
Kapoor (2008) в свое изследване върху сортове азиатски и ориенталски хибриди установяват липсата на мултипликация в среда без участието на растежни регулатори. Stimart and Ascher (1978) считат, че независимо от вида или сорта Лилиум – броят на новобразуваните луковички варира между 3-5, което бе потвърдено и от нашите изследвания.

During the research, the different species and varieties show difference in the multiplication process in *in vitro* conditions. Within the wild species, highest multiplication coefficient is observed in *Lilium albanicum Griseb* – 4.68%, with average number of newly formed bulbs of 5.2 (Figure 1).

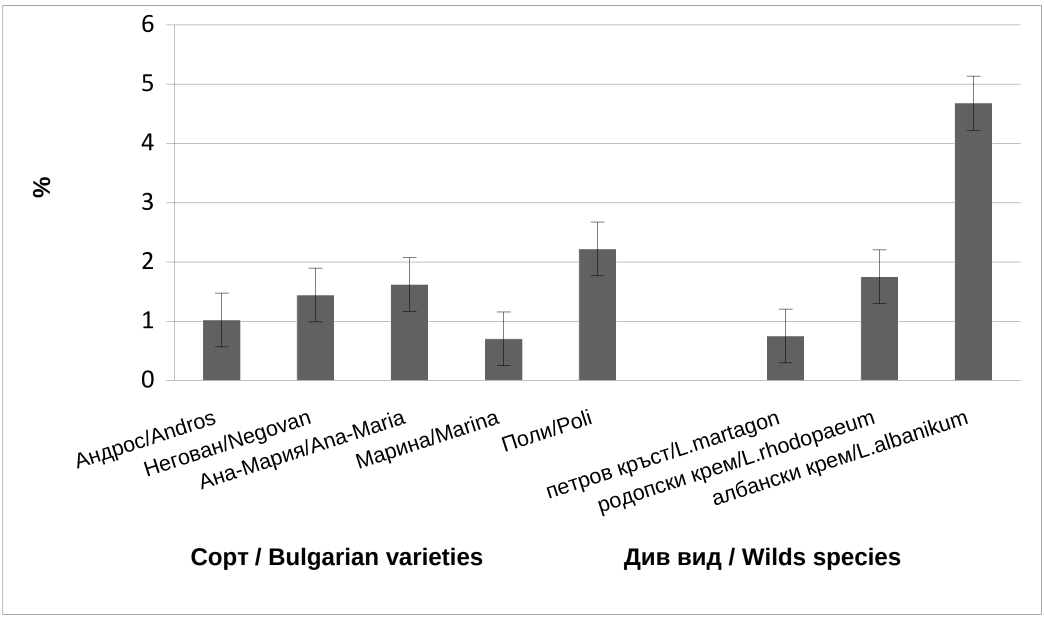
Arzate-Fernández et al. (2007) also receives high number of newly formed bulbs 4±0.2 from *L. maculatum var. Bukosanense*, placing them under light conditions in medium without growth regulators.

Within the Bulgarian varieties of Lilium, “Poli” shows the highest multiplication coefficient – 2.22%, with average number of newly formed bulbs 3,7 (Figure 2).

In own research performed with varieties of Asian and Oriental hybrids, Kapoor (2008) identified lack of multiplication in medium without usage of growth regulators. In 1978, Stimart and Ascher determined that the number of newly formed bulbs varies between 3 and 5, regardless of the species or variety of Lilium. This is also confirmed by our research.



Фиг. 1. Новообразувани луковички от лилиум
Fig. 1. Number of newly formed bulbs *of Lilium*



Фиг. 2. Мултипликационен коефициент при Лилиум
Fig. 2. Multiplication coefficient *of Lilium*

ИЗВОДИ

Анализирайки получените в изследването резултати се установи:

1. Стерилизиращият агент, при който се получават най-голям брой стерилни жизнени експланти е живачния двухлорид – 0,1% с продължителност на действия върху растителните експланти 3 мин. (вар. 1);

2. При *Lilium rhodopaeum* и сорт Ана Мария са отченени най-голям брой стерилни жизнени експланти;

3. При дивите видове, най-висок мултипликационен коефициент е отбелязан за *Lilium albanicum Griseb* – 4.68% със среден брой новообразувани луковички 5.2;

4. От българските сортове с най-висок мултипликационен коефициент се откроява сорт „Поли" – 2.22%, със среден брой новообразувани луковички 3,7.

CONCLUSIONS

The research shows the following results:

1. The highest number of sterile and vital explants is obtained with the usage of $HgCl_2$ as sterilizing agent, applied at 0,1% concentration over a period of 3 minutes on the plant explants. (Variant 1);

2. The highest number of sterile and vital explants is observed in *Lilium Rhodopaeum* and *„Ana Maria"* variety*;*

3. Within the wild species, the highest multiplication coefficient is determined in *Lilium albanicum Griseb* – 4.68% with average number of newly formed bulbs 5.2;

4. Within the Bulgarian varieties of Lilium, the highest multiplication coefficient is determined in "Poli" variety – 2.22% with average number of newly formed bulbs 3.7

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Arzate-Fernández A. M., Miwa M., Shimada T., Yonekura T., Ogawa K. In vitro propagation of miyamasukashi-yuri (Lilium maculatum Thunb. var. Bukosanense), an endangered plant species..*Revista Fitotecnia Mexicana*, 2007,*30* (4), 373-379.

2. Chang C., Chen C. T., Tsai Y. C., Chang W. C. A tissue culture protocol for propagation of a rare plant, Lilium speciosum Thunb. var. gloriosoides Baker. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 2000, 41.

3. **Kanchanapoom K., Ponpiboon T., Wirakiat W., Kanchanapoom K.** Regeneration of lily (Lilium longiflorum 'Easter lily') by callus derived from leaf explants cultured in vitro. *Sci. Asia*, 2011, *37*, 373-376.

4. **Kapoor R., Kumar S., Kanwar J. K.** Bulblet regeneration from ex vitro root explant in lily hybrids. *Horticultural Science, Prague*, 2008, *3* (3), 107-112.

5. **Kumar S., Sharma D.R., Sharma Y.D., Pathania N.S.** Influence of growth regulators and nitrogenous compounds on *In vitro* bulblet formation and growth in oriental lily. *Horticultural Science*, 2007, 34 (2): 77-83.

6. **Lian M.-L., Murthy H.N., Paek K.-Y.** Effects of light emitting diodes (LEDs) on the *In vitro* induction and growth of bulblets of *Lilium* oriental hybrid ‘Pesaro’. *Scientia Horticulturae*, 2002 94 (3): 365-370.
7. **Murashige T. and Skoog F.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Phisiol. Plant,* 1962, 15, pp. 473-479.
8. **Pandey R.K., Singh A.K., Sharma M.** In vitro propagation of lilium. *Biologica forum-An international Journal*, 2009, 1 (2): 20-22.
9. **Parić A., Čakar J., Muratović E., Karalija E.** Induction of bulblets on leaf and bulb explants of endangered Lilium bosniacum (G. Beck) G. Beck ex Fritsch. *Botanica Serbica*, 2011, *35*, 31-35.
10. **Pelkonen V. P.** Biotechnological approaches in lily (Lilium) production. 2005, University of Oulu, 21-22.
11. **Saifullah K., Sheeba N., Mariam R., Naheed K., Asma N., Bushra S.** Cultivation of lilies (Lilium regale) for commercialization in Pakistan. *Pak. J. Bot*, 2010, *42* (2), 1103-1113.
12. **Skorić, M., Živković, S., Savić, J., Šiler, B., Sabovljević, A., Todorović, S., & Grubišić, D.** Efficient one-step tissue culture protocol for propagation of endemic plant, Lilium martagon var. cattaniae Vis. *African Journal of Biotechnology,* 2014, 11, 8, 1862-1867.
13. **Stimart D P, Ascher P D.** Tissue culture of bulb scale sections for asexual propagation of *Lilium longiflorum* Thunb. *J. Amer. Soc.Hort. Sci.,* 1978, 103: 182-184.
14. **Tsvetkov I.** Propagation of mature specimen of mulberry (Morus alba L. “Pendula”) by tissue culture. *IPPS in Third Scientific Conference – 3-5 October*, 1998, Sofia, 129-133.
15. **Singh R. and Tiwari J.P.** In vitro clonal propagation of jackfruit (Artocarpus heterophyllus lamk.) *J.P. Indian J. Hort*., 1998, 55 (3): 213-217.

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, vol. 19, 1, 2016, (256-273)
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan

Влияние на срока и начина на засаждане върху размножителния коефициент при гладиол *(Gladiolus* L.*)*

Йордан Атанасов*, Иванка Иванова, Бистра Атанасова

Институт по декоративни растения-София, 1222 Негован, България
**E-mail: yordan.d.atanasov@gmail.com*

Effect of planting dates and methods of growing on propagation coefficient in gladiolus

Yordan Atanasov*, Ivanka Ivanova, Bistra Atanasova

Institute of Ornamental Plants-Sofia,1222 Negovan, Bulgaria

РЕЗЮМЕ

Направено е проучване за влиянието на срока на засаждане и начина на отглеждане в полиетиленова оранжеия и при полски условия върху размножителния коефициент на грудко-луковиците и брой образувани детки от една грудколуковица при три сорта гладиол – Rose Supreme, White Prosperity и Her Majesty. Изпитани са 6 срока на засаждане през интервал от 15 дни (25 III, 10 Март, 25 Март, 10 Април, 25 Април и 10 Май) като първите три срока са заложени в поли-етиленова оранжерия, а останалите – на открито.

От двата начина на отглеждане размножителният коефициент и броят на формираните детки от една грудко-луковица при сорт Rose Supreme са най-високи при полски условия, като стойността на коефициента е най-голяма при срокове на засаждане 25.IV и 10.IV съответно 2.52 бр. и 2.02 бр., а при детките – 10.IV и 25.IV съответно 68.90 бр. и 63.16 бр.

При сортовете White Prosperity и Her Majesty различните срокове на засаждане и начинът на отглеждане не

SUMMARY

An experiment was carried out to study the effect of planting dates and methods of growing in a polyethylene greenhouse and field on propagation coefficient of corms and cormels produced by plant. The Gladiolus cv. Rose Supreme, cv. White Prosperity and cv. Her Majesty corms were planted in a polyethylene greenhouse and in the field on 6 various dates with a regular interval of 15 days i.e. (February 25, March 10, March 25, April 10, April 25 and May 10) as on the first three dates they were planted in a polyethylene greenhouse and on the last three dates in the field.

Planting dates had a significant effect on the propagation coefficient and the number of cormels formed from mother corm of gladiolus cv. Rose supreme. The best results of propagation coefficient were obtained from gladiolus planted on 25.IV and 10.IV, respectively 2.52 pcs. and 2.02 pcs. by mother corm. The largest number of cormels formed by corm was obtained from those planted on 10.IV and 25.IV respectively 68.90 pcs. and 63.16 pcs.

Planting dates of gladiolus cv. White Prosperity and cv. Her Majesty didn’t significantly affect the propagation оказват съществено влияние върху размножителния коефициент на грудколуковиците. Разликата между най-високата и най-ниската стойност е много малка и недоказана, съответно 0.39 бр. и 0.25 бр.

В сравнение с размножителния коефициент на грудколуковиците, броят на формираните детки при сорт White Prosperity се влияе, както от срока на засаждане, така и от начина на отглеждане. Най-голям брой детки от една грудколуковица са получени при трите проучени срока на открито – 10.IV, 25. IV и 10.V, съответно 38.12 бр., 30.25 бр. и 23.33 бр., докато при сорт Her Majesty броят на образуваните детки е най-висок при най-ранния срок на засаждане при полски условия (10.IV) – 65.63 бр., следван от трите срока, заложени в полиетиленовата оранжерия (25.II, 10.III, 25.III) – съответно 53.52 бр., 52.08 бр. и 41.08 бр.

Ключови думи: гладиол, размножителен коефициент, грудколуковица, детки, срок и начин на засаждане

coefficient from mother corm.

The variation between the highest and the lowest rate was respectively 0.39 pcs. and 0.25 pcs.

Unlike the propagation coefficient, the number of cormels formed by a mother corm of gladiolus cv White Prosperity and cv. Her Majesty was affected by the planting dates. The best results from the first cultivar were obtained in the field on 10.IV, 25.IV and 10.V respectively 38.12 pcs., 30.25 pcs. and 23.33 pcs.

Whereas the best results from the second cultivar were obtained in the field on the first date /10.IV/ – 65.63 pcs. followed by three dates in polyethylene greenhouse 25.II, 10.III and 25.II, respectively 53.52 pcs., 52.08 pcs., and 41.08 pcs.

Key words: gladiolus, propagation coefficient, corm, cormel, planting dates and methods of growing

УВОД

За да се задоволи търсенето на пазара е важно да се осигури целогодишна продукция на гладиол. (Jenkins, 1963, Jenkins et al., 1970.). са установили, че са необходими от 60 до 100 дни от засаждането до получаването на отрязан цвят като варира в зависимост от сорта и времето на годината Грудколковиците и детките са основния посадъчен материал за размножаването на гладиоли (Larson, 1992).

Дата на засаждане на грудколуковицате играе важна роля в регулирането на растежа и качеството на гладиола (Khan et

INTRODUCTION

The gladiolus is a very attractive flower and is the object of great consumer demand. To satisfy customer demand, it is important that the gladiolus flower be available all year round. Gladiolus spikes take 60 to 100 days after planting to be harvested depending upon the cultivars and time of year (Jenkins, 1963; Jenkins et al. 1970). These corms and cormels are the chief means of gladiolus propagation (Larson, 1992).

The date of planting plays an important role in regulating the growth and quality of the gladiolus (Khan *et al.* 2008.; Dod et al,.

al., 2008; Dod et al,. 1989; Saleem et al., 2013.). Изборът на подходящи срокове на засаждане влияе върху развитието и качество на цветната продукция, с цел задоволяване изискванията на потребителя (Zubair et al., 2006). Сроковете на засаждане варират в зависимост от фотопериодите, температурите и интензитета на светлината (Ahmad et al., 2011). Talia and Traversa (1986) са установили, че по-големи по размер грудколуковици са образувани при засажданите грудколуковици през февруари и март. Максимален брой цветоноси на едно растение са образувани при засаждане април-май, докато най-голям брой грудколуковици са получени през периода от март до април (Mukhopadhyay and Banker, 1981). Ahmad et al., 2011) съобщават, че растежът и добивът на гладиолите, подобно на други растения, зависи от подходящия срок на засаждане.

У нас Ivanova & Dimitrov, (2015) са установили, че при полски условия, по-ранният срок на засаждане на гладиол сорт Ива и Екатерина, влияе положително върху добива от грудколуковици в сравнение с по-късния срок на засаждане.

Настоящото изследване има за цел да проучи влиянието на срокове на засаждане и начини на отглеждане на гладиол върху размножителния коефициент на грудколуковици и детки.

1989; Saleem et al., 2013).

Vegetative growth and the quality of gladiolus is improved by proper planting times, leading to greater satisfaction of consumers' demands (Zubair et al., 2006). Planting schedule varies because of differences in photoperiods, temperatures and light intensity (Ahmad I. et al., 2011). Talia and Traversa (1986) mentioned that better size gladiolus corms were obtained from February and March plantings.

Maximum spikes per plant were obtained from April to May plantings while highest number of corms per plant in tuberose was obtained from March and April plantings (Mukhopadhyay and Banker, 1981). The growth and yield of gladiolus, like other plants, depend on proper planting time (Ahmad I. et al., 2011).

The earlier planting date had a positive effect on the formation of higher corm yield in both cv. *'Iva'* and cv. *'Ekaterina'* with 7.16 pcs./m^2 and 6.23 pcs./m^2, respectively, vs. the later planting date (Ivanova and Dimitrov, 2015).

This study investigates the effect of methods of growing and the timing of planting dates on propagation coefficient of corms and cormels produced by the gladiolus plant.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Проучването е направено в Института по декоративни растения-София, като за заложени опити за отглеждане при различни срокове на засаждане в оранжерийни и полски условия при три сорта гладиол – Rose Supreme, White Prosperity и Her Majesty.

Изпитани са 6 срока на засаждане през интервал от 15 дни (25 Февруари,10 Март, 25 Март,10 Април, 25 Април и 10 Май), първите три срока – в полиетиленова оранжерия, а в останалите три срока – на открито.

Всеки вариант е заложен в 3 повторения, с големина на опитната парцелка 3m^2, при гъстота на засаждане на грудколуковиците 25 бр./m^2, с размери 10/12 cm, дълбочинана засаждане 10-12 cm, с междуредово разстояние 25 cm.

Опитите са изведени на алувиално-ливадна почва, с лек механичен състав, със съдържание на хумус – 2.1%, pH във вода– 6.5. Преди засаждане грудколуковиците са третирани в разтвор от Роврал 50 ВП – 0,1%+ Топсин М - 0,15% + Би58 – 0,1% за 20 минути.

Бяха Отчетени са следните показатели: брой образувани грудколуковици/m^2, брой образувани детки от една майчина грудколуковица (Лидански, 1998). Размножителният коефициент е изчислен по следната формула:

MATERIAL AND METHODS

The research on the effect of planting dates and methods of growing in a polyethylene greenhouse and field on propagation coefficient of corms and cormels produced by plants was carried out at the Institute of ornamental plants–Sofia. Three cultivars of gladiolus– cv. Rose Supreme, cv. White Prosperity and cv. Her Majesty were tested. Corms were planted in a polyethylene greenhouse and in the field on 6 various dates with a regular interval of 15 days (i.e. February 25, March 10, March 25, April 10, April 25 and May 10). On the first three dates they were planted in a polyethylene greenhouse and on the last three dates in the field.

The tests were performed with second size corms, 25 pieces per square meter in three replications, planted in a 3 m^2 plot at a depth of 10-12 cm.

The trial took place on alluvial-meadow soil (pH in H_2O – 6.5) with humus content of 2.1 %.

Before planting, cormels were treated with hot water solution of fungicides and insecticides for 20 mimutes.

The following variables were recorded: number of formed corms/m^2, number cormels formed by a mother corm (Lidanski, 1998). The propagation coefficient was calculated by the following formula:

$$R = \frac{M}{m}$$

където: M – брой формирани грудколуковици; m – брой засадени грудколуковици; R – размножителен коефициент на грудколуковиците

Биометричните данни са отчетени при всички грудколуковици засадени във всяко повторение. Данните са обработени статистически (IBMSPSSStatistics 19).

Гладиолите са отглеждани по утвърдената технология за производство при полски условия (Бистричанов и др. 2008).

Изборът на сроковете на засаждане е съобразен с изискванията на културата към температурата. Засаждането е започнало след трайно достигане на почвената температура на 10 ^{o}C.

Изваждането на грудколуковиците е извършено ръчно, при пожълтяване на 2/3$^{-ти}$ от листната маса на растенията, след което грудколуковиците бяха просушени, почистени и сортирани по фракции: първа над 14 cm, втора от 12-14cm, трета от 10-12 cm, четвърта от 8-10, пета от 6-8 cm и детки под 6 cm.

where: M – number of formed corms; m – number of planted corms; R – propagation coefficient

The biometric indexes were recorded on all tagged plants in each replication. The data were processed statistically (IBMSPSSStatistics 19).

The gladioli were grown according to the technology for the production of gladiolus cut flower in the open (Bistrichanov et al., 2012).

The selection of planting dates was in compliance with the culture’s requirements for the soil temperature. Planting began after the soil reached the temperature of 10 ^{o}C consistently.

Purging of corms was done manually, after yellowing 2/3rd of the foliage, corms were dried, cleaned and sorted in fractions: the first size – over 14 cm in diameter, second size- from 12 to 14 cm, third size – 10-12 cm, fourth size – 8-10 cm, fifth size – 6-8 cm and cormels less than 6 cm.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Полиетиленова оранжерия

При отглеждане в полиетиленова оранжерия при сорт Rose Supreme най-голям брой грудколуковици (145 бр.) са получени при първия срок на засаждане 25.II, докато при следващите два срока – 10.III и 25.III те са съответно по-малко с 18.62% и 24.83% в сравнение с първия

RESULTS AND DISCUSSION

Greenhouse conditions

The best propagation results for growing cv. Rose Supreme under greenhouse conditions were obtained from the first planting date 25.II – 145 corms, while the next two dates 10.III and 25.III were respectively less productive with 18.62% and 24.83% compared to the first date (Fig. 1).

срок (Фиг.1). Разликата между броя на грудколуковици при втория и третия срок е 9 бр. и липсва доказаност.

При производството на гладиол от съществено значение е не само общия брой получени грудколуковици, а броят на образуваните грудколуковици първи и втори размер, които се използват като посадъчен материал за отрязан цвят.

При този сорт броят на получените грудколуковици първи размер и при трите срока на засаждане е най-голям и варира от 51.69% до 53.21% от общия брой. Най-голям брой грудколуковици втори размер са получени при най-късния срок – 12 бр. или 11% от общия брой, следван от втория срок 8 бр. (6.77%) и най-малко – при първия срок с 2 бр. или 1.38% (Фиг. 2).

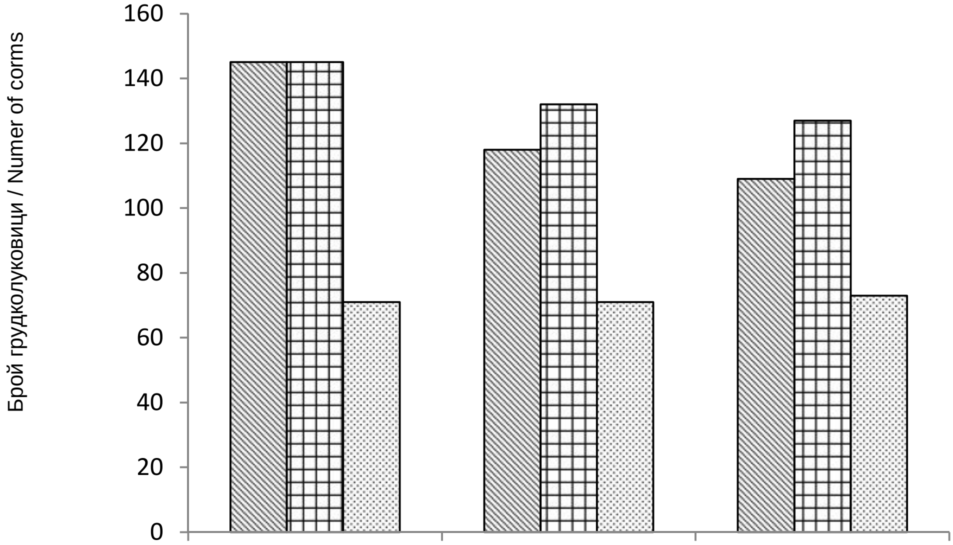
Най-голям брой детки при сорт Rose Supreme са образувани при първия срок на засаждане средно 26.21 бр. от една майчина грудколуковица, следвани от тези при третия и втория срок, съответно 18.63 бр. и 16.06 бр., като разликата между варианта с най-малък и най-голям брой образувани детки е 10.15 бр. и статистически доказана при (P≥0.05) (Фиг. 3).

The difference in the number of corms between the second and third planting date is 9 pcs. and it is not statistically proved.

In the production of gladiolus, not only the total number of formed corms is important but also the number of first and second size corms, which are used for planting for cut flowers.

The number of formed corms of the first and second sizes in this cultivar ranges from 51.69% to 53.21% on the first three planting dates. The largest number of second size corms were the product of the latest date - 12 pcs. or 11% of all, followed by the second date – 8 pcs. (6.77%) and the smallest number – first date with 2pcs. or 1.38% (Fig. 2).

The largest number of cormels in cultivar Rose Supreme were formed from the first planting date – an average of 26.21 pcs. from one mother corm,. This was followed by the third and second date – respectively 18.63 pcs. and 16.06 pcs., the difference between the planting dateswith the lowest and highest number of formed cormels is 10.15 pcs. This result is statistically significant (P≥0.05) (Fig. 3).



Доказаност / Statistically proved:
* – P ≥ 0.05; ** – P ≥ 0.01; *** – P ≥ 0.001

Фиг.1. Брой грудколуковици формирани при различните срокове на засаждане при условия на полиетиленова оранжерия
Fig. 1. Number of corms formed on different planting dates on of greenhouses conditions

При отглеждане в полиетиленова оранжерия от трите проучени срока на засаждане найвисок размножителен коефициент на грудколуковици при сорт Rose Supreme е получен при най-ранния срок (25.02) – 1.93 бр., докато при втория и третия срок той е по-малък съответно с 0.36 бр. и 0.48 бр. и тези разлики са минимални и недоказани спрямо първия срок.

При гладиол сорт White Prosperity при първия срок на засаждане е отчетен най-голям брой образувани грудколуковици – 145 бр., докато при втория и третия срок техният брой е по-малък съответно с 8.96% и 12.41% и статистически не дока-

The results show that highest propagation coefficient of corms in cultivar Rose Supreme is obtained from the first date (25.II) – 1.93 pcs., While the second and third date are respectively less productive with 0.36 pcs. and 0.48 pcs. These differences are minimal and unproven compared to the difference between these later dates and the first date.

The largest number of formed corms were obtained from the first planting date in cultivar White Prosperity – 145 pcs., while on the second and third date their number was less – respectively 8.96% and 12.41% and statistically insignificant (Fig. 1) зан (Фиг. 1). И при този сорт броят на получените грудколуковици първи размер и при трите срока на засаждане е най-голям и варира в границите от 50.34% до 55.91% от общия брой. Най-голям брой грудколуковици втори размер са образувани при най-ранния срок – 35 бр. (или 24.14% от общия брой), следвани от втория и третия – съответно 27 бр. и 22 бр.(Фиг. 2).

Like the previous cultivar, in this one the number of formed corms first size range from 50.34% to 55.91%.

The largest number second size corms are formed from the first planting date – 35 pcs. (or 24.14% of all), followed by the second and third respectively – 27 pcs. and 22 pcs. (Fig. 2).

Доказаност / Statistically proved:
* – P ≥ 0.05; ** – P ≥ 0.01; *** – P ≥ 0.001

Фиг. 2. Формираните грудколуковици по размер спрямо сроковете на засаждане при условия на полиетиленова оранжерия
Fig. 2. Formed corms in different size compared to planting dates on greenhouses conditions

При най-ранния срок на засаждане в полиетиленова оранжерия са отчетени най-голям брой образувани детки от една грудколуковица – средно 17.10 бр., докато при втория и третия срок техният брой е по-малък и недоказан съответно с 3.5 бр. и 4.98 бр. (Фиг. 3)

Най-висок размножителен

The greatest number formed cormels by a mother corms is from the first planting date – an average of 17.10 pcs., while the second and third date their number is less by 3.5 pcs. and 4.98 pcs. a statisticallly insignificant difference (Fig. 3)

The best results for the

коефициент на грудколуковици при сорт White Prosperity е получен при най-ранния срок на засаждане – 1.93 бр., следван от втория и третия срок съответно 1.76 бр. и 1.69 бр. Разликата в размножителния коефициент между 3-те срока на засаждане е несъществена в границите от 0.17% до 0.24% и няма доказаност (Фиг. 1).

При сорт Her Majesty разликата в броя на получените грудколуковици при трите срока на засаждане е минимална – 0.66 % или 2 бр. (Фиг. 1). При него са формирани предимно грудколуковици първи размер, като процентът им при най-ранния срок на засаждане е много висок – 92.95% от общия брой, а при третия и втория срок– съответно 78.08% и 73.24%. Броят на грудколуковици втори размер и при трите срока на засаждане варира в границите от 2,81% до 8,41% от общия брой (Фиг. 2).

Най-голям брой детки от една майчина грудколуковица при сорт Her Majesty са образувани при най-ранния срок на засаждане 25.II средно 53.52 бр.,като разликата в броя с втория срок е много малък и недоказан – само 0.72 бр. и с 12.48 бр. по-малък при най-късния срок (Фиг. 3).

Най-голям размножителен коефициент на грудколуковици при сорт Her Majesty е получен при най-късния срок на засажда-

propagation coefficient in cultivar White Prosperity were obtained from the first planting date – 1.93 pcs., followed by the second and third date respectively 1.76 pcs. and 1.69 pcs. The difference in propagation coefficient between the 3 planting dates is insignificant (it is not statistically proved) and in this cultivar gladiolus and ranges from 0.17% to 0.24% (Fig. 1).

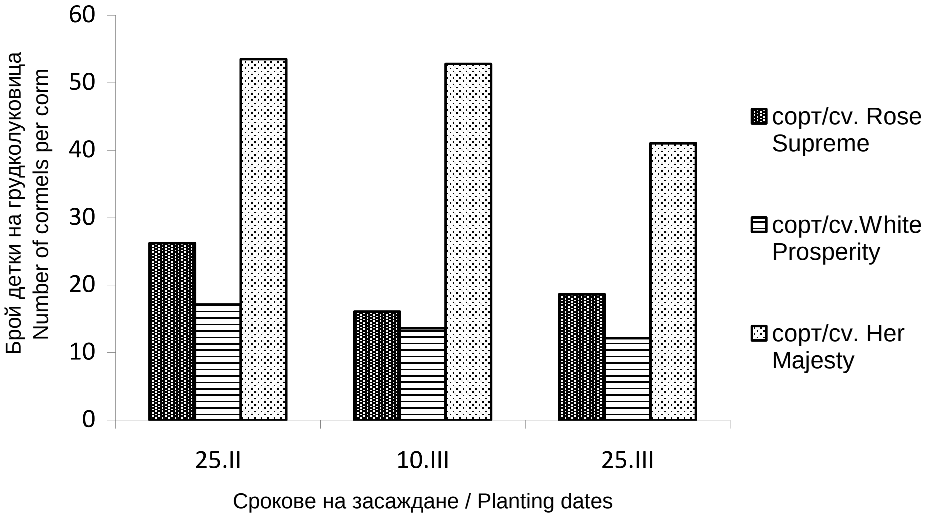
The difference in the number of formed corms in cultivar Her Majesty from the three planting date is minimal – 0.66% or 2 pcs. (Fig. 1). The corms which are mainly formed are first size, and their percentage in the first date of planting is very high – 92.95%, while the third and the second date have a lower proportion of first size corms – respectively 78.08% and 73.24%.

The number of second size corms on the planting dates ranges from 2.81% to 8.41% (Fig. 2).

The largest number of cormels formed by a mother corm in cultivar Her Majesty are obtained from the first planting date 25.II—an average of 53.52 pcs., The difference in the number of formed cormels between the first and second date is very small - only 0.72 pcs. and 12.48 pcs. fewer than the third date (Fig. 3).

The highest rate of propagation coefficient in cultivar Her Majesty was obtained from the latest planting date – 0.97 pc. and не – 0.97 бр. и разликата с размножителния коефициент при останалите два срока е много малка и недоказана – 0.02 бр.

the difference between the other two dates is very small and statistically insignificant – 0.02 pc.



Доказаност / Statistically proved:
* – P ≥ 0.05; ** – P ≥ 0.01; *** – P ≥ 0.001

Фиг. 3. Брой формирани детки на грудколуковица спрямо сроковете на засаждане при условия на полиетиленова оранжерия
Fig. 3. Number of cormels formed by a mother corm compared to planting dates on greenhouses conditions

ПОЛСКИ УСЛОВИЯ

При отглеждане на открито (полски условия) при сорт Rose Supreme най-благоприятен за образуването на грудколуковици се е оказал вторият срок на засаждане 25.IV, при който са получени 169 бр., като при първия и третия срок срок броят им е намалял съответно с 10.05% и с 46.74%, като е установена добра доказаност (P≥0.01) на разликата между втория и третия срок (Фиг. 4).

При първите два срока на

FIELD CONDITIONS

The best results of propagation coefficient in field conditions in cultivar Rose Supreme were obtained from the second planting date 25.IV. From which date, 169 pcs. of corms were formed, while the first and third date decreased respectively by/to? 10.05% and 46.74%, a statistically significant difference (P≥0.01) in the between the second and third planting date (Fig. 4).

The number of formed corms

засаждане са се формирани по равен брой грудколуковиците първи размер – 105 бр., а при третия срок броят им е значително по-малък – с 31 бр. и доказан (при P≥0.01). Разликата в броя на грудколуковици втори размер между първия и втория срок е само 1 бр.(Фиг. 5).

Най-голям брой детки на една майчина грудколуковица са образувани при най-ранния срок на засаждане на открито средно 68.90 бр., следвани от втория срок, при който са получени само с 5.74 бр. детки по малко, (няма доказаност) и при последния срок разликата в броят им с тези при първия срок е доказано намаляла при средно 45,03 бр. при (P≥0.01) (Фиг. 6).

Най-висок размножителен коефициент на грудколуковици при сорт Rose Supreme е отчетен при първите двата срока на засаждане съответно 2.25 бр. и 2.02 бр., докато при третия срок той е намалял спрямо тях съответно с 1.05 бр. и 0.82 бр. (P≥0.01).

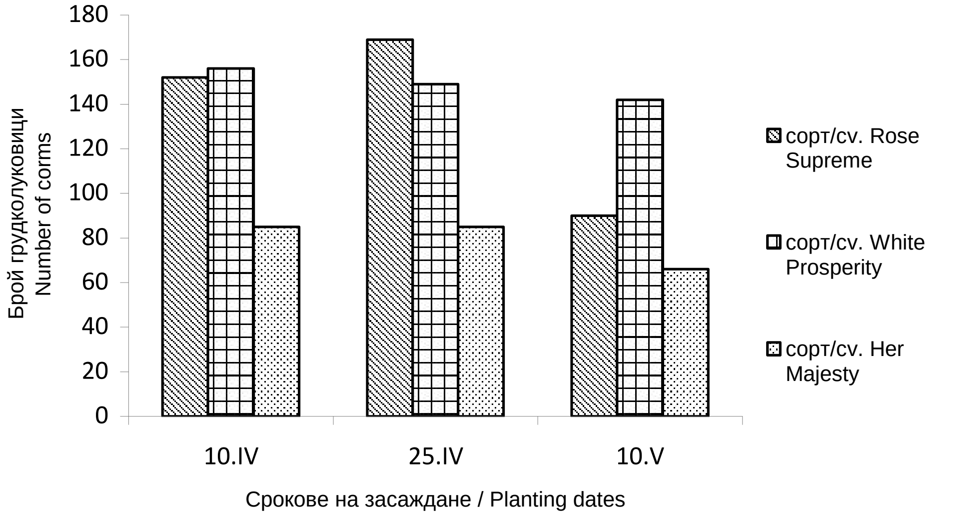
При сорт White Prosperity най-голям брой грудколуковици са получени при срок на засаждане 10.IV, който превишава съответно с 4.49% и 8.97% броя на получените грудколуковици при следващите два срока, но разликата е малка и липсва доказаност (Фиг. 4).

of the first size is equal between the first two planting dates – 105 pcs., but the number from the third date is considerably smaller – 31 pcs., a statistically significant difference (P≥0.01). The difference in the number of corms of the second size between the first and second date is only 1 pcs. (Fig. 5).

The largest number of cormels by a mother corm was from the first planting date in field– an average of 68.90 pcs., followed by the second date in which were formed 5.74 pcs. cormels feqwe (not proven), while the latest planting date their number decreased to average of 45.03pcs. This is significantly different, compared to the first period, proven. at (P≥0.01) (Fig. 6).

The highest propagation coefficient of corms in cultivar Rose Supreme were obtained from the first two planting dates respectively 2.25 pcs. and 2.02 pcs., while the third date was lower by 1.05 pcs. compared to the first date and 0.82 pcs. compared to the second date (P≥0.01).

The largest number of cormels were formed from planting date 10.IV in cultivar White Prosperity, which exceeds the number of formed cormels from the next two dates with 4.49% and 8.97%, respectively statisticaly not proved (Fig. 4).



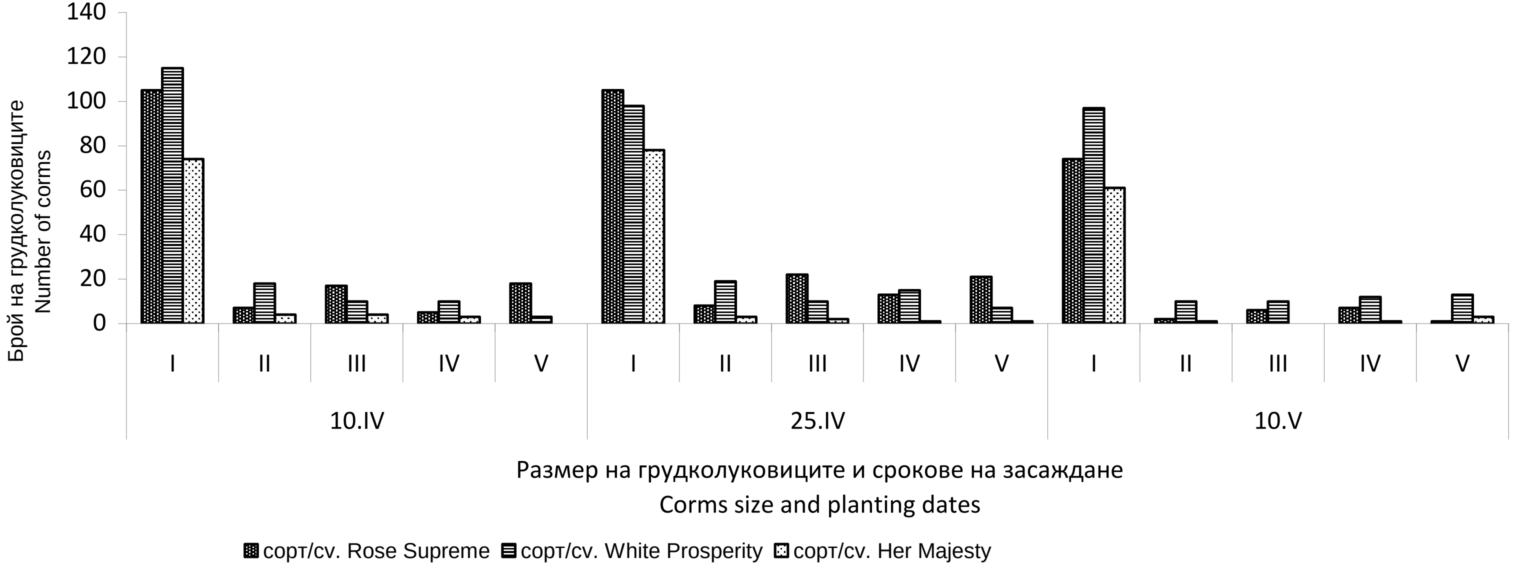
Доказаност / Statistically proved:
* – P ≥ 0.05; ** – P ≥ 0.01; *** – P ≥ 0.001

Фиг. 4. Брой грудколуковици формирани при различните срокове на засаждане при полски условия
Fig. 4. Number of corms formed on different planting dates on of field conditions

При този сорт броят на грудколуковиците първи размер получени при най-ранния срок на засаждане на открито превишава с 17 бр. и с 18 бр. тези при втория и третия срок. От трите срока на засаждане най-голям брой грудколуковици втори размер са образувани при втория срок 25.IV – 19 бр. или 12.75% от общия брой, следвани от първия и трети срок съответно с 18 бр. и с 10 бр. по-малко (Фиг. 5).

The number of first size corms which were formed from the first planting date was with 17 pcs. and 18 pcs. greater than those in the second and third date.

The largest number corms of the second size were formed from the second date 25.IV – 19 pcs. or 12.75 % followed by the first and third date by 18 pcs. and 10 pcs. fewer (Fig. 5).



Доказаност / Statistically proved:
* – P ≥ 0.05; ** – P ≥ 0.01; *** – P ≥ 0.001

Фиг. 5. Формираните грудколуковици по размер спрямо сроковете на засаждане при полски условия
Fig. 5. Formed corms in different size compared to planting dates on field conditions

От една майчина грудколуковица най-голям брой детки са образувани при първия срок на засаждане средно 38.12 бр, докато при втория и третия срок броят им е по-малък съответно 20.65% и 38.8% (липсва доказаност) (Фиг. 6).

Най-висок размножителен коефициент на грудколуковици при сорт White Prosperity при полски условия е получен при срок на засаждане 10.IV – 2.08 бр., а разликата между втория и третия срок е много малка и недоказана съответно – 0.09 бр. и 0.19 бр.

При сорт Her Majesty са образувани равен брой грудколуковици при първите два срока на засаждане на открито, а при последния срок 10.V – този брой е по-малък с 22.35% (Фиг. 4). Най-голям брой грудколуковици първи размер са получени при срок на засаждане 25.04 – 78 бр., а при първия и последния срок броят им е намалял съответно с 4 бр. и 17 бр. Броят на грудколуковиците втори размер при трите срока на засаждане варира в границите от 1,52% до 4,71% от общия брой (Фиг. 5).

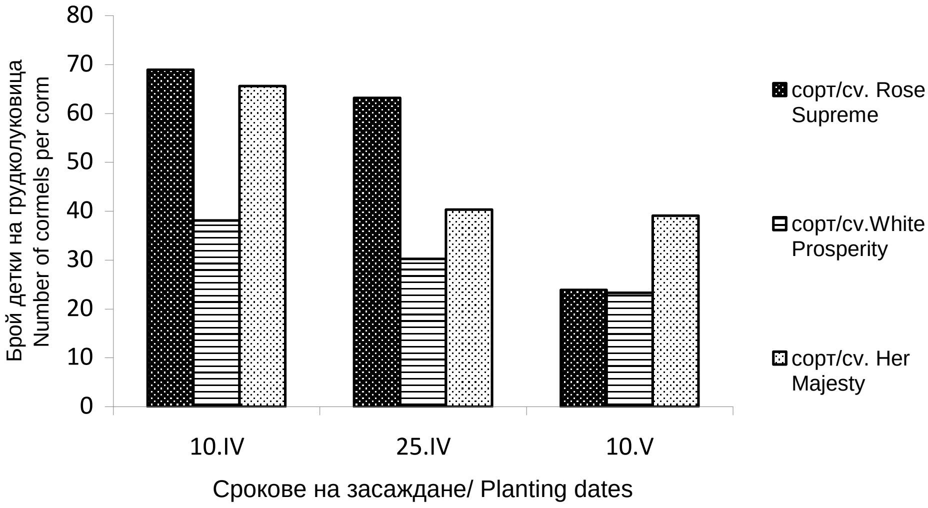
От трите срока на засаждане на открито най-голям брой детки от една луковица са образувани при най-ранния срок – средно 65.63 бр., докато при следващите два срока техният брой е по-нисък съответно с 25.27 бр. и 26.52 бр. (липсва доказаност) (Фиг. 6).

The largest number of cormels formed by a mother corm on the first planting date is an average of 38.12 pcs., while the number on the second and third date decreases by 20.65% and 38.8% (it is not statistically proved) (Fig. 6).

The highest propagation coefficient of corms in cultivar White Prosperity under field conditions was obtained from the planting date 10.IV – 2.08 pcs., and the difference between the second and third date is very small and unproven respectively – 0.09 pcs. and 0.19 pcs..

Equal number of corms were formed in cultivar Her Majesty from the first two planting date in the field, and from the last date 10.V this number is lower by 22.35% (Fig. 4). The largest number of corms of the first size were formed from planting date 25.IV 78 pcs., while from the first and last date the number decreased by 4 pcs. and 17 pcs. The number of corms of the second size in the three planting dates ranges from 1.52% to 4.71% (Fig. 5)

The highest number of cormels formed by a mother corm on the earliest date is an average of 65.63 pcs., while the number from the next two dates the number is lower, respectively 25.27 pcs. and 26.52 pcs. (it is not statistically proved) (Fig. 6).



Доказаност / Statistically proved:
* – P ≥ 0.05; ** – P ≥ 0.01; *** – P ≥ 0.001

Фиг. 6. Брой формирани детки на грудколуковица спрямо сроковете на засаждане при полски условия
Fig. 6. Number of cormels formed by a mother corm compared to planting dates on field conditions

Най-висок размножителен коефициент на грудколуковици при сорт Her Majesty при полски условия е получен при първия 10.IV и втория 25.IV срок на засаждане 1.13 бр., и най-нисък при най-късния срок – 0.88 бр., като разликата е несъществена и недоказана.

Най-висок размножителен коефициент на грудколуковици при сорт White Prosperity при полски условия е получен при срок на засаждане 10.IV – 2.08 бр., а разликата между втория и третия срок е много малка и недоказана съответно – 0.09 бр. и 0.19 бр.

The highest propagation coefficient of corms in cultivar Her Majesty under field conditions was obtained from the first and second date 10.IV 25.IV – 1.13 pcs. and was lowest from the latest date – 0.88 pcs., the difference is minor and unproven.

The highest propagation coefficient of corms in cultivar White Prosperity under field conditions was obtained from the planting date 10.IV – 2.08 pcs., and the difference between the second and third date is very small and unproven respectively – 0.09 pcs. and 0.19 pcs.

ИЗВОДИ

При сорт White Prosperity и сорт Her Majesty различните срокове на засаждане и начин на отглеждане не оказват съществено влияние върху размножителния коефициент и разликата е много малка и недоказана между най-високата и най-ниската стойност съответно 0.39 бр. и 0.25 бр. При сорт Rose Supreme най-висок размножителен коефициент на грудколуковици е получен при двата срока на засаждане 10.IV и 25.IV при полски условия и най-ранния срок в полиетиленовата оранжерия съответно 2.25 и 2.02 бр. и 1.93 бр.

От 6$^{-те}$ проучени дати на засаждане броят на образуваните грудколуковици първи размер е над 50%, като при сортовете Rose Supreme и White Prosperity при полски условия той е по-висок от този в полиетиленовата оранжерия. При сорт Her Majesty при трите срока на засаждане при полски условия и най-ранния срок 25.II в полиетиленова оранжерия процентът на първи размер грудколуковици е много висок от 87.06% до 92.95%.

При сорт White Prosperity броят на формираните детки от една майчина грудколуковица и при трите срока на засаждане при полски условия е по-голям от този в полиетиленова оранжерия. При сорт Rose Supreme при първите два срока на отглежда-

CONCLUSIONS

The different planting dates in cultivar White Prosperity and in cultivar Her majesty did not significantly affect the propagation coefficient and the difference is very small and unproven between the highest and lowest results respectively 0.39 pc. and 0.25 pc..

For the variety Rose Supreme the highest propagation coefficient of corms was obtained from both planting dates 10.IV and 25.IV under field conditions and the earliest date in greenhouse. The propagation coefficient was respectively 2.25 and 2.02 pcs. and 1.93 pcs..

Of 6 tested planting dates the number of size one formed corms is greater than 50%, while in cultivar Rose Supreme and White Prosperity this coefficient under field conditions is higher than in the plastic greenhouse. For the three planting dates under field conditions and from the earliest date 25.II in plastic greenhouses,the percentage of formed fist size corns varies from a high of 87.06% to 92.95% in cultivar Her Majesty.

The number of formed cormels by a mother corm in cultivar White Prosperity for the three planting dates under field conditions is higher than the same dates in a plastic greenhouse. In the variety Rose Supreme for the first two planting dates in the field не на открито са образувани най-голям брой детки от една грудколуковица съответно 68.91 бр. и 63.16 бр. Най- голям брой детки при сорт Her Majesty са получени при първия срок на засаждане на открито – 65.63 бр., а при останалите 5 срока – варират от 39.11 бр. до 53.52 бр.

Rose Supreme formed the largest number of cormels by a mother corm, respectively 68.91 pcs. and 63.16 pcs. The largest number of cormels formed in cultivar Her Majesty on the first planting date in the field was 65.63 pcs., while the other 5 dates ranged from 39.11 pcs. to 53.52 pcs.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Бистричанов С., Иванова И., Канински А., Атанасова Б., Якимова Е.** Авторско свидетелство за утвърден продукт за внедряване в практиката. 2008, Утвърден на заседание на Експертния съвет; *Протокол №14/10.04.2008 г.*

2. **Лидански Т.** Статистически методи в биологията и селското стопанство. 1998, Земиздат, София, стр. 375.

3. **Ahmad I., Khattak A. M., Ara N., Amin N. U.** Effect Of Planting Dates On The Growth Of Gladiolus Corms In Peshawar. *Sarhad J. Agric*, 2011, vol. 27, No.2, 195.

4. **Dod V. N., Saawarte K. T., Kulwal L. W., Vaidya S. W.** Effect of different dates of planting and size of corms on growth and flower yield of gladiolus. *PKV Res. J.*, 1989, 13: 164-165.

5. **Ivanova I. and Dimitrov D.** Influence of planting date on growth and yield of corms and cormels in *Gladiolus. Subtropical and ornamental horticulture*, 2015, 55:109.

6. **Jenkins J. M.** Characteristics of commercial gladiolus varieties. *North Amer. Gladiolus Council. Bullet.,* 1963, 75:37-38.

7. **Jenkins J.M.,. Milholland R. D, Lilly J. P., Beute. M. K.** Commrcial gladiolus production in North Carline. *N.C. Agric. Ext. Circ.,* 1970, 44: 1-34.

8. **Khan F. U., Jhon A. Q., Khan F. A., Mir. M. M.** Effect of planting time on

REFERENCES

1. **Ahmad I., Khattak A.M., Ara N., Amin N.U.** Effect Of Planting Dates On The Growth Of Gladiolus Corms In Peshawar. *Sarhad J. Agric*., 2011, vol. 27, No.2, 195.

2. **Bistrichanov S., Ivanova I., Kaninski A., Atanasova B., Iakimova E.** Technology for cut flower production in gladiolus in the open, 2008, Approved by the Expert Council of the Academy of Agricultural Science. *Protocol №14/ 10.04.2008* (In Bulgarian)

3. **Dod V. N., Saawarte K. T., Kulwal L. W., Vaidya S. W.** Effect of different dates of planting and size of corms on growth and flower yield of gladiolus*. PKV Res. J.,* 1989, 13: 164-165.

4. **Ivanova I. and Dimitrov D.** Influence of planting date on growth and yield of corms and cormels in *Gladiolus. Subtropical and ornamental horticulture*, 2015, 55:109-113.

5. **Jenkins J. M.** Characteristics of commercial gladiolus varieties*. North Amer. Gladiolus Council. Bullet.,* 1963, 75:37-38.

6. **Jenkins J. M., Milholland R. D., Lilly J. P., Beute M. K.** Commrcial gladiolus production in North Carline. *N.C. Agric. Ext. Circ.,* 1970, 44: 1-34.

7. **Khan F.U., Jhon A.Q., Khan F.A., Mir M.M.** Effect of planting time on flowering and bulb production of tulip conditions in Kashmir. *Indian J. Hort.,* 2008, 65(1): 0972-8538.

flowering and bulb production of tulip conditions in Kashmir. *Indian J. Hort*., 2008, 65(1): 0972-8538.
9. **Larson.** Introduction to floriculture*.* Acad. *Press*, 1992, London. 2: 147.
10. **Mubhopadhayay A. and Banker G. J.** Effect of time of planting on growth, flowering and bulb production in tuberose cv. "single". *Indian Instt. of Hort. Res.* Banglore, 1981.
11. **Saleem M., Ahmad I., Khan M. A.** Cultivar effects on growth, yield and cormel production of Gladiolus (Gladiolus grandiflorus L.). *Journal of Ornamental and Horticultural Plants*, 2013, 3 (1): 39-48.
12. **Talia M. C. and Traversa E.** The effect of time of planting and size of cormels of gladioli on the yield of corms for forced flower production. *Abst. Orn. Hort*, 1986, 14(3): 34.
13. **Zubair M., Wazir F. K., Akhtar S., Ayub G.** Planting dates affect floral characteristics of gladiolus under the soil and climatic conditions of Peshawar. *Pak. J. Biol. Sci.,* 2006, 9(9): 1669-1676.

8. **Larson.** Introduction to floriculture. *Acad. Press,* 1992, London*,* 2: 147.
9. **Lidanski T.** Statistical methods in biology and agriculture. Zemizdat, Sofia, 1998, p. 375 (in Bulgarian)
10. **Mubhopadhayay A. and Banker G. J.** Effect of time of planting on growth, flowering and bulb production in tuberose cv. "single". *Indian Instt. of Hort. Res.,* 1981, Banglore*.*
11. **Saleem M., Ahmad I, Khan M. A.** Cultivar effects on growth, yield and cormel production of Gladiolus (Gladiolus grandiflorus L.). *Journal of Ornamental and Horticultural Plants,* 2013, 3 (1): 39-48.
12. **Talia M. C. and Traversa E.** The effect of time of planting and size of cormels of gladioli on the yield of corms for forced flower production. *Abst. Orn. Hort*., 1986, 14(3): 34.
13. **Zubair M., Wazir F. K., Akhtar S., Ayub G.** Planting dates affect floral characteristics of gladiolus under the soil and climatic conditions of Peshawar*. Pak. J. Biol. Sci.,* 2006, 9(9): 1669-1676.