Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2018, 21 (2), 236-246
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan
ISSN 1311-0489 (Print)
ISSN 2367-8364 (Online)

Резултати от прилагането на минерално и органично торене върху стопанските качества на стевия (*Stevia Rebaudiana* B.)

Станимир Енчев*, Ахмед Мехмед, Георги Кикиндонов

Земеделски институт, 9700 Шумен, България

Application results of mineral and organic fertilization on economic qualities of Stevia (*Stevia Rebaudiana* B.)

Stanimir Enchev*, Ahmed Mehmed, Georgi Kikindonov

Agricultural Institute, 9700 Shumen, Bulgaria

**E-mail: stanimir_en@abv.bg*

Received: 15.05.2018 *Accepted:* 05.09.2018 *Published:* 20.09.2018

РЕЗЮМЕ

През периода 2013-2015 г в опитните полета на Земеделски институт-Шумен беше изведен полски опит в който е проучено влиянието на три органо-минерални продукти: Биоактив (100 ml/da) Хумустим (40 ml/da) и минерален азот (Амониев нитрат-20 kg/da) върху продуктивните качества на стевия (*Stevia Rabaudiana* B.). За опитните цели са използвани елитни коренища на българския сорт стевия Стела.

В резултат на проведения тригодишен опит е установено следното:
Най-висок добив на свежа биомаса получена от едно коренище се констатира от варианта, третиран с минерален азот (20 kg/da) – продуктивността на свежа маса от 1 коренище, средно за трите години на изпитване е 279.0 g/1 коренище (с 87.6 % повече от добива на нетретираната контрола). При показателя суха маса положителният ефект върху добива от прилагането на биопрепарата Хумустим е най-силен, като формира средно тегло на 1 коренище от 167.4 g (с 47.4% повече от

SUMMARY

An experiment has been conducted in the fields of the Agricultural Institute - Shumen from 2013 to 2015 for studying the effect of three organic and mineral products: Bioactive (100ml/da), Humustim (40 ml/da) and Mineral Nitrogen (Ammonium nitrate - 20 kg/da), on the productive qualities of Stevia (*Stevia Rebaudiana* B.). For the experimental purposes were used elite rhizomes of the Bulgarian Stevia kind “Stella”.

The results of the triennial experiment are the following:
The highest yield of fresh biomass obtained from one rhizome is established from the variant treated with Mineral Nitrate (20kg/ha) – productivity of fresh biomass from one rhizome, an average of three years of testing is 279.0g/1 rhizome (87.6% more than the yield of the untreated variant). The dry mass indicator shows that the application of the bio preparation Humustim has the highest positive effect on the yield, with an average weight of 167.4g for 1 (one) rhizome (47.4% more than the yield of the

добива на контролния вариант).

Органо-минералните продукти Хумустим и минерален азот оказват положително влияние върху реализирания добив зелена и суха маса стевия и през трите години на изпитване. Препаратът Биоактив не влияе съществено върху продуктивността на суха маса.

Ключови думи: стевия, органо-минерални продукти, продуктивност

control variant).

The organic and mineral products Humustim and Mineral Nitrogen have a positive influence on the yield of green and dry mass Stevia during those three years of testing. Bioactive does not have any significant affect on the dry mass productivity.

Key words: Stevia, organic and mineral products, productivity

УВОД

Стевията (*Stevia rebaudiana* Bertoni) е многогодишно, кръстосаноопрашващо се растение от сем. Сложноцветни (*Asteraceae*). Съдържа в листата си девет дитерпен гликозида с подслаждащи свойства-стевиозид, Ребаудиозид А, В, С, D, E, F, Дулкозид А и стевиолбиозид (Uchkunov et al., 2016a; Kaschieva and Todorova, 2017). Те са некалорични и от 30 до 300 пъти по сладки от захарта. (Geuns, 2004). Стевиозид и Ребаудиозид А се използват в хранителната промишленост като заместители на захарта (Uchkunov et al, 2016b). Разрешени са за употреба в България като подсладители с абревиетурата Е960 от Българската агенция за безопасност на храните (Kaschieva and Todorova, 2017). Други ценни вещества, които се съдържат в листата на растението са полизахариди, витамини-А, С, B_2, B_{12}, Fe, Mg, Na, Zn и др. (Kennely, 2002).

В България стевията се култивира от 1984 г в Института по захарно цвекло сега Земеделски институт-Шумен. Разработени са различни звена от технологията на отглеждането ú (Kikindonov, 2013). Включването на биопродукти в агротехнологиите се отразява благоприятно на растежа, развитието, продуктивността и устойчивостта към абиотичния и биотичен стрес на земеделските култури (Yakimov, 2013; Georgiev et al., 2015). Важно значение за стимулиране на биологичния потенциал на растенията има листното

INTRODUCTION

Stevia (*Stevia Rebaudiana* Bertoni*)* is a perennial, cross-pollinating plant from the *Asteraceae* family. It contains nine diterpene glycosides with sweetening properties – Stevioside, Rebaudioside A, B, C, D, E, F, Dulcoside A and steviol biosine (Uchkunov et al., 2016a; Kaschieva and Todorova, 2017). They are non-calorific and between 30 and 300 times sweeter than sugar (Geuns, 2004). Stevioside and Rebaudioside A are used in the food industry as a substitute for sugar (Uchkunov et al., 2016b). In Bulgaria, they are authorized for use as sweeteners, abbreviated as E960, by the Bulgarian Food Safety Agency (BFSA) (Kaschieva and Todorova, 2017). Other valuable substances, which can be found in the leaves of the plant, are polysaccharides, vitamin – A, C, B_{12}, B_2, Fe, Mg, Na, Zn and others (Kennely, 2002).

In Bulgaria, Stevia has been cultivated since 1984 in the former Sugar Beet Institute, now Agricultural Institute – Shumen. Various units of the cultivation technology have been developed (Kikindonov, 2013). Adding bio products to the agro-technology has a positive impact on the growth, development, productivity and sustainability to the abiotic and biotic stress of agricultural crops (Yakimov, 2013). Foliar fertilization has an important significance when stimulating the biological potential. It has a complementary and correctional effect,

торене. То има допълващ и коригиращ ефект, като компонент от цялостната система на минерално хранене (Kerin and Berova, 2003; Georgiev et al., 2015; Mihova et al., 2017). Засилено е вниманието върху листи торове с органичен произход, съдържащи хуминови киселини, микро и макро елементи (Petkova and Poryazov, 2007; Enchev and Kikindonov, 2015a; Enchev and Kikindonov, 2015b; Dochev et al., 2016a; Dochev et al., 2016b; Vasileva et al., 2016; 2017; Bozhanska et al., 2017).

Стевията има големи потребности от хранителни вещества и особено от N, P и K (Das Kuntal et al., 2007). Техният дефицит ограничава възможностите за получаване на висок добив листна продукция с оптимално съотношение на Ребаудиозид А и стевиозид (Geuns, 2003).

Редица изследователи са проучвали и доказали влиянието на различни биопродукти при стевия (Mamta et al., 2010; Lei Ma and Yan Shi, 2011; Špicnagel et al., 2011; Inugraha et al., 2014; Zaman et al., 2015; Enchev et al., 2018).

Целта на проучването е да се установи ефикасността от прилагането на органо-минерални продукти върху продуктивността на елитни коренища от българския сорт стевия Стела.

as a component of the whole mineral nutrition system (Kerin and Berova, 2013; Georgiev et al., 2015; Mihova et al., 2017). Enhanced attention has been paid on leaf fertilizers with organic origin, containing humic acids, micro and macro elements (Petkova and Poryazov, 2007; Enchev and Kikindonov, 2015a; Enchev and Kikindonov, 2015b; Dochev et al., 2016a; Dochev et al., 2016b; Vasileva et al., 2016; 2017; Bozhanska et al., 2017).

Stevia has great needs of nutritional substances, especially from N, P and K (Das Kuntal et all, 2007). Their deficiency limits the possibility of high leaf yield with optimal ratio of Rebaudioside A and stevioside (Geuns, 2003).

A number of researchers have studied and proved the influence of various bio products on Stevia (Mamta et al., 2010; Lei Ma and Yan Shi, 2011; Špicnagel et al., 2011; Inugraha et al., 2014; Zaman et al., 2015; Enchev et al., 2018).

The aim of the research is to establish the efficacy of the application of organic and mineral products on the productivity of elite rhizomes of the Bulgarian Stevia kind “Stella”.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Изследването е проведено през 2013-2015 г., в опитното поле на Земеделски институт-Шумен. Проучено е влиянието на биопрепаратите: Биоактив (100 ml/da), Хумустим (40 ml/da) приложени еднократно в периода на активна вегетация на растенията. Третирането е извършено с гръбна пръскачка. $(NH_4)(NO_3)$ в доза 20 kg/da е внесен след засаждане на коренищата, при поява на първите коренови издънки. Във всяка опитна парцела са засадени по 20 коренища в 4 повторения.

Коренищата са елитен материал от българския сорт стевия Стела,

MATERIAL AND METHODS

The study has been conducted in the experimental fields of Agricultural Institute – Shumen, during the period 2013-2015. The influence of the organic and mineral products has been studied - Bioactive (100 ml/da), Humustim (40 ml/da) – applied once in the period of active vegetation of the plants. The treatment was done with a knapsack sprayer. A dose of 20kg of Ammonium (NH_4) and Nitrate (NO_3) has been applied after planting the rhizomes, when the first root cuttings appeared. Each experimental plot is planted with 20 rhizomes in 4 replicates.

селекциониран в Земеделски институт-Шумен. В началото на есента на 2013 г, опитните коренища са извадени и прибрани за съхранение в избени помещения при температура над 1 ^{o}C. През 2014 г. след изпитването, вече двугодишните коренища отново се съхраняват за реколтиране през следващата година като коренища III година. Опитът е заложен след предшественик цвекло. Почвеният тип в опитното поле е средно мощен, тежко-песъчливо глинест карбонатен чернозем, формиран върху льосово песъчливи глини. Орният слой съдържа 50 % физическа глина и средно 5% карбонати, хумус – 3.3 %, $CaCO_3$ – 6.5%, pH (H_2O) – 7.8, PH (KCl) – 7.4, Азот – 35 mg/kg, P_2O_5 – 4.7 mg/100g, K_2O – 34 mg/kg, B – 1.2 mg/kg, Zn – 0.1 mg/kg, Mo – 0.1 mg/kg. И през трите години на изпитване, засаждането на коренищата се извърши ръчно в края на месец април. През вегетацията са проведени три ръчни окопавания, като влажността на почвата е поддържана в рамките на 70-80 % от ППВ, като е използвано капково напояване. Във фаза бутонизация на растенията са отчетени следните показатели: свежа и суха маса на едно коренище и тегло на свежи и сухи листа получени от декар.

Изпитвани варианти:

1. Третирани с органични торове:

* Биоактив – 100 % активиран епсомит ($MgSO_4$ x 7 $H_2$0);

* Хумустим – 41,05 % пепелни и минерални вещества и 58,95 % органични, от които 23,4 % хуминови киселини, 5 % фулвокиселини, 7,83 % калий, 3 % азот,1,14% фосфор, 3,92 % калций, 1,11 % магнезий, pH-9.

2. Амониев нитрат – (NH_4)(NO_3)

3. Без листно торене (контрола)

Извършена е математическа обработка по Lidanski (1988).

The rhizomes are an elite material from the Bulgarian Stevia kind “Stella”, selected at the Agricultural Institute – Shumen. In the beginning of autumn 2013, the tested rhizomes are removed and stored in cellars at temperatures above 1°C. In 2014, after the experiment, the two-year rhizomes are re-stored for harvesting next year as rhizome III year. The experiment is set after a beet precursor. The soil type of the test field is moderately heavy, heavy-sandy clayey carbonate black, formed on loess sandy clays. The top layer contains 50% physical clay and 5% carbonate on average, humus-3.3%, CaCO3-6.5%, pH (H2O)-7.8, PH (KCl) – 7.4, Nitrogen – 35mg/kg, P2O5 – 4.7mg/100g, K2O – 34 mg/kg, B – 1.2 mg/kg, Zn – 0.1 mg/kg, Mo – 0.1 mg/kg.

During the three years of testing, rhizome planting was done manually at the end of April. During the vegetation period, three manual entrenchments were carried out, with soil humidity being maintained within 70-80%, using drip irrigation. In the plantation phase, the following indicators are taken into account: the fresh and dry mass of a rhizome and the weight of fresh and dry leaves obtained per hectare.

The following variants were tested:

1. Treated with organic fertilizers

* Bioactive – 100% activated epsomit ($MgSO_4$ x 7 H_2O).

* Humustim – 41.05% ashes and mineral substances and 58.95% organic matter – 23,4% humine acids, 5% fulvic acids,7,83% potassium, 3% nitrogen, Phosphorus 1,14% , Calcium 3,92%, Magnesium 1,11% and pH-9.

2. Ammonium nitrate- (NH4) (NO3)

3. Without leaf fertilizer (control)

Mathematical processing was performed according to Lidanski (1988).

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

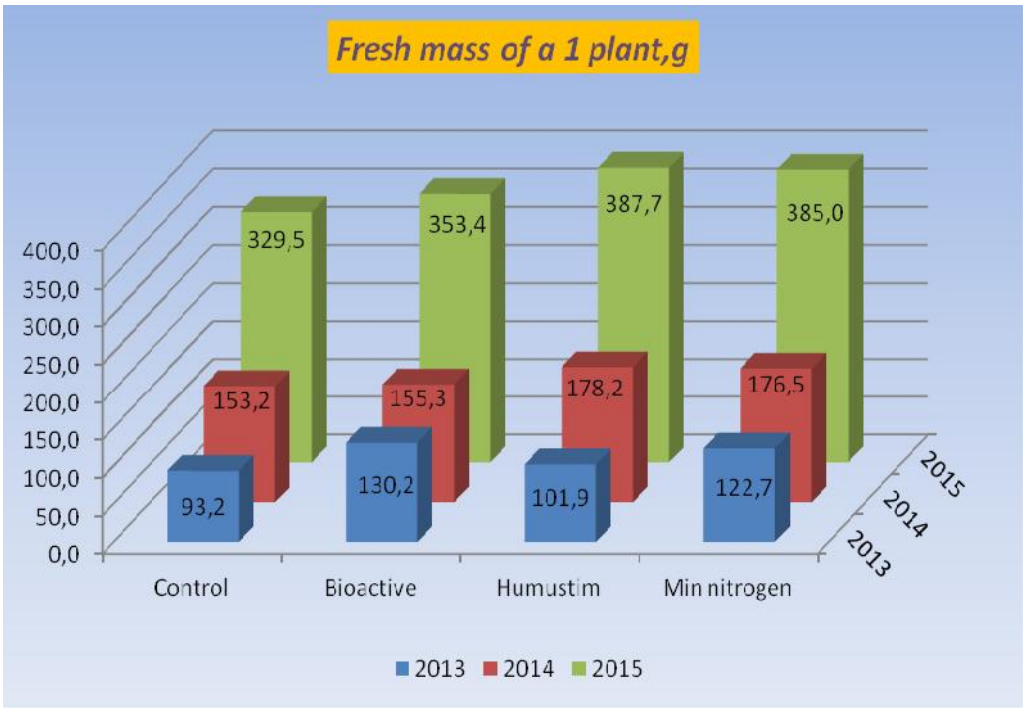
Минералното торене и листното подхранване имат добре изразен поло-

RESULTS AND DISCUSSION

The mineral fertilization and leaf nourishment have a well-pronounced

жителен ефект върху продуктивността на коренищата от стевия. През 2013 г листното подхранване с Биоактив води до увеличение на добива свежа маса от растение с 39.7 % спрямо нетретираният контролен вариант (Фигура 1). Третираните с Хумустим и минерален азот растения също формират по-високи стойности на показателя тегло на едно растение, което изразено в проценти е съответно 9.3% и 31.7%. Прави впечатление, че растенията третирани с Хумустим са с най-слаба положителна реакция.

positive impact on the productivity of Stevia rhizomes. In 2013, leaf nourishment with Bioactive waters led to an increase in fresh mass yield of a plant with 39.7%, compared to the untreated control variant (Figure 1). Plants, treated with Humustim and Mineral nitrogen also form higher values of the weight indicator for one plant, which is expressed in percentages, respectively, 9.3% and 31.7%. It is important to note that plants treated with Humustim have the lowest positive reaction.



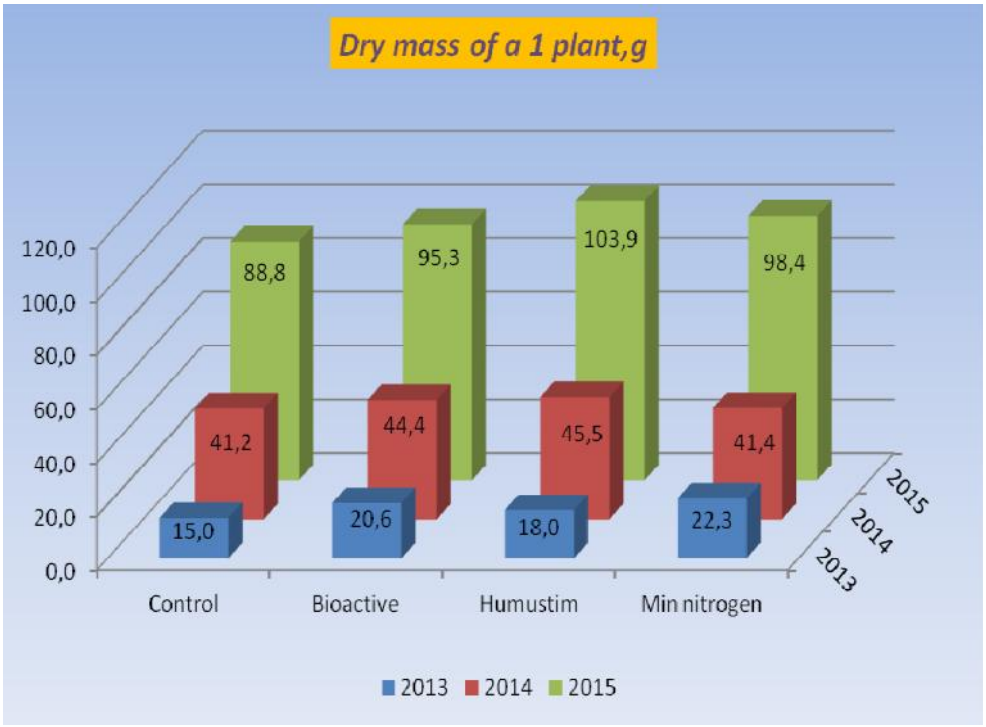
Фиг. 1. Свежа маса от едно растение, g
Fig. 1. Fresh mass of a 1 plant, g

От Фигура 2, илюстрираща получените резултати относно теглото на сухата маса от едно растение за 2013 година е видно, че прилагането на Хумустим повишава добива с 20.0 % спрямо нетретираният вариант, а третирането с Биоактив е довело до повишение на същия с 37.3%. Най-добри резултати са получени от

In Figure 2, illustrating the results for the weight of dry mass from 1 (one) plant in 2013, is shown that the application of Humustim increases the yield with 20.0% compared to the untreated variant, and treatement with Bioactive has led to an increase of the same with 37.3%. The best results have been obtained by the variant with applied

варианта с приложен минерален азот, при който, добивът суха листна маса от коренище е 22.3 g с 48.7% по висок от добива на контролата. Сравнително ниските добиви може да се обяснят с изключителното засушаване, през месеците юли и август. По-ниските добиви през 2013 г на свежа и суха листна маса от 1 коренище в сравнение с останалите години се обяснява с факта, че коренищата са I година и не са се адаптирали все още към външните агроклиматични условия.

mineral nitrogen, where the yield of dry mass from a rhizome is 22.3g, 48.7% higher than the control's yield. The relatively low yields can be explained with the extreme droughts during July and August. Lower yields of fresh and dry mass from one rhizome in 2013 in comparison to other years can be explained by the fact that rhizomes are yearling and have not yet adapted to outside agroclimatic conditions.



Фиг. 2. Суха маса от едно растение, g
Fig. 2. Dry mass of a 1 plant, g

След анализирането на получените данни за 2014 година е установено, че подхранването на коренища II година с органо-минералните торове оказва слабо положително въздействие върху показателя свежа маса от едно коренище. И при трите изпитани биопродукта растенията формират по-високи стойности от контролата, като при Биоактив превишението е

After analyzing the received data for 2014, we established that nourishment of rhizomes "II (second) year" with organic and mineral fertilizers has a low positive influence on dry mass index for one rhizome. In all three tested bio products the plants form a higher control value, with Bioactive the increase is negligible – 1.4%, with Mineral nitrogen and Humustim – 15.2% and 16.3%. This

незначително – 1 .4%, а при минерален азот и Хумустим – 15.2% и16.3%. Тенденцията се запазва и при сухата маса-прилагането на торовете повишава добива с едва 0.5%-10.4%.

През последната година на изпитване (2015) наблюдаваме развитие на пълния продуктивен потенциал на коренищата. При тези условия, третирането с Хумустим води до солидно увеличение на теглото свежа маса, като стойностите са по-високи с 17.7% от тези на контролния вариант. Сходна е тенденцията и варианта с минерален азот, като тук превишението спрямо контролата е 16.9%. Сухата маса формира по-високи стойности при третираните с листно подхранване с Хумустим – 17.0%, следван от Биоактив-14.1% и варианта със самостоятелно азотно торене – 10.8%.

Продуктивността на културата е показател, който отразява комбинираното въздействие на всички външни фактори.

Данните за 2013 г (Таблица 1), показват, че използването на Биоактив и прилагането на минерален азот, води до добив свежа маса съответно 520.8 kg/da и 490.8 kg/da. Добивът получен след третирането с Хумустим също превишава контролният вариант, но разликата е недоказана. При показателя добив суха маса е видно, че използваните продукти за торене и листно подхранване повишават както добива на сухата маса, така и водят до доказано увеличение на добива.

tendency is reserved in dry mass as well – applying fertilizers increases the yield with only 0.5% - 10.4%.

During the last year of testing (2015), a development of the full product potential of rhizomes can be seen. In these conditions, the treatment with Humustim leads to a solid increase of dry mass weight, with 17.7% higher rates compared to those of the control variant. Similar is the tendency with the variant with mineral nitrogen, but here the excess compared to the control is 16.9%. The dry mass forms higher values in the treated with Hummustim - 17.0%, followed by Bioactive – 14.1% and the variant with nitrogen fertilization – 10.8%.

Culture productivity is an indicator, which reflects the combined impact of all external factors.

Data for 2013 (Table 1), shows that the use of Bioactive and the application of mineral nitrogen lead to yield of fresh mass respectively 520.8kg and 490.8kg. Yield, obtained after Humustim treatment also exceeds the control variant, but the difference is unproved. The dry mass yield indicator shows that the fertilizer and leaf nourishment products increase the yield of dry mass and lead to a proven yield increase.

Таблица 1. Добив на свежа маса при третиране с органо-минерални продукти на елитни коренища стевия сорт Стела, kg/da
Table 1. Fresh mass yield, when treating with organic and mineral products of elite rhizomes Stevia, sort "Stella", kg/da

Вариант / Variant	Година / Year			Средно / Mean	Отн. % / Relative %
	2013	2014	2015		
Control	372.8	612.8	1317.8	767.8	100.0
Bioactive	520.8	621.2	1413.6	851.9	110.9
Humustim	407.6	712.8	1550.8	890.4	115.9
Mineral nitrogen	490.8	706.0	1540.0	912.3	118.8
GD 1 %	71.5	84.4	226.1	120.3	10.2

През 2014 г, тенденцията за положително влияние на минералния азот и биопродуктите се запазва. При двугодишните коренища, препаратът Хумустим повлиява в най-голяма степен продуктивността на зелена маса – 712.8 kg/da, следван от минерален азот – 706 kg/da. Полученият след третиране с Биоактив добив незначително превишава този от контролния вариант. В сравнение с 2013 година (Таблица 2), разликите в добива суха маса между вариантите са малки. Констатирано е, че прилагането на минерален азот, въпреки сравнително високите стойности на добива зелена маса, от варианта с приложен минерален азот, добивът суха маса от същия вариант е съпоставим с контролния вариант. Ефектът върху добива на суха маса от прилагането на Хумустим се изразява в добив от 182.0 kg/da.

In 2014, the tendency of positive influence of mineral nitrogen and bio products is preserved. In the biennial rhizomes, Humustim mostly affects the productivity of green mass – 712.8kg, followed by mineral nitrogen – 706kg.

The obtained yield, from the treated with Bioactive variant, insignificantly exceeds that of the control variant. In comparison to 2013, the variation in dry mass yield between the variants is small.

It has been found that the application of mineral nitrogen, despite the comparatively high yields of green mass, the dry mass yield is comparable to the yield of the control variant.

The effect of Hummustin application on dry mass yield is expressed in yield of 182.0kg,

Таблица 2. Добив на суха маса при третиране с органо-минерални продукти на елитни коренища стевия сорт Стела, kg/da
Table 2. Dry mass yield, when treating with organic and mineral products of elite rhizomes Stevia, sort "Stella", kg/da

Вариант	Година / Year			Средно	Отн. %
Variant	2013	2014	2015	Mean	Relative %
Control	60.0	164.8	355.2	193.3	100.0
Bioactive	82.4	177.6	381.2	213.7	110.5
Humustim	72.0	182.0	415.6	223.2	115.4
Mineral nitrogen	89.2	165.6	393.6	216.1	111.7
GD 1 %	19.2	17.0	50.2	29.4	8.1

През 2015 година агроклиматичните условията са най-благоприятни за реализиране на висока продуктивност от коренищата. При тези условия, коренищата III година, проявиха в пълна степен биологичният си потенциал. Третирането с Хумустим доведе до продуктивност от 1550.8 kg/da, а прилагането на минерален азот – 1540.0 kg/da. Най-ниско продуктивен от изпитаните варианти е този с Биоактив. Полученият добив суха биомаса очаквано е най-висок при варианта с Хумустим – 415.6 kg/da.

Прегледът на средните стойнос-

In 2015, the agro-climatic conditions are the most favourable for realizing a high productivity of Stevia rhizomes. In these conditions, rhizomes III year, show their biological potential in full capacity. Humustim treatment led to a productivity level of 1550.8kg, and the application of mineral nitrogen – 1540.0kg. The lowest yield is seen in tested variants with Bioactive. The obtained dry biomass yield is, as expected, the highest in the Humustim variant – 415.kg.

Reviewing the average rates for

ти от три годишното изпитване за продуктивност показва, че най-висок добив зелена маса от декар, реализират коренищата третирани с $(NH_4)(NO_3)$ – 912.3 kg/da (с 18.8 % над контролата), което е статистически доказано при GD 1%. Почти идентични резултати са отчетени и при третираните с Хумустим вариант. При показателя добив суха маса най-продуктивен в тригодишното изпитване се очертават коренищата третирани с Хумустим.

the three-year testing on the productivity shows that the highest yield of green mass from a hectare is realized in rhizomes treated with $(NH_4)(NO_3)$ – 912.3 kg (18.8% over the control) which is statistically proven with GD 1%. Almost identical are the results in the Humustim treated variant. Regarding the dry mass yield, the most productive for the three years of testing are the variants, treated with Humustim.

ИЗВОДИ

Прилагането на биопродуктите Биоактив, Хумустим и от друга страна минерален Азот влияе в известна степен върху продуктивността на елитни коренища на сорт стевия Стела. Те повишават добива както на свежата така и на сухата маса получена от едно коренище, като това е най-добре изразено при вариантите торени с минерален азот.

Установено е, че добивът зелена биомаса е най-висок при третирания с минерален азот вариант следван от този на варианта третиран с биопрепарата Хумустим.

Препаратът Биоактив не оказва съществено влияние върху добива на суха маса при стевия.

CONCLUSIONS

The application of the bio products Bioactive, Humustim and Mineral Nitrogen, in some degree, has an influence on the productivity of elite rhizomes of the Stevia variety “Stella”. They increase the yield of fresh, as well as dry mass, obtained from one plant. This is best expressed in variants, fertilized with Mineral Nitrogen.

It has been found that green biomass yield is highest in the Mineral Nitrogen treated variant, followed by the Humustim treated variant.

Bioactive and Mineral Nitrogen do not have a significant influence on dry mass yield in Stevia.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Bozhanska, T., B. Chourkova and T. Mihova**, 2017. Influence of growth regulators and bio-fertilizers on productivity of perennial legume forage grasses in Central Balkan Mountains. *Jourrnal of Balkan Ecology*, 20 (2), 135-144.
2. **Das, K., R. Dang, TN. Shivananda and N. Sekeroglu**, 2007. Influence of bio-fertilizers on the biomass yield and nutrient content in Stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.) grown in Indian subtropics. *J Med Plants Res*, 1: 5-8.
3. **Georgiev D., T. Mihova, G. Popski and M. Georgieva**. 2015 Influence of Fertilization over the Reproductive Potential of Aronia (Aronia melanocarpa L.)PLANT SCIENCE, LII, (6), 66-68 (Bg).
4. **Geuns, Jan M. C**, 2003. Steviozide. Phytochemistry, 64, 919-921.
5. **Geuns, Jan M. C**, 2004. Situation of steviozide in the world. In: Report of the 63rd Jecfa Meeting, 8-17 June, Steviol Glycosides, 1.
6. **Dochev, V., A. Atanasov, G. Dyakova, R.Mincheva, S. Stoyanova and K. Tanova**, 2016a. Study on the effects of Aminobest and Biobest organic fertilizers on the productive layering capacity and grain yield in winter common wheat (Triticum aestivum L.). *International journal of current research,* 8 (03), 277329-27331.

7. **Dochev, V., A. Atanasov, G. Dyakova, R. Mincheva and S. Stoyanova**, 2016b. Effects of aminobest and biobest organic fertilizers on the technological qualities of winter common wheat (*Triticum aestivum* L.) *ECOLOGICA*, (84), 833-836.
8. **Enchev, S., A. Mehmed and G. Kikidonov**, 2018. Effect of mineral and organic fertilization on the production of Stevia (*Stevia rebauduana* B.). *Bulg. J. Agric. Sci.*, 24 (Suppl. 2): 100-103.
9. **Enchev, S. and G. Kikindonov**, 2015a. Influence of mineral nitrogen and organic fertilization on the productivity of grain sorghum. *Agricultural Science and Technology*, 7 (4), 441-443.
10. **Enchev, S. and G. Kikindonov**, 2015b. Genotypic reaction of fodder beet to organic fertilization. *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans*, 19 (5), 112-123. .
11. **Inugraha, M., D. Maghfoer and E. Widaryanto**, 2014. Response of Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni M) to Nitrogen and Potassium Fertilization. *Journal of Agriculture and Veterinary Science*, vol. 7, Issue 10, Ver. I (Oct. 2014), 47-55.
12. **Kaschieva, M. and P. Todorova**, 2017. *Stevia rebaudiana* (Bertoni) breeding in Bulgaria. In: Collection of papers XV conference with international participation "Natural sciences 2017", 29.09-01.10.2017, Varna, Bulgaria, pp. 92-97 (Bg).
13. **Kennely, E. J**., 2002. Sweet and non-sweet constituents of Stevia rebaudiana in Stevia: The genus Stevia, Edited by A. Douglas Kinghorn. Taylor & Francis, London, 213.
14. **Kerin B. and M. Berova**, 2003. Foliar fertilization in plants. Videnov and Son, Sofia (Bg).
15. **Kikindonov, Tz.**, 2013 Assessment of initial material for stevia (*Stevia rebaudiana* B) breeding. *Agricultural science and technology*, 5 (1), 22-24.
16. **Lei, Ma. and Yan Shi**, 2011. Effects of potassium fertilizer on physiological and biochemical index of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Energy Procedia, 5, 581-586.
17. **Lidanski T.**, 1988. Statistical methods in Biology and Agriculture. Zemizdat, Sofia, 50-157 (Bg).
18. **Mamta, RP, V. Pathaniad and A. Gulatic**, 2010. Stimulatory effect of phosphate solubilizing bacteria on plant growth, stevioside and rebaudioside- a contents of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Appl *Soil Ecol*, 46: 222–229.
19. **Mihova T., D. Georgiev, B. Brashlyanova and P. Ivanova**. 2017. Influence of organic fertilization on the biochemical composition of fresh and dried fruits of Japanese quince (Chaenomeles sp.). Proceedings of the VIII International Agricultural Symposium „AGROSYM 2017“, 1654-1659.
20. **Petkova, B and I. Poryazov**. 2007. Biological efficiency of complex fertilizer. Hummustim in beans and Brussels sprouts. *Plant Breeding Sciences*, 44, 154-158 (Bg).
21. **Špicnagel, A. M., L. Čoga, B. Novak, S. Slunjski, I. Pavlović, S. Komorsky-Lovrić and I. Novak**, 2011. The importance of foliar fertilization on the glycoside content of stevia (lat. *Stevia rebaudiana* Bertoni). 46th Croatian and 6th International Symposium on Agriculture, Opatija, Croatia, 14-18 February 2011. In: Proceedings, pp.173-176 ref.11.
22. **Uchkunov, V., I. Uchkunov and K. Slanev**, 2016a. Defining the level of steviol glycosides in the stevia leaves (Stevia Rebaudiana B.) in different genotypes**.** *Scientific work of college - Dobrich*, vol. IX, 113-119. (Bg).
23. **Uchkunov ,V., I. Uchkunov and K. Slanev,** 2016b. Genetic similarity and difference in various genotypes of stevia (*Stevia Rebaudiana* B.). *Scientific work of college - Dobrich*, vol. IX, 120-125. (Bg).

24. **Vasileva, V., T. Kertikov, A. Ilieva and A. Nabil**, 2016. Changes in some parameters of spring peas and vetch after applying the organic fertilzer Humustim. Agricultural University – Plovdiv. *Scientific Works*, vol. LX, book 2, Scientific and Practical Conference Organic Farming History and Prospects, ISSN 1312-6318 (print), ISSN 2367-5845 (online), 71-78.
25. **Vasileva, V., T. Kertikov and A. Ilieva,** 2017. Dry mass yield and amount of fixed nitrogen in some forage legume crops after treatment with organic fertilizer Humustim. *Bulgarian Journal of Agricultural Sciences*, 23, (5), 816-819.
26. **Yakimov, D.**, 2013. Innovative fertilizers and preparations of natural origin-alternative in the biological and conventional agriculture. Abagar, V. Tarnovo.(Bg).
27. **Zaman, M. M., M. A. H. Chowdhury and Tanzin Chowdhury**. 2015. Response of stevia to foliar application of prilled urea. *J. Bangladesh Agril. Univ.* 3(1), 39-46.

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2018, 21 (2), 247-256
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan
ISSN 1311-0489 (Print)
ISSN 2367-8364 (Online)

Ефективност на комплексни органични препарати върху растежни характеристики на кориандър (*Coriandrum Sativum* L.*)*

Илияна Петрова[1]*, Ваня Делибалтова[2]

[1]*Институт по криобиология и хранителни технологии, 1407 София, България*
[2]*Аграрен Университет-Пловдив, 4000 Пловдив, България*

Effectiveness of complex organic preparations on growth performance of coriander (*Coriandrum Sativum* L.*)*

Iliyana Petrova[1]*, Vania Delibaltova[2]

[1]*Institute of Cryobiology and Food Technologies, 1407 Sofia, Bulgaria*
[2]*Agricultural University-Plovdiv, 4000 Plovdiv, Bulgaria*

**E-mail: asiliana@abv.bg*

Received: 14.05.2018 *Accepted:* 16.07.2018 *Published:* 20.09.2018

РЕЗЮМЕ

Особеност при растежа на кориандъра е повишената потребност от азот, което крие определен екологичен риск при отглеждането му. Алтернатива за повишаване на добивите и реализиране на продукция с биологична стойност, е листното подхранване с биостимуланти, чрез които се повишава ефективността на използване на минералните нутриенти и внасянето на азот може да бъде ограничено.

С цел да се изследва ефективността на нови препарати-фитостимулатори, разработени на органична основа в Лаборатория "Биологично активни вещества за растениевъдството" към Институт по Криобиология и Хранителни Технологии-София, в продължение на две стопански години са проведени прецизни полски опити по блоков метод с кориандър (*Coriandrum sativum* L.), сорт Местен дребноплоден. Препаратите са приложени чрез листно третиране във

SUMMARY

A peculiar feature of coriander growth is the increased demand for nitrogen, which poses a particular environmental risk when grown. An alternative to increasing yields and realizing production of high biological value is foliar feeding with biostimulants, which increases the efficiency of mineral nutrients utilization and the nitrogen intake can be limited.

In order to investigate the effectiveness of new organic formulations developed in the Laboratory "Biologically active substances for plant breeding" at the Institute of Cryobiology and Food Technologies in Sofia, for two harvesting years, field experiments by randomized block design were carried out using a coriander (*Coriandrum sativum* L.), local small-breed variety. The preparations are applied by leaf-treatment in the budding

фаза бутонизация. Получените резултати показват, че листното подхранване с изпитваната серия оказва стимулиращо влияние върху продуктивността, като най-ефективни са образците на основата на лумбрикогенен екстракт (увеличаване на добива до 16%, при статистическа доказаност на разликите). Препаратите от този тип са изключително подходящи за целите на органичното земеделие.

Ключови думи: кориандър, биохумус, препарати-фитостимулатори, продуктивност

phase. The results obtained show that foliar feeding with the tested series has a stimulating effect on productivity. The most effective are vermicompost extract-based preparations (increase in yield to 16%, with statistical evidence of differences). Preparations of this type are extremely suitable for organic farming purposes.

Key words: coriander, vermicompost, phytostimulators, productivity

УВОД

Кориандърът е една от нетипичните култури, отглеждани в България, като производството му формира 90% от износа на всички подправки и ароматни растения. Кориандърът (*Coriandrum sativum* L.) е едногодишно медицинско и ароматно растение от семейството Apiaceae. Огромният индустриален интерес се дължи на ценните свойства на растението: антиоксидантно, антимутагенно, антимикробно, успокояващо действие, както и аналгетичен и хормонбалансиращ ефект. Икономическата значимост на културата се определя от високата рентабилност на отглеждането ú. Само в семената му се съдържат между 10% и 27.7% мастни киселини и до 2.6% етерични масла, които поотделно или в комбинация, могат да се използват в хранително-вкусовата, фармацевтичната и козметичната промишленост (Diederichse et al., 1996).

Кориандърът е източник на витамин К и α-токоферол, микроелементи и хранителни вещества. Тези и други особености на кориандъра го правят изключително търсена суровина, като пазарната му стойност се определя от физичните и химичните характеристики на растението, както и от качеството на аромата му (Bhat et al., 2014).

Кориандърът е бързо растяща култура, характеризираща се с повишени нужди от азот, фосфор, калий, калций и микроелементи, поради относително краткия вегетационен период. По отношение на азотното обезпечаване, про-

INTRODUCTION

Coriander is one of the atypical crops grown in Bulgaria. Its production accounts for 90% of the export of all spices and aromatic plants. The economic importance of culture is determined by the high profitability of its cultivation. Coriander (*Coriandrum sativum* L.) is an annual medical and aromatic plant which belongs to the family Apiaceae.

The huge industrial interest is due to the valuable properties of the plant: antioxidant, antimutagenic, antimicrobial, soothing, as well as an analgestic and hormone-balancing effect. Only its seeds contain between 10% and 27.7% fatty acids and to 2.6% essential oils, which, either separately or in combination, can be used in the food, pharmaceutical and cosmetic industry (Diederichse et al., 1996).

Coriander is a source of vitamin K and α-tocopherol, trace elements and nutrients. These and other features of the coriander plant make it an extremely sought-after raw material, as its market value is determined by the physical and chemical characteristics of the plant, as well as by the quality of the fragrance (Bhat et al., 2014).

Coriander is a fast growing crop, characterized by increased needs for nitrogen, phosphorus, potassium, calcium and trace elements, due to the relatively short growing season. In terms of nitrogen

учванията установяват много висока степен на акумулация на азот, независимо дали почвите са торени или неторени (Giuffrè de Lopez Camelo et al., 1995; Donega et al., 2013). На базата на тези данни се обсъждат хипотези за екологичния риск при отглеждането на кориандър.

При отглеждане без азотно подхранване, в почви, бедни на азот, се предполага недопустимо и необратимото изчерпване на елемента. Това определя изискванията за допълнително внасяне на азотни торове, като изследванията показват увеличаване на добива от 4% до 70% при внасяне на органичен или минерален азот (Carrubba et al., 2014). Излишъкът от органични или неорганични азотни торове води до нитратно замърсяване по хранителната верига.

Екологична алтернатива за повишаване на добивите и реализиране на продукция с биологична стойност, е използването на биостимуланти, чрез които се повишава ефективността на използване на минералните нутриенти и внасянето на азот може да бъде ограничено. От различни проведени изследвания, вече е известен положителният ефект върху растежа и биомасата от прилагането на биохумус като почвен подобрител при отглеждане на медицински и ароматни растения като лайка, живовляк, кориандър, копър, анасон и др. (Shirkhodaei et al., 2014). Друга възможност за справяне с азотната необходимост е внасянето на жизнено важните елементи чрез листно третиране.

Целта на настоящето проучване е да се установи ефектът върху растежните характеристики на кориандър (*Coriandrum sativum* L.) от листното третиране с комплексни органични препарати, разработени в Лаборатория “Биологично активни вещества за растениевъдството” към Институт по Криобиология и Хранителни Технологии-София.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Проучването е проведено през периода 2009-2011 г. върху бивша ливадно-блатна слабо засолена, песъкливо-

sequestration, studies have found a very high degree of nitrogen accumulation, whether the soils are fertilized or non-fertilized (Giuffrè de Lopez Camelo et al., 1995; Donega et al., 2013). Based on this data, hypotheses about the environmental risk in the cultivation of coriander are discussed.

While growing without nitrogen nutrition in soils poor in nitrogen, it is suggested unacceptable and irreversible depletion of the element. This determines the requirements for additional nitrogen fertilization, and studies show an increase in yields of 4% to 70% when organic or mineral nitrogen is introduced (Carrubba et al., 2014). The excess of organic or inorganic nitrogen fertilizers leads to nitrate contamination along the food chain.

Ecological alternative for increasing the yield and realizing production with biological value is the use of biostimulants, which increases the efficiency of the mineral nutrients utilization and the introduction of nitrogen may be limited. From various studies, the positive effect on growth and biomass production of biohumus applied as soil improver in cultivation of medicinal and aromatic plants such as chamomile, plantain, coriander, fennel, anise, etc. was already known (Shirkhodaei et al., 2014). Another option for dealing with nitrogen need is providing the essential elements through foliar treatment.

The aim of the present study was to determine the effect of foliar application of complex organic preparations, developed in the Laboratory "Biologically active substances for plant breeding" at the Institute of Cryobiology and Food Technologies in Sofia, on the growth characteristics of coriander (*Coriandrum sativum* L.).

MATERIAL AND METHODS

The study was conducted during the period 2009-2011 on a former meadow-pond low salinity sandy-clay soil

глинеста почва в експерименталната база при Аграрен Университет - Пловдив. Съдържанието на основните хранителни елементи в почвения слой 0-20 cm е: N - 26.65 mg/100g; P_2O_5 – 11.21mg/100g; K_2O– 27.47 mg/100g; хумус – 2.39%.

В продължение на 2 вегетационни сезона е проведен полски опит по блоков метод, в четири повторения и рандомизирано разположение на вариантите, с големина на реколтната парцела 15 m^2, след предшественик пшеница. Приложено е минерално торене. Фосфорният тор е внесен преди оранта, а азотният с последната предсеитбена обработка.

Сеитбата е извършена през третата десетдневка на месец октомври със сорт Местен дребноплоден при междуредие 12-15 cm и посевна норма 1.3 kg da^{-1}, на дълбочина 3-4 cm. За борба срещу плевелите е използван хербицид, внесен след сеитбата, преди поникване в доза 2000 ml ha^{-1}.

Изпитано е влиянието на 5 препарата, разработени на основата на хуминови източници с различен състав:

1. Х-80 (800 ml ha^{-1}) – препарат - прототип на разпространен в търговската мрежа продукт, с високо съдържание на калиев хумат.
2. Т-100 (2500 ml ha^{-1}) – екстракт от биохумус.
3. Н-40 (300 ml ha^{-1}) – производно съединение на растежен регулатор с природоидентичен характер.
4. ХН-100 (1000 ml ha^{-1}) – препарат, съдържащ хуминови соли и производни на феноксикиселина с растеж-стимулиращо действие.
5. ТН-140 (2500 ml ha^{-1}) – екстракт от биохумус, обогатен с фитостимулатори.

Внасянето на препаратите е във фаза бутонизация, посредством листно третиране при разходна норма на работния разтвор 250 L ha^{-1}.

Отчетени са показателите: височина на растенията, брой сенници на растение, маса на плодовете в растение, маса на 1000 плода, хектолитрова маса и добив на семена. За биометричните измервания от всяка парцела на изпит-

in the experimental base at Agricultural University - Plovdiv. The content of the main nutrients in the soil layer 0-20 cm is: N - 26.65 mg/100g; P_2O_5 - 11.21mg/100g; K_2O - 27.47 mg/100g; humus - 2.39%.

In the course of 2 consecutive growing seasons, field experiments have been established using randomly assessed block design, in four replicates per variant, plot size of 15 m^2 each, after a wheat predecessor. Mineral fertilization was applied as follows: the phosphorous fertilizer - before ploughing and the nitrogen fertilizer - at presowing.

Sowing was carried out during the third decade of October with a local variety “Drebnoploden” at 12-15 cm row spacing, seeding rate 1.3 kg da^{-1}, at a depth of 3-4 cm. For weed control a post-sowing pre-emergence herbicide was applied at the dose of 2000 ml ha^{-1}.

The influence of 5 preparations developed on the basis of humic sources of different composition has been tested:

1. X-80 (800 ml ha^{-1}) - a prototype of a commercially available product with a high potassium humate content.
2. T-100 (2500 ml ha^{-1}) – vemicompost extract
3. H-40 (300 ml ha^{-1}) - a growth regulator derivative compound of naturally identical origin.
4. XH-100 (1000 ml ha^{-1}) - preparation containing humic salts and derivatives of phenoxy acid with growth-stimulating action.
5. TH-140 (2500 ml ha^{-1}) - extract from biohumus, enriched with phytostimulators.

The preparations were applied as foliar spray at the phase of budding, at a rate of working solution 250 L ha^{-1}.

Reported indicators are: plant height, number of canopies per plant, fruit mass per plant, mass of 1000 fruit, hectolitre mass and seed yield. For biometric measurements 20 plants from each plot were taken. The values are

ваните варианти са взети по 20 растения. Стойностите са осреднени за едно растение. Получените данни за добива са обработени математически по метода на дисперсионния анализ.

averaged over a plant. The data obtained for the yield were processed mathematically by the dispersion analysis method.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Предимство на отглеждането при кориандъра е, че цялото растение - листа, корен, цветове, плодове, притежава ценни свойства и намира индустриално приложение. Резултатите от проведените вегетационни опити показват, че всички изпитвани препарати-образци, разработени на основата на биологично активни вещества, стимулират растежа на вегетативната маса и повишават добива на семена в степен, зависеща от температурно-влажностния режим през стопанската година.

При фактора средномесечна температура през периодите на проучване не са наблюдавани съществени отклонения, по отношение изискванията на културата и стойностите за многогодишния период (Фигура 1).

RESULTS AND DISCUSSION

Advantage of the cultivation of coriander is that the whole plant - leaves, root, flowers and fruit, has valuable properties and industrial application. The results of the vegetation trials show that all tested sample-preparations, developed on the basis of biologically active substances stimulate the growth of vegetative mass and increase seed yield to a degree depending on the temperature-humidity regime during the harvesting year.

In the average monthly temperature factor during the study periods, no significant deviations were observed in terms of crop requirements and values relating to the multi-annual period (Figure 1).

Фиг. 1. Средномесечни температури през вегетационния сезон на кориандъра

Fig. 1. Average monthly temperatures during the growing season of coriander

Данните за разпределението на месечната сума на валежите (Фигура 2) показват различие през двете стопански години. Реколтата от 2010 г. се характеризира с по-ниска обезпеченост с влага през месец май, когато културата встъпва в критичната фаза бутонизация. През 2011 г. Бутонизацията и цъфтежът са протекли при повисока запасеност с влага – сума на валежите през периода май-юни е 82,3 mm/m^2 спрямо многогодишната норма от 68 mm/m^2.

Data on the distribution of precipitation totals (Figure 2) shows a difference over the two economic years. The harvest of 2010 is characterized by lower moisture availability in May, when culture enters the critical phase of budding. In 2011, budding and flowering occurred at a higher moisture supply - the precipitation totals in the May-June period was 82.3 mm/m^2 versus the multi-year rate of 68 mm/m^2.

Фиг. 2. Разпределение на месечната сума валежите през вегетационния сезон на кориандъра

Fig. 2. Distribution of monthly precipitation totals during the growing season of coriander

Данните от морфометричните анализи показват, че в края на вегетацията височината на третираните растения превишава контролния вариант с 4-10 cm (Таблица 1). Прилагането на препаратите стимулира и образуването на сенници с 3 до 6 броя. Тези ефекти са ясно изразени в 2011 година, характеризираща се с по-благоприятното съчетаване на климатичните фактори.

Morphometric data analyses show that at the end of vegetation the height of treated plants exceeds the control variant by 4-10 cm (Table 1). The application of the formulations also stimulates the formation of canopies with 3 to 6 pieces. These effects are very pronounced in the 2011 year characterized by more favourable combination of climatic factors.

Таблица 1. Влияние на експериментални препарати-фитостимулатори върху морфометрични характеристики на кориандър
Table 1. Influence of experimental preparations-phytiostimulators on the morphometric characteristics of coriander

Варианти Variants	Височина на растенията Plant height, cm			Брой сенници на 1 растение Number of canopies per plant			Брой плодове на 1 растение Number of fruits per plant		
	2010	2011	Средно/Mean	2010	2011	Средно/Mean	2010	2011	Средно/Mean
Х-80	85.7	105.5	95.6	28.6	31.1	29.9	346.5	269.0	307.8
ХН-100	86.7	101.6	94.2	29.2	30.0	29.6	358.4	246.0	302.2
Т-100	86.5	106.6	96.6	30.0	33.2	31.6	387.5	262.0	324.8
ТН-140	84.0	102.3	93.2	31.3	34.6	33.0	395.7	274.3	335.0
Н-40	84.2	104.0	94.1	28.4	34.0	31.2	363.0	255.0	309.0
Контрола Control	83.4	94.0	88.7	28.0	28.2	28.1	332.7	230.0	281.4

N=20. Preparations were applied at the stages of budding.

Всички изпитвани препарати оказват положително влияние върху основните показатели, формиращи добива – брой плодове и техните физични характеристики (Таблица 2).

All test preparations have a positive impact on the main indicators forming the yield – number of fruit and its physical characteristics (Table 2).

Таблица 2. Ефект от листно третиране с фитостимулатори върху физични характеристики на плодовете при кориандър
Table 2. Effect of foliar treatment with phytostimulators on the physical characteristics of coriander fruits

Варианти Variants	Маса на плодове в 1 растение Mass of fruits per plant, g			Маса на 1000 плода Mass of 1000 fruits, g			Хектолитрова маса Hectolitre mass,kg		
	2010	2011	Средно/Mean	2010	2011	Средно/Mean	2010	2011	Средно/Mean
Х-80	1.19	2.00	1.60	3.41	9.71	6.56	32.4	33.0	32.7
ХН-100	1.13	2.20	1.66	3.37	9.11	6.24	32.0	34.0	33.0
Т-100	1.21	2.50	1.86	3.52	10.00	6.76	33.6	32.0	32.8
ТН-140	1.24	2.60	1.92	3.65	10.40	7.02	33.5	35.0	34.3
Н-40	1.16	2.20	1.68	3.43	9.00	6.22	33.0	34.2	33.6
Контрола Control	1.09	1.96	1.53	3.24	8.70	5.97	32.1	33.0	32.6

N=20. Preparations were applied at the stages of budding.

През двете стопански години стимулиращият ефект при показателя „брой плодове за едно растение“ е най-силно изразен при препаратите Т-100 и ТН-140, като средно за периода съответните стойности са 324 и 335 броя/растение, което превишава с 15-19 % контролата (281 броя/растение). При останалите препарати ефектът е 7-9%. Прилагането на Т-100 и ТН-140 води до

In the two harvesting years, the stimulating effect on the "number of fruit per plant" indicator is most pronounced in the T-100 and TH-140 preparations, with average values over the period being 324 and 335 pcs. per plant, that is by 15-19% higher in comparison to control (281 pcs. per plant). In the other preparations, the effect is 7-9%. The application of T-100 and TH-140 results in an increase in the

увеличаване масата на плодо-вете средно с 26%, при увеличение 7-13% за другите препарати. Стойностите на хектолитровата маса за вариантите ТН-140 и Н-40 са по-високи от контро-лата през двете стопански години, а за препарат ХН-100 – само в годината с по-благоприятни климатични условия.

На Таблица 3 са отразени резултатите за ефекта от третирането върху добива. Средно за периода, полученият добив семена при контролата е 1.992 t ha^{-1}. При прилагането на комплексните хуминови препарати добивите варират от 2.073 до 2.299 t ha^{-1}. За всички третирани варианти е отчетено достоверно повишаване на добивите от 4 до 16%.

mass of fruit by an average of 26%. The rest of preparations provide an increase of 7-13%. Hectolitre mass values after application of TH-140 and H-40 variants are found higher than the control over the two years and for XH-100 only in the year with more favourable climatic conditions.

Results shown on Table 3 reflect the effect of treatment on seed yield. Over the period of two years the yield of control variant was 1.992 t ha^{-1} on the average. In variants treated with complex humic preparations the yields range from 2.073 to 2.299 t ha^{-1}. In all treatments a significant increase from 4% to 16% has been established.

Таблица 3. Ефект от листно третиране с фитостимулатори върху добива на зърно при кориандър
Table 3. Effect of foliar treatment with phytostimulators on the seed yield of coriander

Варианти Variants	2010		2011		Средно за периода Average over the period	Разлика Difference	Към контролата To control
	t ha^{-1}	%	t ha^{-1}	%	t ha^{-1}	t ha^{-1}	%
Х-80	1.738	103.5	2.407*	104.5	2.073	8.1	104.1
ХН-100	1.752	104.3	2.460*	106.8	2.106	11.4	105.7
Т-100	1.800*	107.1	2.620*	113.7	2.210	21.8	110.9
ТН-140	1.865*	111.0	2.732*	118.6	2.299	30.7	115.4
Н-40	1.773	105.5	2.540*	110.2	2.157	16.5	108.3
Контрола Control	1.680	100.0	2.304	100.0	1.992		100
LSD, 5 %	0.057		0.071				

*Results differ significantly at P<0.05

Най-високи добиви са получени при внасяне на препаратите на основата на екстракт от лумбрикогенен тор: Т-100 (2.210 t ha^{-1}) и ТН-140 (2.299 t ha^{-1}) – 11/16% увеличение. При останалите препарати Х-80, Н-40, ХН-100 увеличаването на добивите е от 4.1% до 8.3%.

От получените резултати може да се заключи, че като цяло, изпитваните серии от комплексни хуминови препарати имат положително влияние върху растежа и развитието на кориандъра. Стимулиращото действие

The highest yields were obtained after foliar application of the preparations based on the extract of vermicompost: T-100 (2.210 t ha^{-1}) and TH-140 (2.299 t ha^{-1}) – 11/16% increase. In the other preparations X-80, H-40, XH-100 the yield increase is from 4.1% to 8.3%%.

From the results obtained it can be concluded that, in general, the tested series of complex humic preparations have a positive impact on growth and development of the coriander. The stimulating effect is determined by the

се определя от наличието на високоусвоими органо-минерални комплекси и биологично активни вещества в състава. В потвърждение на това е повисоката ефективност на препаратите Т-100 и ТН-140 на основа на биохумус, дължаща се на по-богатото съдържание на фитостимулатори, макро- и микроелементи, включително и на лесно усвоими азотни съединения в лумбрикогенния екстракт, което го прави подходящ източник на нутриенти за кориандъра и други култури с повишени изисквания към азота и други есенциални елементи. Установените резултати са в съответствие с изследвания относно положителния ефект от хумусно торене на почвата. Новоразработените препарати-фитостимулатори по своя състав са приложими за целите на органичното земеделие.

presence of highly absorbable organo-mineral compounds and biologically active substances in the composition.

In confirmation of this is the better efficiency of the biohumus based preparations T-100 and TH-140, due to the rich content of phytostimulators, macro- and trace elements, including easy available nitrogen compounds in the vermicompost extract, which makes it a suitable source of nutrients for coriander and other crops with increased demand for nitrogen and the other essential elements supply. The results established are consistent with studies on the humus fertilization effect. The newly developed products-phytostimulators are by their composition applicable for the purposes of the organic farming.

ИЗВОДИ

Листното третиране с комплексни препарати-образци, съдържащи активни хуминови субстанции във фаза бутонизация на кориандър стимулира растежа и развитието при кориандър сорт местен „Дребноплоден“. Препаратите, разработени на основата на екстракти от лумбрикогенен тор (Т-100 и ТН-140) са с най-ефективно действие. В условията на проведените полски опити тяхното приложение допринася за повишаване на добивите средно с 11% и 16%. Препарати с подобен състав са изключително подходящи за органичното земеделие.

CONCLUSIONS

Foliar treatment with complex sample-preparations containing active humic substances in the phase of budding stimulates growth and development of the coriander local variety ”Drebnoploden”.

Formulations developed on the basis of the vermicompost extract (T-100 and TH-140) have the most effective influence. In the conditions of the established field trials, its application contributes to an increase in yield by 11% and 16% on the average. Preparations of this composition are extremely suitable for organic farming.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Bhat, S., P. Kaushal, M. Kaur and H. K. Sharma**, 2014. Coriander (*Coriandrum sativum* L.): Processing, nutritional and functional aspects. *African Journal of Plant Science*, 8 (1), 25-33.
2. **Carrubba, A.**, 2014. Organic and chemical N fertilization on coriander (*Coriandrum sativum* L.) in a Mediterranean environment. *ELSEVIER Industrial Crops and Products*, 57, 174-187.
3. **Diederichsen, A.**, 1996. Coriander (*Coriandrum sativum* L.). Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 3.Institute of Plant Genetics and Crop Plant research/International Plant Genetic Resources Institute, Gatersleben/Rome.

4. **Donega, M. A., S. C. Mello, R. M. Moraes and C. L. Cantrell**, 2013. Nutrient uptake, biomass yield and quantitative analysis of aliphatic aldehydes in cilantro plants. *Ind. Crops Prod*., 44, 127-131, http://dx.doi.org/10.1016/j. indcrop.2012.11.004.
5. **Giuffrè de Lopez Camelo, L., O.S. Heredia and A. Gil**, 1995. Nitrogen, phosphorus, and potassium accumulation in coriander (*Coriander sativum* L.). *J. Herbs Spices Med.Plants*, 3 (4), 35-40.
6. **Shirkhodaei, M., M. Taghi Darzi and M. Haj Seyed Hadi**, 2014. Influence of Vermicompost and Biostimulant on the growth and biomass of coriander (*Coriandrum sativum* L.). *International journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 2 (3), 706-714.

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2018, 21 (2), 257-273
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan
ISSN 1311-0489 (Print)
ISSN 2367-8364 (Online)

Ефект на растителни екстракти върху излюпването и жизнеността на ларва втора възраст на картофена цистообразуваща нематода *Globodera pallida*

Костадин Траянов[1]*, Хари Самалиев[1], Силвия Вълчева[1], Страхил Берков[2], Милена Николова[2]

[1]Аграрен университет, 4000 Пловдив, България
[2]Българска академия на науките, Институт по биоразнообразие и екосистемни изследвания, 1113 София, България

The effect of plant extracts on egg hatching and second-stage juvenile motility of potato cyst nematode *Globodera pallida*

Kostadin Trayanov[1]*, Harry Samaliev[1], Silvia Valcheva[1], Strahil Berkov[2], Milena Nikolova[2]

[1]Agricultural University, 4000 Plovdiv, Bulgaria
[2]Bulgarian Academy of Sciences, Institute of Biodiversity and Ecosystem Research, 1113 Sofia, Bulgaria

**E-mail: kostadin_traqnov@abv.bg*

Received: 08.05.2018 *Accepted:* 13.09.2018 *Published:* 20.09.2018

РЕЗЮМЕ

Настоящото проучване има за цел да изследва ефекта на метанолови екстракти на *Juglans regia, Ruta graveolens* и *Plantago major* срещу излюпване на ларви втора възраст ($Л_2$) от цисти и жизненост на $Л_2$ на картофената цистообразуваща нематода *Globodera pallida* в тестове при директен контакт. Растителните екстракти бяха приложени в концентрации 2.5, 5.0 и 10.0% с експозиция 12, 24, 48 и 72 часа при контролирани условия. Резултатите показаха, че тестваните растителни екстракти имат инхибиращ ефект, спрямо излюпването на $Л_2$ и повишават смъртността на инвазионните ларви втора възраст на *Globodera pallida*. При концентрация 5.0 и 10.0%,

SUMMARY

The present work aims to trace the effect of methanolic extracts of *Juglans regia, Ruta graveolens and Plantago major* against the hatching of second-stage juveniles (J_2s) from cysts and J_2s motility of the potato cyst-forming nematode *Globodera pallida,* in direct contact assays. The plant extracts were applied at a concentration of 2.5, 5.0 and 10.0% with exposure 12, 24, 48 and 72 hours under controlled conditions.

The results showed that the tested plant extracts has an inhibitory effect of the hatching of J_2s and increase the mortality of J_2s of *Globodera pallida*.

In concentration 5.0 and 10.0%, *Juglans*

екстрактът от *Juglans regia* показа най-висока ефикасност и няма статистическа доказаност между двете концентрации. Метаболитните профили на растителните екстракти бяха анализирани чрез газова хроматография-мас спектрометрия (ГХ-МС). Бяха идентифицирани съединения принадлежащи към групите на мастните, органични и фенолни киселини, алкалоиди, мастни алкохоли, въглехидрати и стероли.

Ключови думи: растителни екстракти, ГХ-МС, *Globodera pallida*, контрол

regia showed the highest efficacy and there was no statistically proved difference between two concentrations. Metabolic profiles of plant extracts were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Compounds belonging to fatty, organic and phenolic acids, alkaloids, fatty alcohols, carbohydrates, sterols and other were identified.

Key words: plant extracts, GC-MS, *Globodera pallida*, control

УВОД

Картофените цистообразуващи нематоди (КЦН) *Globodera pallida* (Stone) Behrens и *G. rostochiensis* (Wollenweber) са разпространени в повечето райони по света, където се отглеждат картофи (*Solanum tuberosum* L.) и могат да причинят загуби в добива от 2-8 t ha^{-1} в райони с нива на зараза ~15 -160 яйца g^{-1} почва в зависимост от вида на гостоприемника и условията на околната среда (Whitehead et al., 1984; Samaliev and Stoyanov, 2007). От двата вида, *G. pallida* е по-патогенен. В България са проведени изследвания в основните картофопроизводителни региони, които показват, че *G. pallida* е един от често срещаните от тази група вредители по растенията, с честота12-41% и диапазон на плътност на популацията от 17 до 24 яйца g-1 почва (Samaliev, 2011). Контролът на тези паразити по картофите е труден. И двата вида образуват цисти, които могат да останат жизнеспособни в почвата повече от десет години (Perry and Moens, 2011). Методите за контрол се основават върху сеитбооборота с култури, които не се нападат, както и чрез прилагането на химически средства. Ротацията на културите е нерентабилна, особено в полупланинските и планинските райони, където е концентрирана по-голямата част от производството на картофи в България. Прилагането на химически средства все още е основен метод за контрол на КЦН, но в същото време е скъпо, в повечето случаи има незадоволителен ефект и

INTRODUCTION

Potato cyst nematodes (PCNs) *Globodera pallida* (Stone) Behrens and *G. rostochiensis* (Wollenweber) occur in most areas throughout the world where potatoes (*Solanum tuberosum* L.) are cultivated and can cause yield loss of 2-8 t ha^{-1} in areas with infestation levels of around 15 -160 eggs g^{-1} soil depending on the host variety and environmental conditions (Whitehead et al., 1984, Samaliev and Stoyanov, 2007). From both species *G. pallida* is the more pathogenic. In Bulgaria was conducted research in the major potato producing regions which show that *Globodera pallida* was one of the frequently encountered nematode plant pests with frequency of occurrence 12 to 41% and range of population density from 17 to 24 eggs g^{-1} soil (Samaliev, 2011). The control of these parasites on potatoes is difficult. Both species form cysts that can remain viable in the soil for more than ten years (Perry and Moens, 2011).The methods of PCNs control focus primarily on crop rotation with crops that do not attack and the application of chemical means. Crop rotation is unprofitable, especially in the semi-mountainous and mountainous regions, where has concentrated the majority of potato production in Bulgaria. The application of chemical means is still a major method of control of PCNs, but at the same time is expensive, in most cases

причинява замърсяване на околната среда.

Гореописаните факти изискват прилагането на други методи за контрол на КЦН. Един от тези методи е апликирането на биологични средства. Към тази група за контрол се отнасят растителните екстракти. Растителните екстракти се извличат от различни части на растението - семена, корени, стъбла, листа или цветове. Установено е, че някои от тях имат биологична активност срещу различни вредители и патогени, а също и подтискат развитието и размножаването на растителни-паразитни нематоди (Caboni et al., 2014). Биологичната активност на растителните екстракти се дължи на различните компоненти, които влизат в техния състав. Установено е, че нематоцидният ефект на растителни екстракти се основава на съединения с биологична активност – изотиоцианати, тиофени, глюкозиди, алкалоиди, феноли, танини, стероли, въглехидрати и други (Jang et al., 2014; Ntalli and Caboni 2012).

По-голямата част от страните, в които са разпространени видовете от род *Globodera* spp., като например Италия (D'Addabbo et al., 2013), Обединеното кралство (Danhquah et al., 2010), са разработени различни стратегии за контрол на базата на растителни екстракти.

Целта на настоящото проучване е да изследва ефекта от растителните екстракти *Juglans regia*, *Ruta graveolens* и *Plantago major,* получени от представители на българската флора, срещу излюпването и жизнеността на ларви 2-ра възраст ($Л_2$) на картофена цистообразуваща нематода *G. pallida*. Метаболитните профили на тестваните растителни екстракти ще се определят чрез газова хроматография-мас спектрометрия (ГХ-МС).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Експериментите са проведени през 2016 г. и 2017 г. в лаборатория по ентомология и нематология в Аграрен университет - Пловдив.

G. Pallida

Картофената цистообразуваща

have an unsatisfactory effect and cause environmental pollution.

The above-described facts call for the application and use of other methods of control PCNs. One of these methods is the application of biological means. To this group of control refer to plant extracts. Plant extracts are extracted from different plant parts - seeds, roots, stems, leaves or flowers. Some of them have been found to have biological activity against different pests and pathogens and also to inhibit the growth and multiplication of plant - parasitic nematodes (Caboni et al., 2014). These biological activities of plant extracts are due to the different compouds which they have. For example, the nematicidal effect of the plant extracts based on biological activity compounds, such as likeisothiocyanates, thiophenics, glucosides, alkaloids, pheno-lics, tannins, sterols, carbohydrates and others have been described (Ntalli and Caboni, 2012; Jang et al., 2014).

The majority of studies evaluating *Globodera spp.* control based on plant extract have been developed in countries affected by this nematodes, such as Italy (D'Addabbo et al., 2013), Unated Kingdom (Danhquah et al., 2010).

The aim of the present study is to investigate the effect (*in vitro*) of plant extracts *Juglans regia, Ruta graveolens* and *Plantago major*, obtained from representatives of the Bulgarian flora against eggs hatching and motility of J_2s of potato cyst nematodes *G. pallida*. Also metabolic profiles of plant extracts were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).

MATERIAL AND METHODS

The experiments were conducted during 2016 and 2017 in a laboratory of Entomology and Nematology at Agricultural University - Plovdiv.

Culture of G. pallida

The potato cyst nematode *G.*

нематода *G. pallida* (патотип Pa2), първоначално изолирана от почвени проби (Самоковски и Софийски картофопроизводетелен район) беше получена от единични цисти, размножени върху чувствителния сорт картофи „Надежда“. Цистите бяха есктрахирани по метода декантиране на почвата (Southey, 1986). За стимулиране излюпването на ларвите от цистите беше използван картофен коренов ексудат (ККЕ). Излюпените ларви втора възраст ($Л_2$) бяха събирани всеки ден и ККЕ се подменяше през интервал от 24 часа. $Л_2$ се съхраняваха в малък обем с вода поставени в хладилник при температура 6 °C за максимален период от една седмица, преди да бъдат използвани в експериментите. Цистите на *G. pallida* бяха стерилизирани в 1 % разтвор на натриев хипохлорид за 30 минути, а $Л_2$ в 0.1 % разтвор на стрептомицин сулфат за 15 минути (Mountain, 1955). Всички те бяха изплакнати в стерилна дестилирана вода (СДВ), преди да бъдат използвани в експериментите.

Растителен материал

Листа от *Plantago major* бяха събрани от естествена популация в подножието на Люлин планина, 730 метра надморска височина. Листа и цветове на *Ruta graveolens* както и дребни плодове от *Juglans regia* бяха събирани в същия район от култивирани площи (Таблица 1).

Процедура за екстракция

Въздушно сухия, смлян растителен материал от *Plantago major* и *Ruta graveolens* бяха екстрахини с 80% метанол, чрез класическа мацерация за 24 часа. Пресни малки плодове от *Juglans regia* бяха екстрахиранис 60% метанол, чрез накисване в продължение на 15 дни.

Процедура за подготовка на растителните екстракти

След изпаряване на разтворителя, полученият суров екстракт беше подложен на допълнителни анализи. За тази цел от всеки растителен екстракт беше приготвен основен разтвор с концентрация 10%, чрез добавяне на стерилна

pallida (pathotype *Pa2*), originally isolated from soil simples (location Samokov potato region) was obtained from cultures derived from single cysts maintained on potato cv. Nadezhda.

The cysts were extracted, after air drying the soil, by wet-sieve (Southey, 1986). Potato root diflusate (PRD), was used for cyst hatching. The second stage juveniles (J_2s) were collected every day and the hatching factors were renewed every time. The J_2s were stored in a refrigerator at about 6 °C in a small volume of water for maximum one week before use in the experiments.

Cysts of *G. pallida* were sterilised in a 1% sodium hypochlorite solution for 30 min and J_{2S} in streptomycin sulphate (0.1 %) for 15 min (Mountain, 1955). All were rinsed in sterile distilled water (SDW) before use in the experiments.

Plant material

Leaves of *Plantago major* were collected from the natural population in the foot of the Ljulin Mountain, 730 m asl. The aerial parts of *Ruta graveolens* and small fruits of *Juglans regia* were collected in the same region from the cultivated areas (Table 1).

Extraction procedure

Air-dried, ground plant material of *P. major* and *Ruta graveolens* was extracted with 80% methanol by classical maceration for 24 h. Fresh small fruits of *Juglans regia* were extracted with 60% methanol by maceration for 15 days.

Procedure to preparfe the plant extracts

After evaporation of the solvent, the resulting crude extract was subjected to further analyzes. For this purpose each plant extract was initially prepared with a stock solution of 10% concentration by

дестилирана вода, последвано от хомогенизиране в ултразвукова баня (Bio Lab) при 30°C. След това, съответният разтвор беше филтруван двукратно през филтърна хартия. Концентрацията, необходима за експериментите беше получена чрез разреждане на основния разтвор със стерилна дестилирана вода (СДВ).

Експериментите бяха проведени при контролирани условия, адаптирани за *Globodera* spp. Метод на Samaliev et al. (2000): - "*in vitro*", беше приложен за да се определи ефекта от концентрацията и времето на излагане на съответния растителен екстракт върху излюпването на $Л_2$ от цистите и спрямо подвижността на $Л_2$ от *Globodera pallida.*

adding sterile distilled water, followed by homogenization in an ultrasonic bath (Bio Lab) at 30°C. After that, the corresponding solution was filtered twice through filter paper. Concentration required for the experiments was obtained by diluting the resulting stock solution with sterile distilled water (SDW).

The experiments were conducted under controlled conditions adapted for *Globodera* spp. Method of Samaliev et al. (2000): - "*in vitro*", was applied to determine the effect of the concentration and time of exposure of the respective plant extract on the hatching of J_2s from the cysts and the mobility of J_2s from *Globodera pallida*.

Таблица 1. Растителни видове използвани в екпериментите срещу цисти и $Л_2$ на *Globodera pallida*

Table 1. List of plant species used against cysts and J_2s of *Globodera pallida*

Plant species Растителен вид	Common name Обичайно наименование	Plant part used Използвана растителна част
Juglans regia L.	Green walnut Зелен орех	Small green fruits Малки зелени плодове
Ruta graveolens L.	Common rue Седефче	Aerial parts (leaves and flowers) Надземна част (листа и цветове)
Plantago major L.	Broad-leaved plantain Живовлек	Leaves Листа

Газ хроматография – мас спектрометрия анализи (ГХ-МС)

Метаноловите екстракти (50 mg) от изследваните видове бяха силирани с 50 µL N, 0-бис- (триметилсилил) трифлуоро-ацетамид (BSTFA) в 50 µL пиридин за 2 h при 50°C.

Спектрите на GC-MS бяха записани на Termo Scientific Focus GC, съчетан с мас детектор Termo Scientific DSQ, работещ в режим EI при 70 eV. Използвана е колона DB-5MS (30 m x 0-25 mm x 0.25 µm). Температурна програма: 100-180°C при 15°C x min-1, 180-300 ° C при 5° C x min^{-1} и 10 min при 300°C. Температура на инжектора 250°C. Скоростта на потока на носещия газ (хелий) е 0.8 mL x мин-1. Инжектирането на разтвора (1 µL) е в сплит 1:10. Метаболитите бяха

Gas Chromatography-Mass Spectroscopy (GC–MS) analysis

The methanolic extracts (50 mg) of studies species (50 mg) were silylated with 50 µL of N,O-bis-(trimethylsilyl) trifluoro-acetamide (BSTFA) in 50 µL of pyridine for 2 h at 50°C.

The GC–MS spectra were recorded on a Termo Scientific Focus GC coupled with Termo Scientific DSQ mass detector operating in EI mode at 70 eV. ADB-5MS column (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) was used. The temperature program was: 100-180 ^{o}C at 15 ^{o}C x min^{-1}, 180-300 20 at 5 ^{o}C x min^{-1} and 10 min hold at 300 ^{o}C. The injector temperature was 250 ^{o}C. The flow rate of carrier gas (Helium) was 0.8 mL x min^{-1}. The split ratio 1:10 1 µL of the solution was injected. The metabolites were identified

идентифицирани като производни на TMSi, сравняващи техните мас спектри и Kovats Indexes (RI) с тези на онлайн наличната база данни за растенията. Мас спектри се деконволюират чрез специализиран софтуер (AMDIS), преди сравнение с базите данни. RI от съединенията бяха записани със стандартна калибрираща смес на п-алкани (C9-C36) (Restek, Cat No. 31614, доставена от Teknokroma, Испания)

In vitro токсичност

Излюпване на Л$_2$: Растителните екстракти (*Juglans regia*, *Ruta graveolens* и *Plantago major*, концентрация 2.5, 5.0 и 10.0%) в доза от 2 ml бяха пипетирани в часовникови стъкла, поставени в петриеви блюда (8.5 cm). Пет предварително стерилизирани цисти (~ 300 яйца/циста) на *G. pallida* се поставяха в часовникови стъкла, след което петриевите блюда се затваряха и се поставяха при температура 20°C и експозиция 1, 2, 3 и 6 седмици. Контролата се състоеше от пет предварително стерилизирани цисти поставени в стрерилна дестилирана вода (СДВ). Всеки вариант е в четири повторения. След изминаване на експозицията цистите бяха промити със СДВ и преместени в часовникови стъкла с ККЕ. Излюпените Л$_2$ се преброяват всяка седмица в продължение на 28 дни (четири седмици). След всяко преброяване ККЕ в часовниковите стъкла се подменяше със свеж. След това цистите се строшаваха в дестилирана вода, броят на останалите пълни яйца в цистите се брои и скоростта на излюпване се изчислява по формулата:

as TMSi derivatives comparing their mass spectra and Kovats Indexes (RI) with those of an on-line available plant specific database. The measured mass spectra were deconvoluted by the Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System (AMDIS), before comparison with the databases. RI of the compounds were recorded with standard n-hydrocarbon calibration mixture (C9-C36) (Restek, Cat no. 31614, supplied by Teknokroma, Spain) using AMDIS 3.6 software.

In vitro toxicity

Egg hatching: Plant extracts (*Juglans regia*, *Ruta graveolens* and *Plantago* major, concentration 2.5, 5.0 and 10.0%) at a dose of 2 mL were pipetted into clock-glasses placed in petri dishes (8.5 cm). Five pre-sterilized cysts (~300 eggs/cyst) of *Globodera pallida* were placed in a clock-glass, then the plates were closed and placed in a temperature of 20°C and exposure 1, 2, 3 and 6 weeks. The control consisted of five cysts in SDW. Each variation is in four reps.

After the exposure the cysts were removed, washed with SDW and placed in clock-glass with the PRD. Hatched J$_2$s were counted at weekly intervals for 28 days (four weeks). After each counted, the PRD in the clock-glass was replaced. Cysts were then crushed in distilled water, the number of the remaining full eggs in the cysts were counted and the hatching rate was calculated according to the formula:

скорост на изллюпване = излюпени Л$_2$ x 100/яйца + Л$_2$
hatching rate = hatched J$_2$ x 100/eggs + J$_2$

Жизненост на Л$_2$: Растителни екстракти (*Juglans regia*, *Ruta graveolens* и *Plantago major*, концентрация 2.5, 5.0 и 10.0%) в доза от 2 mL се пипетираха в часовникови стъкла, поставени в петриеви блюда (8.5 см). 100 Л$_2$ на *G. pallida* с 0.2 mL СДВ се пипетираха във всяко часовниково стъкло, след това се

J$_2$s motility: Plant extracts (*Juglans regia*, *Ruta graveolens* and *Plantago* major, concentration 2.5, 5.0 and 10.0%) at a dose of 2 mL were pipetted into clock-glass placed in petri dishes (8.5 cm). 100 J$_2$ of *Globodera pallida* 0.2 mL SDW was pipetted into each clock-glass, then covered and placed in a temperature

затваряха и се поставяха при температура 20°C и експозиция 12, 24, 48 и 72 часа. Контролата е съставена от 100 $Л_2$ на *G. pallida*, в СДВ. Всеки вариант е в четири повторения. След изтичане на посочената експозиция, $Л_{2S}$ се прехвърляха на часовникови стъкла със СДВ в продължение на 24 часа. Процентът на подвижност на J_2s се установява чрез докосване с финна нематологична игла под стереомикроскоп. $Л_{2S}$, които след докосване не показват движения се записват като неподвижни (мъртви).

Експериментът се провежда при контролирани условия, адаптирани за *Globodera* spp. метод на Samaliev et al. (2000): - "*in vitro*", за да се определи ефекта от концентрацията и времето на излагане на съответния растителен екстракт върху излюпването на $Л_2$ от цисти и върху подвижността на $Л_2$ на *Globodera pallida*.

Статистически анализ

Статистическият анализ беше извършен в SPSS. One-way ANOVA, последван от множество диагностични тестове на Duncan, бяха използвани за сравняване на контролата и групите данни, съответно. Стойност на $P_{0.05}$ се счита за значима.

of 20°C and exposure 12, 24, 48 and 72 hours. The control consists of 100 J_2s, of the *G. palldia*, in the SDW. Each variation is in four replicates. After the expiration of the indicated exposure, J_2s were transferred to a clock-glasses with SDW for 24 hours. The percent motility of J_2s is detected by a touching with a fine needle under a stereomicroscope. J_2s, which after touch do not show, slow movements are recorded as non motility (dead).

The experiment was conducted under controlled conditions adapted for *Globodera* spp. method of Samaliev et al. (2000): - "*in vitro*", to determine the effect of the concentration and time of exposure of the respective plant extract on the hatching of J_2s from the cysts and on the motility of J_2s of *G. pallida*.

Statistical analysis

Statistical analysis was carried out in SPSS. One-way ANOVA followed by Duncan multiple range post-hoc tests were used to compare control and means of data groups, respectively. A value of $P_{0.05}$ was considered significant.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Ефект на растителните екстракти върху излюпването и подвижността на ларви втора възраст

Данните за ефекта на растителните екстракти върху излюпването на $Л_2$ на *G. pallida* са представени в Таблица 2. Резултатите показват, че тестваните растителни екстракти проявяват ефикасност върху излюпването на $Л_2$, като във всички тествани варианти броят на излюпените $Л_2$ е значително по-малък от броя в контролата.

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of plant extracts on hatching and motility of second-stage juveniles

The data for the effect of plant extracts on the hatching of second-stage juveniles of the *Globodera pallida* are presented in Table 2. The results show that the tested plant extracts have efficacy on hatching of J_{2S} from the cysts *of G.pallida* and in all tested variants the number of hatched J_{2S} is significantly less than the number in the control.

Таблица 2. Ефикасност на тестваните растителни екстракти *J. regia, R. graveolens*, *P. major* и СДВ (контрола) върху излюпването (%) на $Л_2$ на *G. pallida* при различна концентрация и експозиция и 4 седмици след прехвърляне на цистите в ККЕ

Table 2. Efficacy of tested plant extracts *J. regia, R. graveolens*, *P. major* and SDW (control) on the hatching (%) of J_{2S} *G. pallida* at different concentration and exposure and 4 weeks after transferring the cysts in PRD

Exposure/ weeks Експозиция/ седмици*	Hatched J_2 (%) / Concentration Излюпени $Л_2$ / Концентрация			
	2.5%	5.0%	10.0%	control контрола
Juglans regia				
1	63.92b*	55.62c	33.10d	76.22a
2	53.21b	45.02c	27.16d	81.05a
3	44.40b	32.36c	22.15d	84.71a
6	41.33b	30.38c	19.35d	84.33a
Ruta graveolens				
1	71.92a	68.18b	58.36c	73.38a
2	68.25b	61.40c	50.83d	79.78a
3	47.61c	53.90b	44.27d	82.96a
6	44.81c	53.06b	41.51d	83.23a
Plantago major				
1	77.73a	75.57b	68.63c	76.15ab
2	71.18b	72.05b	62.55c	81.05a
3	66.27b	63.80c	57.60d	84.71a
6	64.58b	63.18b	56.58c	84.33a

*Values followed by the same letter are not significantly different according by Duncan's test ($P_{0.05}$).
*Стойности, последвани от една и съща буква, не се различават значително според теста на Дънкан ($P_{0.05}$).

Най-нисък инхибиращ ефект беше отчетен при растителен екстракт *Plantago major* във всички тествани концентрации и експозиции и след пренасяне на цистите в ККЕ за 4 седмици, съответно 77.73-68.63%, 71.18-62.55%, 66.27-57.60% и 64.58-56.58%. Най-висок инхибиращ ефект беше отчетен при всички тествани концентрации и експозиции при варианти с растителен екстракт *Juglans regia*, съответно 63.92-33.10%, 53.21-27.16%, 44.40-22.15% и 41.33-19.35%, следван от растителен екстракт *Ruta graveolens* съответно 71.92-58.36%, 68.25-50.83%, 47.61-44.27% и 44.81-41.51%. При повишаване на

The lowest inhibitory effect was recorded for the plant extract *Plantago major* in all tested concentration and exposure and after transferring the cysts in PRD for the 4 weeks, respectively 77.73-68,63%, 71.18-62.55%, 66.27-57.60% and 64.59-56.58%. The highest inhibitory effect was recorded in all tested concentration and exposure variants of plant extract *Juglans regia*, respectively 63.92-33.10%, 53.21-27.16%, 44.40-22.15% and 41.33-19.35%, followed by plant extract *Ruta graveolens*, respectively 71.92-58.36%, 68.25-50.83%, 47.61-44.27% and 44.81-41.51%. When

експозицията и концентрацията на растителните екстракти *Juglans regia*, *Ruta graveolens*, *Plantago major*, процентът на излюпени $Л_2$ от цистите намаляваше. Всички тествани растителни екстракти показват нематоциден ефект и инхибират излюпването на инвазионните ларви втора възраст от цистите.

При концентрацията 2.5% във варианти с растителния екстракт на *Juglans regia*, процентът на неподвижните ларви втора възраст след експозиция 72 часа беше 37.0%. При другите две по-високи концентрации 5.0 и 10.0%, процентът на неподвижните $Л_2$ след експозиця 48 и 72 часа се увеличаваше много бързо, съответно 69.7, 74.7% (концентрация 5.0%) и 79.0, 81.7% (концентрация 10.0%) (Фигура 1). След прехвърлянето на $Л_2$ в часовникови стъкла с дестилирана вода в продължение на 24 часа, много малка част от $Л_2$ възстановяват подвижността и процентът на неподвижност намалявя до 61.2 и 73.0%. Има данни, че нематоцидната активност на *J. regia* се дължи на монохидрокси, дихидрокси и трихидрокси фенолни киселини (Mahajan et al., 1985). Mahajan et al. (1992) съоб-щава, че няколко фенолни киселини - кафеена, 2,6-дихидрокси бензоена, р-метоксиканелена, показват висока нема-тоцидна активност срещу *Meloidogyne incognita*. Настоящият ГХ-МС анализ на екстракта от *J. regia* показа наличието на фенолни киселини (Таблица 3).

Процентът на неподвижните ларви втора възраст при концентрации 5.0 и 10.0% и експозиция 48 и 72 часа с растителен екстракт *Ruta graveolens* беше сходен с този на растителен екстракт *J. regia*, съответно 57.7, 65.7% и 71.7, 76.0% (Фигура 1). При по-ниската тествана концетрация от 2.5% и експозиция 72 часа, процентът на неподвижните $Л_2$ е значително по-нисък в сравнение с другите две по-високи концетрации, съответно 33.5%, което е сходно с ефикасността на растителния екстракт *J. regia* при същото време на експозиция и концентрация. След прехвърлянето на $Л_2$ в дестилирана вода в продължение на 24 часа, резултатите са сходни с растителен

increased exposure and concentration of the plant extracts *Juglans regia*, *Ruta graveolens*, *Plantago major*, the percentage of hatched J_2s from the cysts was decreased. All tested plant extracts showed nematicide effect and inhibit the hatching of J_{2S} from the cysts.

Concentration, 2.5% in plant extract *Juglans regia* the percent of non motility second-stage juveniles after 72h was 37.0%. In another higher concentration 5.0 and 10.0% the percent of non motility J_2s after 48 and 72h increased very rapid and was as a followed 69.7, 74.7% (5.0% concentration) and 79.0, 81.7% (10.0% concentration) (Figure 1). After transferring the J_2s to clock glasses with destilled water for 24h very small part of J_{2S} recovered the motility and percent of a non motility decreased to 61.2 and 73.0%. The major nematicide activity of *J. regia* is in a relation with phenolic activity compounds like monohydroxy, dihydroxy and trihydroxy acid (Mahajan et al., 1985). Mahajan et al. (1992) reported that several phenolic compounds, for example, dihydroxybenzoic acid dihydroxy caffeic acid syringic acid showed high nematicidal activity against *Meloidogyne incognita*. The present GC-MS analysis with the plant extract *J. regia* revealed the same phenolic complex (Table 3).

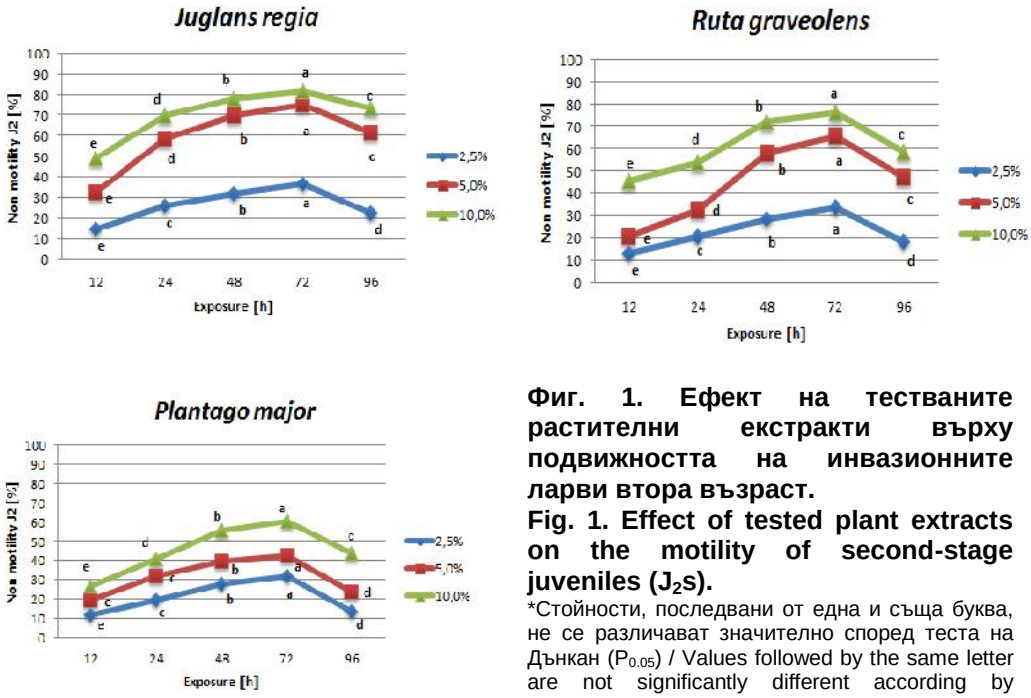
Second-stage juveniles non motility was similar at concentration 5.0 and 10.0% and exposure 48 and 72h in plant extract *Ruta graveolens*, respectively 57.7, 65.7% and 71.7, 76.0% (Figure 1). In less concentration, 2.5% and exposure 72h the percent of non motility J_2s was significantly lower than the others higher concentrations respectively 33.5% which is similar with the efficacy of the plant extract *J. regia* in the same time of exposure and concentration. After transferring the J_2s in destilled water for 24h, results are like to plant extract *J. regia*. The percent of non motility J_2s decreased to 47.5 and 58.5%. The

екстракт *J. regia*. Процентът на неподвижните $Л_2$ намалява до 47.5 и 58.5%. Резултатите от *in vitro* експеримента са подобни на изследванията на Sasanelli (1992), с растителен екстракт от листа на *R. graveolens* срещу растително-паразитната нематода *Xiphinema index in vitro*. Същият автор съобщава, като активни компоненти на екстракта от листата на *R. graveolens* алкалоиди, терпени и кумарини (ксантотоксин) (Sasaneli, 1992). Настоящият ГХ-МС анализ на растителния екстракт R. graveolens показа също наличието на алкалоиди и кумарини (Таблица 3).

Растителният екстракт *Plantago major* проявява най-нисък нематоциден ефект върху подвижността на инвазионните ларви втора възраст. При тестваните по-високи концентрации 5.0 и 10,0% и експозиция 48 и 72 часа, процентът на неподвижните $Л_2$ беше както следва 39.7, 42.7% и 55.2, 60.2% (Фигура 1). При концентрация 2.5% и експозиция 72 часа, процентът на неподвижност беше 31.7%. След прехвърлянето на $Л_2$ в дестилирана вода в продължение на 24 часа, процентът на неподвижните $Л_2$ намаляваше, съответно до 23.5 и 43.7% при концентрация 5.0 и 10.0%. Екстрактът от *P. major* е богат на въглехидрати, особено на захарния алкохол - сорбитол. Няма литературни данни за нематоцидна активност на веществата в тази метаболитна група с изключение на полизахарида хитозан (Khalil and Badawy, 2012).

results in the *in vitro* experiment are the similar with the research of Sasanelli, 1992 with a plant extract from leaves of *R. graveolens* against a nematode *Xiphinema index in vitro*. The same author reported that plant *R. graveolens* contains different biological activity compounds like alkaloids, terpens and coumarins (xanthotoxin) (Sasaneli, 1992). The present GC-MS analysis with the plant extract *R. graveolens* revealed the similar alkaloids and the same coumarins (xanthotoxin) (Table 3).

Plant extract *Plantago major* has a lowest nematicidal effect on motility of J_{2S}. In higher concentration 5.0 and 10.0% and exposure 48 and 72h the percent of non motility J_2s was sutable 39.7, 42.7% and 55.2, 60.2% (Figure .1). In concentration 2.5% and exposure 72h the percent of non motility was 31.7%. After transferring the J_2s in destilled water for 24h, the percent of non motility juveniles decreased to 23.5 and 43,7% respectively in concentration 5.0 and 10.0%. The extract of *P. major* is rich in carbohydrates, especially sugar alcohol - orbitol. No data were found in the literature on nematode activity of the substances in this metabolic group except the chitosan polysaccharide (Khalil and Badawy, 2012).



Фиг. 1. Ефект на тестваните растителни екстракти върху подвижността на инвазионните ларви втора възраст.

Fig. 1. Effect of tested plant extracts on the motility of second-stage juveniles (J_2s).

*Стойности, последвани от една и съща буква, не се различават значително според теста на Дънкан ($P_{0.05}$) / Values followed by the same letter are not significantly different according by Duncan's test ($P_{0.05}$)

Подвижността на $Л_2$ беше наблюдавана след 12, 24, 48 и 72 часа експозиция във всеки един от трите разтвора на растителните екстракти – *Juglans regia*, *Ruta graveolens* и *Plantago major* последвано от прехвърляне и инкубиране в дестилирана вода в продължение на 24 часа (между 72-96).

Метаболитни профили на изследваните растителни екстракти

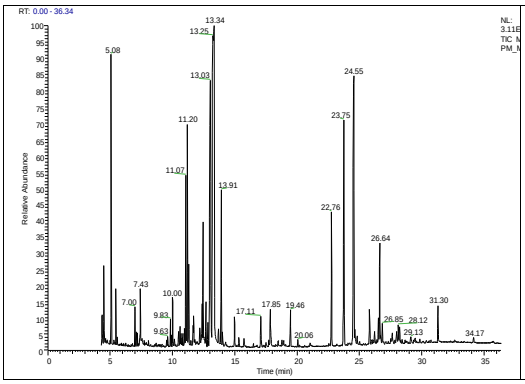
Метаболитните профили на метанолови екстракти от изследваните видове бяха анализирани чрез ГХ-МС. Големият брой пикове в хроматограмите показва наличието на много вещества (Фигура 2).

The motility of J_2s was observed after 12, 24, 48 and 72h exposure in each of three solutions of the plant extracts – *Juglans regia*, *Ruta graveolens* and *Plantago major*, followed by a transferring and incubation in distilled water for 24h (between 72-96).

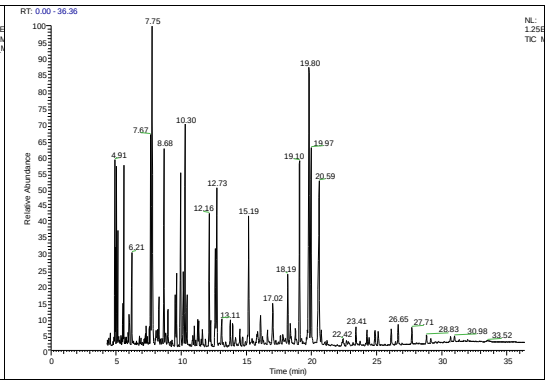
Metabolic profiles of studied plant extracts

Metabolite profiles of methanolic extracts of studied species were analyzed by GC/MS. The large number of peaks in the chromatograms indicate the presence of many substances (Figure 2).

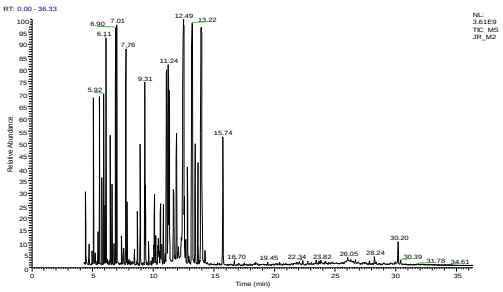
A



B



C



Фиг. 2. ГХ-МС хроматограми на изследваните видове:
Fig. 2. GC/MS chromatograms of studied species:
A – *Ruta graveolens*
B – *Plantago major*
C – *Juglans regia*

Чрез сравняване на мас спектрите и индексите на Ковач (RI) на неизвестните съединения с тези в наличната база данни 34, 45 и 30 съединения бяха идентифицирани съответно в екстрактите на *R. graveolens*, *P. major* и *J. regia* (Таблица 3).

By comparing the mass spectra and Kovats Indexes (RI) of unknown compounds with those of available database 34, 45 and 30 compounds were characterized and identified respectively of *R. graveolens*, *P. major* and *J. regia* (Table 3).

Таблица 3. Идентифицирани метаболити в метанолови екстракти на изследваните видове чрез ГХ-МС
Table 3. Metabolites identified in the methanolic extracts of studied species by GC-MS

Compounds Съединения	RI	Studied plant extracts* Изследвани ратителни екстракти*		
		Juglans regia	***Plantago major***	***Ruta graveolens***
1	**2**	**3**	**4**	**5**
Organic acids **Органични киселини**				
Phosphoric acid Фосфорна киселина	1267	1,70		
Succinic acid Янтарна киселина	1311	0,35	0,93	0,04
Glyceric acid Глицеринова киселина	1324	0,13		0,06
Fumaric acid Фумарова киселина	1347	0,88		

Table3 (continue)
Таблица 3 (продължение)

1	2	3	4	5
Malic acid Ябълчена киселина	1482	4,46		0,61
Threonic acid Треонинова киселина	1551	5,07	0,10	0,18
Ribonic acid Рибонова киселина	1757	0,23	0,22	0,21
Quinic acid Хинова киселина	1855	2,06		0,33
Ascorbic acid Аскорбинова	1943	0,02		
Phenolic acids				
Фенолни киселини				
3,5-Dimethoxy-4-hydroxybenzoic acid (Syringic acid) 3,5-Диметокси-4-хидрокси бензоена киселина (Сирингова киселина)	1896	0,40		
3,4,5-Trihydroxybenzoic acid (Gallic acid) 3,4,5-Трихидроксибензоена киселина (Галова киселина)	1951	1,02		
3,5-Dihydroxybenzoic acid 3,5-Дихидроксибензоена киселина	2007		0,01	
trans -3,4-Dihydroxycinnamic acid (Caffeic acid) *trans* -3,4-Дихидроксиканелена киселина (Кафеена киселина)	2134		0,11	
Polyols				
Полиоли				
Glycerol Глицерол	1269		5,64	
Meso-erythritol Мезо-Еритрол	1493		0,25	
2-Hydroxyglutaric acid 2-Хидроксиглутарова киселина	1566		0,04	
Arabinonic acid, 1,4-lactone Арабинова киселина, 1,4-лактон	1630	0,84	0,10	0,02
Sorbitol Сорбитол	1943		34,76	
Myo-Inositol Мио-Инозитол	2088	2,37	0,22	0,09
Galactosylglycerol Галактозил глицерол	2313	0,07	1,01	0,03
2-Hexadecanoyl glycerol 2-Хексадеканил глицерол	2584		0,16	
Carbohydrates				
Въглехидрати				
Arabinose Арабиноза	1677	3,56		
Ribose Рибоза	1701	0,37	0,20	0,06
Monosaccharide 1 Монозахарид 1	1738	0,08		
Fructose 1 Фруктоза 1	1803	2,40	2,64	1,13
Fructose 2 Фруктоза 2	1810	3,32	5,03	1,73
Fructose 3 Фруктоза 3	1817	4,92	1,70	0,97
Monosaccharide 2 Монозахарид 2	1844	0,05		
Monosaccharide 3 Монозахарид 3	1847		0,08	0,01

Table3 (continue)
Таблица 3 (продължение)

1	2	3	4	5
Glucose Глюкоза 1	1891	13,17	2,64	83,65
Monosaccharide 4 Монозахарид 4	1893	4,86		
Monosaccharide 5 Монозахарид 5	1903	0,54	1,25	0,02
Glucose 2 Глюкоза 2	1936	12,59		
Galactose Галактоза	1965		0,34	
Monosaccharide 6 Монозахарид 6	1978		3,74	
Monosaccharide 7 Монозахарид 7	1979	14,55		0,20
Monosaccharide 8 Монозахарид 8	1983	15,78		
Disaccharide 1 Дизахарид 1	2522		3,34	2,01
Sucrose Захароза	2637	0,03	2,76	2,98
Disaccharide 2 Дизахарид 2	2639		8,11	
Disaccharide 3 Дизахарид 3	2641		15,06	
Threhalose Трехалоза	2740	0,09	0,11	
Disaccharide 4 Дизахарид 4	2819		0,06	
Disaccharide 5 Дизахарид 5	2859		0,31	
Trisaccharide 1 Тризахарид 1	2874		0,10	
Trisaccharide 2 Тризахарид 2	2883		0,38	
Trisaccharide 3 Тризахарид 3	2901		0,37	
Trisaccharide 4 Тризахарид 4	2907		0,06	
Sugar derivative 1 Въглехидратно производно 1	2786		2,76	
Sugar derivative 2 Въглехидратно производно 2	3134		1,23	
Amino acids **Аминокиселини**				
Valine Валин	1217		0,07	
Serine Серин	1259		0,10	
Threonine Треонин	1295		0,08	
Phenylalanine Фенилаланин	1365.0			0,02
Pyroglutamic acid Пироглутаминова киселина	1522	0,13	1,09	
Alanine Аланин	1556		0,10	
Sterols **Стероли**				
Megestrol acetate / Мегестрол ацетат	2659			1,83

Table3 (continue)
Таблица 3 (продължение)

1	2	3	4	5
Campesterol Кампестрол	3245			0,20
β-Sitosterol β-Ситостерол	3352		0,20	0,13
Alkaloids **Алкалоиди**				
Furoquinoline alkaloid (skimmianine) Фурохинолинов алкалоид (скимианин)	2299			0,07
Dictamine 6,7 dimethoxy (kokusaginin) 6,7 диметоксидиктамин (кокусагинин)	2382			0,21
Coumarins Furocoumarins **Кумарини Фурокумарини**				
Xanthotoxin (methoxsalen) Ксантотоксин (метоксален)	1935			0,48
Bergaptenn Вергаптен	1955			0,34
Fatty acids **Мастни киселини**				
Octanoic acid (Caprylic acid, C8:0) Октанова киселина (Каприлова киселина, C8:0)	1534		0,09	0,62
Hexadecanoic acid (Palmitic acid, C16:0) Хексадеканова киселина (Палмитино киселина, C16:0)	1922		0,94	1,28
Octadecadienoic acid (Linoleic acid, C18:2) Октадекадионова киселина (Линолова киселина, C18:2)	2089			0,05
Octadecatrienoic acid (Linolenic acid, C18:3) Октадекатриенова киселина (Линоленова киселина, C18:3)	2120		1,03	0,13
Octadecanoic acid (Stearic acid, C18:0) Октадеканова киселина (Стеаринова киселина, C18:0)	2186			0,15

*Data are expressed as percentage of the total peak area of identified compounds [%]
*Данните са изразени като процент от всички идентифицираните съединения [%]

Най-добре представената метаболитна група е на въглехидратите. Изомери на фруктоза, глюкоза и много монозахариди, дизахариди и тризахариди бяха определени. Широка гама от органични, фенолни, амино и мастни киселини бяха установени. Допълнително са идентифицирани алкалоиди, кумарини и стероли в екстракта на *R. graveolens*. Идентифицираните съединения са в съответствие с вече докладвани данни за химичния състав на *R. graveolens* (Ekiert and Kisiel, 1997; Kostova et al., 1999, Arora and Tandon 2015). Основният пик на хроматограмата на екстракта от *P. major* беше идентифициран като сорбитол (захарен алкохол). В екстракта на *J. regia*, освен въглехидратите беше идентифи-

The best presented metabolic group is carbohydrates. Isomers of fructose, glucose and many monosaccharides, disaccharides and trisaccharides were detected. Wide range of organic, phenolic, amino and fatty acids were determined also. Additionally alkaloids, coumarins and sterols were identified of the extract of *Ruta graveolens*. The identified compounds are in acondance with previously preportrd data concerning chemical composition of *R. graveolens* (Ekiert and Kisiel, 1997; Kostova et al., 1999; Arora and Tandon 2015). The main peak of the chromatogram of *P. major* extract was identified as sorbitol (polyhydric alcohol). In the *J. regia* extract, besides carbohydrates, a wide variety of organic

цирано голямо разнообразие от органични и фенолни киселини. Ябълчената и треонинова киселини са определени като основни. Фосфорната и галова киселини са добре представени също.

and phenolic acids were identified. Malic and threonic acids were determined as the most abundant. Phosphoric and gallic acids were well present also.

ИЗВОДИ

Настоящото проучване показа, че всички растителни екстракти, тествани в лабораторни условия, имат нематоцидна ефикасност срещу *G. pallida*. Най-висока ефикасност срещу неприятеля демонстрира екстрактът от *Juglans regia*, последван от екстрактите на *Ruta graveolens* и *Plantago major*.

Ефикасността на растителния екстракт *Juglans regia срещу G. pallida* се съобщава за първи път.

ГХ-МС анализа на растителните екстракти определи състава на част от съединенията (главно неполярни) в тях. Получените данни могат да бъдат използвани в бъдещи експерименти или тези вещества да бъдат химически синтезирани и използвани за контрол на растително-паразитни нематоди.

Необходимо е провеждането на допълнителни изследвания за установяване на нематоцидната активност на изследваните екстракти срещу *G. pallida* по картофа, при провеждането на *in vivo* опити и когато се прилагат в почвата при полеви условия.

CONCLUSIONS

This study showed that all plant extracts tested in laboratory conditions has a nematicidal efficacy against *G. pallida*. The highest efficacy against pest demonstrated *Juglans regia* followed by *Ruta graveolens* and *Plantago major*.

The efficacy of plant extract *Juglans regia* against *G. pallida was* reported for the first time.

The conducted GC-MS analysis of plant extracts showed their basic composition of the compounds and can be studied in detail in future experiments or to be chemically synthesized and used for the control of plant-parasitic nematodes.

Also is required conducting a further research to established their nematicidal activity of tested plant extracts against *G. pallida* on potato, when conducted *in vivo* experiments and applying in the soil in field conditions.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Arora, S. and S. Tandon**, 2015. DNA fragmentation and cell cycle arrest: a hallmark of apoptosis induced by Ruta graveolens in human colon cancer cells. *Homeopathy*, 104, 36-47.

2. **Caboni, P., M. Saba, C. Oplos, N. Aissani, A. Maxia, U. Menkissoglu-Spiroudi and N. Ntalli**, 2014. Nematicidal activity offuranocoumarins from parsley against *Meloidogyne* spp. *Pest Management Science*

3. **Danhquah, W.B., M.A. Back, I.G.Grove and P.P.J. Haydock**, 2010. Potential use of plant extracts in potato cyst nematode management. Aspects of Applied Biology 103,2010, 3rd Symposium on Potato Cyst Nematodes.

4. **D'Addabbo.T, T. Carbonara Pia M. Argentieri, V. Radicci, P. Leonetti, L. Villanova and P. Avato**, 2013. Nematicidal potential of Artemisia annua and its main metabolites, Eur J Plant Pathol (2013) 137:295–304 DOI 10.1007/s10658-013-0240-5.

5. **Ekiert H. and W. Kisiel**, 1997. Coumarins and alkaloids in shoot culture of *Ruta graveolens* L. *Acta Soc. Bot. Polon.* 66: 329-332.

6. **Jang, J. Y., Q. Le Dang, Y. H. Choi, G. J. Choi, K. S. Jang, B. Cha and J.C. Kim**, 2014. Nematicidal activities of 4-quinolonealkaloids isolated from the aerial part of *Triumfetta grandidens*against *Meloidogyne incognita*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
7. **Khalil M.S. and M.E.I. Badawy**, 2012. Nematicidal activity of a biopolymer chitosan at different molecular weights against root-knot nematode**,** *Meloidogyne incognita*. *Plant Protect. Sci*., 48: 170-178.
8. **Kostova I., A. Ivanova B. Mikhova and I. Klaiber**, 1999. Alkaloids and Coumarins from Ruta graveolens. Monatshefte für Chemie 130, 703-707.
9. **Mahajan, R., D.J. Kaur and K.L. Bajaj**, 1992. Nematicidal activity of phenolic compounds against *Meloidogyne incognita. Nematologia Mediterranea*, 20: 217-219.
10. **Mahajan, R., P. Singh, and K.L. Bajaj**, 1985. Nematicidal activities of some phenolic compounds against *Meloidogyne incognita. Revue Nematology,* 8, 161-164.
11. **Mountain, W.**, 1955. A method of culturing plant-parasitic nematodes under sterile conditions. In: Proceeding of the Helminthological Society of Washington, 16: 154-155.
12. **Ntalli, N. G., and P. Caboni**, 2012. Botanical nematicides: Areview. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(40), 9929-9940.
13. **Perry, R.N. and M. Moens**, 2011. Survival of parasitic nematodes outside the host. In: Perry, R.N. & Wharton, D.A. (Eds). Molecular and physiological basis of nematode survival.
14. **Samaliev H, F.L. Andreoglou, S.A. Elawad, N.G.M. Hague, S.R. Gowen,** 2000. The nematicidal effects of the bacteria Pseudomonas oryzihabitans and Xenorhabdus nematophilus on the root-knot nematode Meloidogyne javanica. Nematology, 2:507-514
15. **Samaliev, H. and D. Stoyanov**, 2007. Parasitic Nematodes of Crop Plants and Their Control. Agricultural academic press, Plovdiv, pp. 328.
16. **Samaliev, H.**, 2011. Plant-parasitic nematodes associated with potatoes (*Solanum tuberosum* L.) in Bulgaria. Plant Science, 48 (5) 470-474.
17. **Sasanelli, N.**, 1992. Nematicidal activity of aqueous extracts from leaves of *Ruta graveolens* on *Xiphinema index.*
18. **Southey, J. F.**, 1986 Laboratory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes. Ministry of Agriculture, Fisheries and Foods. London, U.K., pp. 202.
19. **Whitehead, A.G., D.J. Tite, J.E. Fraser and A.J.F. Nicholls**, 1984. Differential control of potato cyst nematodes, Globodera rostochiensis and G. pallida by oxamyl and the yields of resistant and sus-ceptible potatoes in treated and untreated soils. Annals of Applied Biology 105: 231-244