Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2019, 22 (1), 337-347
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan
ISSN 1311-0489 (Print)
ISSN 2367-8364 (Online)

Влияние на светлината при микроразмножаване на *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav.

Първин Халкоглу, Светла Янчева*

Аграрен университет, бул. Менделеев 12, 4000 Пловдив,България

Effect of the Light Source on *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav. Micropropagation

Pervin Halkoglu, Svetla Yancheva*

Agricultural University, 12 Mendeleev Str., 4000 Plovdiv, Bulgaria
**E-mail: svetla20@hotmail.com*

Original scientific paper

Received: 09.05.2019 *Accepted:* 21.05.2019 *Published:* 03.07.2019

РЕЗЮМЕ

В сравнително проучване за микроразмножаване на лечебното растение *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav. беше оценен ефекта на светлината от бели флуоресцентни лампи (FL) и алтернативните LED светлини – бяла (LW), червена (LR), синя (LB), LMикс (LED червена: синя: дълга синя: бяла). Експерименталните резултати показаха, че светодиодните източници с различни спектри имат специфично влияние върху растенията *Fabiana*, отглеждани *in vitro*. Най-много нови летораси се формират, когато култивирането се извършва при бяла светлина – 6.56 в контролното третиране (FL), последвано от LW (5.56). Най-високи стойности на индикаторите средна височина на растенията (5.04) и коефициент на мултипликация (4.44), бяха отчетени за експлантите, изложени също на бяла флуоресцентна светлина в сравнение с вариантите на LED осветление. Анализът на данните за средния брой корени

SUMMARY

The comparative study evaluated the effect of alternative LEDs light as white (LW), red (LR), blue (LB), LMix (LED Red: Blue: DeepBlue: White) and white fluorescent tubes (FL) on micropropagation of *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav.

The experimental results showed that the LED light sources with different spectra had a specific influence on *in vitro* grown *Fabiana* plants. The best shoot formation was established when plants cultivation was carried out under white light – 6.56 in the control treatment FW, followed by LW (5.56). The highest values of the indicators mean plant height (5.04) and multiplication coefficient (4.44) were also counted for the explants exposed to white fluorescent light in comparison to the LEDs treatments.

Data analysis for the mean number of roots and mean root lengths had the

и средните дължини на корена показа същата тенденция и позволява да се направи извода, че светодиодните източници с различен спектър не са подходящи от конвенционално използваните флуоресцентни лампи в етапите на микроразможаване на *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav.

Ключови думи: *Fabiana imbricata,* LED светлини, микроразмножаване

same trend and demonstrated that in *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav. micropropagation *in vitro* LEDs with different spectra are not as efficient as conventionally used white fluorescent lamps.

Key words: *Fabiana imbricata,* LEDs light, micropropagation

УВОД

Лекарствените растения са важен източник на животоспасяващи лекарства за голяма част от населението на света и от векове те са използвани традиционно като лекарства. През последните десетилетия повечето фитопрепарати на база вторични метаболити на растения се получават чрез клетъчни култури (Barz et al., 1981; Deus et al., 1982; Raoa and Ravishankar, 2002). Биотехнологичните методи са от съществено значение за подобряване на размножаването и опазването на застрашени от изчезване видове при лечебните растения и *in vitro* регенерацията притежава огромен потенциал за производство на висококачествени лекарствени препарати от растителен произход (Tripathi and Tripathi, 2003).

Лечебното растение *Fabiana imbricata* Ruiz et Pavon, наричано още *Pichi Pichi* или *Palo Pichi* принадлежи към семейство *Solanaceae*. То представлява храст, типичен за региона на Андите, произхожда от Чили и обитава Аржентино-Чилийска Патагония. Растенията могат да бъдат открити и в Перу, Боливия и Бразилия (Rätsch, 1998).

F. imbricata Ruiz. et Pav. се използва традиционно в Чилийската народна медицина при заболявания на уринарните пътища и бъбреците, а също така и подпомага храносмилането когато се прилага като чай. *F. imbricata* има дълга история на употреба при лечение на редица заболявания и като хомеопатично средство. Водно-алкохолният екстракт е полезен

INTRODUCTION

Medicinal plants are an important source of life-saving drugs for the majority of the world's population and for centuries they have been traditionally used as pharmaceuticals. In the last decades, most valuable phytochemicals are products of plant secondary metabolism through plant cell culture (Barz et al., 1981; Deus et al., 1982; Raoa and Ravishankar, 2002).

The biotechnological tools are essential to select, multiply and conserve the critical genotypes of medicinal plants and *in vitro* regeneration holds tremendous potential for the production of high-quality plant-based medicine (Tripathi and Tripathi, 2003).

The medicinal plant *Fabiana imbricata* Ruiz et Pavon, also called Pichi Pichi or Palo Pichi belongs to the family of Solanaceae. It is a bush typical of the Andean region, originally from Chile and covering Argentinian-Chilean Patagonia. Plants can also be found in Peru, Bolivia and Brazil (Rätsch, 1998).

F. imbricata Ruiz et Pav. is traditionally used in Chilean folk medicine to treat diseases of the urinary tract and kidneys and also promotes digestion as a tea.

F. imbricata has a long history of use in the treatment of general diseases as well as used in homeopathy. The water/alcohol extract is beneficial as an

антисептик и ободряващ тоник (Rätsch, 1998). Етеричното масло на *Fabiana* се използва главно като диуретик и антисептик на уринарната система. Известно е още, че има антиревматични свойства и ефект върху белодробни заболявания, както и приложение в натуралната козметика (Alonso and Desmarchelier, 2006; Festy, 2016).

Химичният състав на растението *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav. е слабо проучен, но се обръща внимание на изследването на метаболитния му профил като основа за по-нататъшно изолиране и характеризиране на ценни вторични метаболити.

Schmeda-Hirschmann et al. (2004) докладват, че основните компоненти от вторичните метаболити са рутин, кумарин, скополетин, олеанова киселина и някои сескитерпени.

Fabiana imbricata се отглежда като декоративно растение в закрити и открити градини, в райони без ниски температури (Rätsch, 1998). Растението има висок вегетативен и размножителен потенциал *in vivo* и *in vitro*, но *in vitro* размножаването е по-бързо, което позволява и производство на вторични метаболити (Schmeda-Hirschmann et al., 2004). Растителна регенерация е възможна и чрез калусна култура (Pinker et al., 2008).

Светлината е съществен екологичен фактор, влияещ върху развитието на растенията, морфогенезата и метаболизма при тъканни култури. Действа като сигнален механизъм чрез различни светлинни рецептори и осигурява необходимата енергия за растежа и развитието на растенията чрез фотосинтеза (Wu et al., 2007).

Качеството на светлината, съществена за развитието на растенията и морфогенезата, се свързва с т.н. фотосинтетична активна радиация (PAR), която е с дължина на вълната от 400 до 700 nm и се съчетава с отговора на фоторецепторите за оптимално производство и химичен състав на мета-

antiseptic and general tonic (Rätsch, 1998). *Fabiana* essential oil is principally used as a diuretic and urinary tract antiseptic. It is known to have anti-rheumatic properties and effect on pulmonary diseases, but also it has application in natural cosmetics (Alonso and Desmarchelier, 2006; Festy, 2016).

The chemical composition of the plant *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav. is less studied, but particular interest is paid to the investigation of the metabolite profiles as a basis for further isolation and characterization of valuable secondary metabolites.

Schmeda-Hirschmann et al. (2004) reported that the principal components of the secondary metabolite mixture are rutin, coumarin scopoletin, oleanic acid, and several sesquiterpenoids.

Fabiana imbricata is grown as an ornamental plant inside and in open gardens in areas that rarely see frost (Rätsch, 1998). The plant has a high vegetative propagation potential *in vivo* and *in vitro,* whereas the multiplication *in vitro* is faster, enabling rapid multiplication and valuable secondary metabolite production (Schmeda-Hirschmann et al., 2004). Shoot regeneration is possible also from callus culture (Pinker et al**.,** 2008).

The light is the most essential among the environmental factors influencing the plant growth, morphogenesis and metabolism of plant tissue cultures. It acts as a signaling mechanism through different light receptors and provides the required energy for plant growth and development through photosynthesis (Wu et al., 2007)

The quality of light, essential for plant development and morphogenesis commonly referred to as photosynthetically active radiation (PAR) falls between 400 and 700 nm wavelength and is matched to plant photoreceptors for optimum production, enhanced morphology and chemical composition (Morrow, 2008;

болитите и ускорена морфология (Morrow, 2008; Okwuonu et al., 2017).

Различни изследвания показват, че количеството (интензитет), качеството (спектър), продължителността (фотопериод) и ориентацията на светлината са съществени за фотосинтезата, фотоморфогенезата и фототропизма (Nhut et al., 2000; 2003).

Разработените неотдавна светодиодни източни (LEDs) са посочени като потенциални източници на светлина при *in vitro* култивиране. Те се характеризират със специфични дължини на вълната, малка маса и обем, дълъг полезен живот и ниско отопление, и високо ефективен процес на генериране на светлина (60%), не съдържат живак и не замърсяват околната среда (Yeh and Chung, 2009).

Настоящото изследване беше насочено към изучаване влиянието на светлината при микроразмножаване на *Fabiana* с цел по-нататъшно характеризиране на метаболитните активности на *in vitro* растенията като източник за производство на ценни биологично активни вещества.

Okwuonu et al., 2017).

Various studies have proved light quantity (intensity), quality (spectra), duration (photoperiod) and orientation as essential for photosynthesis, photomorphogenesis and phototropism (Nhut et al., 2000, 2003;)

Recently developed light emission diodes (LEDs) have been pointed out by authors as potential sources of light for *in vitro* environments cultivation. LEDs are characterized by specific wavelengths, small mass and volume, long useful life, low heating and highly efficient light generation process (60%), and do not contain mercury or another hazard element to the environment (Yeh and Chung, 2009).

The present investigation was directed to study the effect of the light on *Fabiana* micropropagation aiming further characterization of the metabolic activities of *in vitro* plants as a source for the production of valuable biologically active substances.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Растителен материал *in vitro*

Растителният материал от *Fabiana imbricata f. violacea* е получен при *in vitro* култура на безхормонална среда MS (Murashige and Scoog, 1962) и се поддържа на оптимизирана среда A33 съдържаща основен състав MS с добавка на захароза (20 g l^{-1}), Merk агар (6 g l^{-1}), активен въглен (3 g l^{-1}) и растежните регулатори BAP (0.5 mg l^{-1}) и IBA (0.01 mg l^{-1}), при pH 5.7.

Растенията са култивирани в стъклени съдове (обем 180 ml), съдържащи 30 ml хранителна среда, в растежна камера с температура 24±1°C, интензитет на светлината 3000 lx и 16/8h фотопериод и продължителност на субкултивиране 4 седмици.

MATERIAL AND METHODS

Plant material *in vitro.*

Plant material of *Fabiana imbricata f. violacea* was obtained *in vitro* on hormone-free medium MS (Murashige and Scoog, 1962) and maintained on an optimized propagation medium (A33) based on MS with supplemented of sucrose (20 g l^{-1} l), Merk agar (6 g l^{-1}), activated charcoal (3 g l^{-1}) and the growth regulators BAP (0.5 mg l^{-1}) and IBA (0.01 mg l^{-1}), and pH 5.7.

The cultivation of the plants was performed in glass vessels (volume 180 ml), containing 30 ml nutrition medium, in a growth chamber with a temperature of 24±1°C, a light intensity of 3000 lx and 16/8h photoperiod, and duration of the subculture of four weeks.

Ефект на светлинния източник върху развитието на *in vitro* растенията в етап на мултипликация.

Експлантите, култивирани на среда А33 са заложени в 4 варианта на LED светлина (осигурена от Philips Green Power LED модул): бяла (LW), червена (LR), синя (LB), микс – LM (Red:Blue:DeepBlue:White=1:1:1:1) и контрола (FW) – бяла флуоресцентна светлина (OSRAM, 40 W).

Проведеният опит се състои от пет повторения, всяко съдържащо по пет експланта и анализът на данните се основава на три независими експеримента с продължителност на пасажа от четири седмици. Бяха отчетени следните показатели: среден брой летораси на растение, средна височина на растението, коефицент мултипликация, среден брой корени и средна дължина на корените. Ефектът при размножаването беше проучен в динамика чрез събиране на данни на ден 14, 21 и 28, които са анализирани чрез стандартни биометрични методи.

Effect of the light source on the development of *in vitro* plants in the stage of multiplication.

Explants cultivated on medium A33 were exposed to four variants of LED light (provided by Philips Green Power LED research module): white (LW), red (LR), blue (LB), LMix (Red:Blue:DeepBlue:White=1:1:1:1) and a control (FW) of white fluorescent tubes (OSRAM, 40 W).

All investigated treatments consisted of five replications, each containing five explants, and the average data analysis was based on three independent experiments with four weeks subculture duration. The following indicators were counted: mean number of shoots per explant, mean plant height, multiplication coefficient, mean number of roots and mean root length. The effect of the light on the propagation was studied dynamically by data collection on days 14, 21 and 28, and analyzed by standard biometrical methods.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Ефект на светлинния източник и спектъра върху развитието на *in vitro* растенията в етап мултипликация.

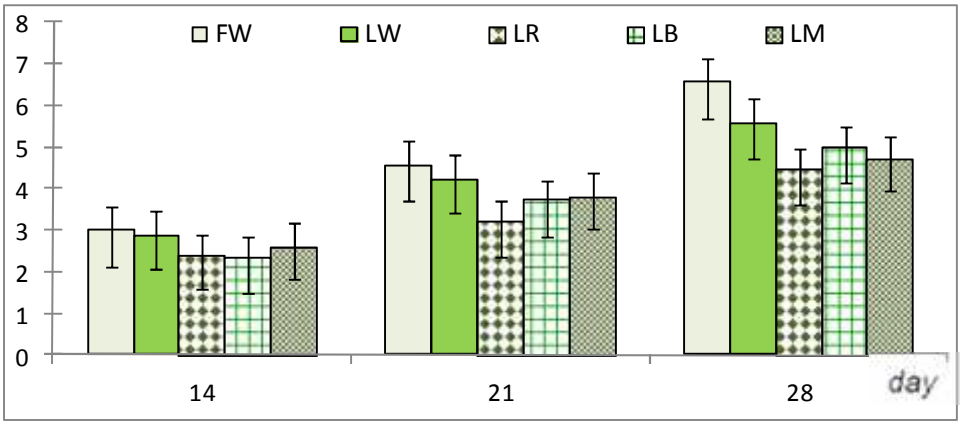
Резултатите от този експеримент показват, че LED източниците на светлина с различни спектри имат специфичен ефект върху *in vitro* култивираните растения *Fabiana*. Най-голям брой формирани летораси 6.56±0.86 са установени при контролния вариант – бяла флуоресцентна светлина (FW), последван от LED бяла (LW) 5.56±0.82 (Фигура 1). Освен това, култивираните растения при вариант LR имат по-малък брой формирани летораси (4.44±0.82) в сравнение с всички изследвани варианти.

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of the light source and spectra on the development of *in vitro* plants in the stage of multiplication.

The results of this experiment showed that the LED light sources with different spectra have a specific effect on *in vitro* grown *Fabiana* plants. The highest shoot formation 6.56±0.86 was established in the control treatment with white fluorescent light (FW), followed by LED white (LW) 5.56±0.82 (Figure 1).

Moreover, cultivated plants under LR had lower shoot formation (4.44±0.82) comparing to all studied treatments.

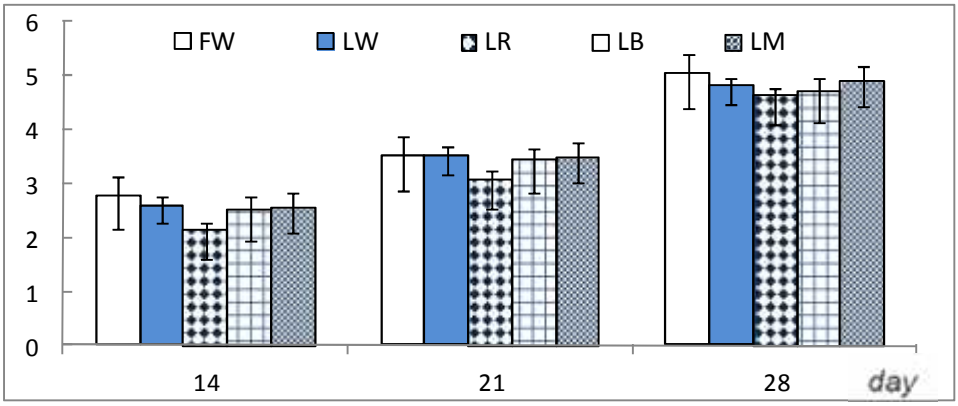


Фиг. 1. Ефект на светлинния източник и спектъра върху микроразмножаване на *Fabiana* – среден брой леторасти на експлант на ден 14, 21 и 28, (±SE)

Fig. 1. Effect of the light source and spectra on *Fabiana* micropropagation as mean number of shoots per explant on days 14, 21 and 28, (±SE)

Анализът на данните за средна височина на растението показа, че на ден 14, растенията култивирани на бяла флуоресцентна светлина (FW) са 2.79 cm и достигат над 5 cm на ден 28 (Фигура 2). При всички варианти бяха установени сходни стойности за средна височина на растението.

Data analysis of the mean plant height indicator showed that on day 14 the plants grown under white fluorescent light (FW) were 2.79 cm, reaching over 5 cm on day 28 (Figure 2). In all the treatments, similar values for the mean plant height were established.



Фиг. 2. Ефект на светлинния източник и спектъра върху микроразмножаване на *Fabiana* – средна височина на растение [cm] на ден 14, 21 и 28, (±SE)

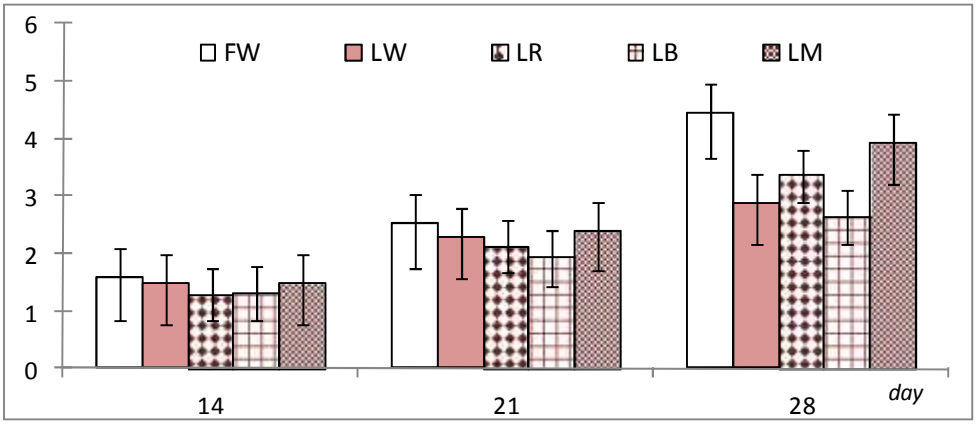
Fig. 2. Effect of the light source and spectra on *Fabiana* micropropagation as mean plant height [cm] on days 14, 21 and 28, (±SE)

Ефектът на светлината върху коефициента на мултипликация, изчисляващ се като среден брой експланти, формирани от изходния експлант показва същата тенденция.

Висока стойност на този индикатор се установява при експлантите, развиващи се при FL (4.44±0.76) в сравнение с вариантите на LED източници, съответно LM (3.92±0.70), LR (3.36±0.86), LW (2.88±0.72), LB (2.64±0.86) след 28 дни култивиране (Фигура 3).

The effect of the light on the multiplication coefficient calculated as a mean number of explants obtained from a single mother explant showed the same tendency.

The high value was established again for the explants developing under FL (4.44±0.76) in comparison to the LED treatments, respectively LM (3.92±0.70), LR (3.36±0.86), LW (2.88±0.72), LB (2.64±.86) after 28 days of culture (Figure 3).



Фиг. 3. Ефект на светлинния източник и спектъра върху коефициента на мултипликация на *Fabiana* на ден 14, 21 и 28, (±SE)
Fig. 3. Effect of the light source and spectra on *Fabiana* multiplication coefficient on days 14, 21 and 28, (±SE)

Влияние на светлината върху развитието на *in vitro* растения в етапа на вкореняване.

Всички експланти (100%) култивирани при различни светлинни условия формират корени. Данните, получени на ден 14, 21 и 28 потвърждават, че бялата флуоресцентна светлина (FW) е най-ефективна и индуцира формирането на висок среден брой корени и средна дължина на корена (Фигура 4). В края на култивирането най-високият среден брой корени е регистриран за FW (6.84±0.80), докато стойността за LED бяла светлина (LW) е 3.36±0.64 и още по-ниска съответно за останалите LED варианти (Фигура

Effect of the light on the development of *in vitro* plants in the stage of rooting.

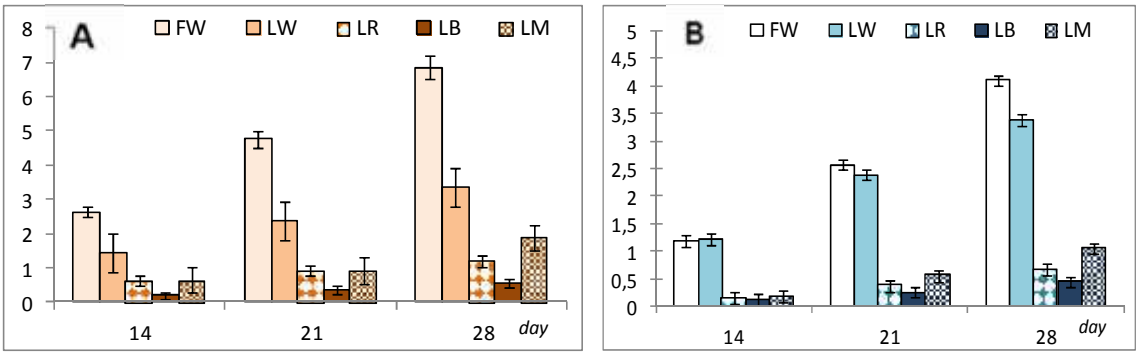
All explants (100%) cultivated under different light conditions produced roots. Data obtained on days 14, 21 and 28 confirmed that white fluorescent light (FW) was the most efficient, inducing the formation of a high mean number of roots and mean root length (Figure 4).

At the end of the culture, the highest of mean root numbers was recorded for FW (6.84±0.80) while the values for the LED white (LW) was 3.36±0.64 and lower in the other LED treatments respectively (Figure 4A). Additionally, the data

4A). Освен това, получените данни за средна дължина на корена (Фигура 4B) потвърждават още веднъж, че LED светлините оказват инхибиращ ефект върху процеса на вкореняване при *Fabiana*. Подобно поведение на растеж може да се обясни със спецификата на растителния вид. Обратно, влиянието на качеството на светлината върху развитието и растежа на *Doritaenopsis in vitro* е показало, че растежните параметри са високи, когато растения-та се култивират при червена и синя светлина от LED източници (Shin et al., 2008).

obtained for the mean root length indicator (Figure 4B) confirmed once more that the LED light had an inhibiting effect on the rooting process of *Fabiana*.

Such growth behavior could be explained with the specifics of the plant species. Contrariwise, the influence of light quality on the *in vitro* development of *Doritaenopsis* showed that growth parameters were highest in plants cultivated under red and blue light emitting diodes (LEDs) (Shin et al., 2008).



Фиг. 4. Влияние на светлинния източник и спектъра върху вкореняване на *Fabiana*. (A) Среден брой корени и (B) средна дължина на корена [cm] на ден 14, 21 и 28, (±SE)

Fig. 4. Effect of the light source and spectra on rooting. (A) Mean number of roots and (B) mean root length [cm] on days 14, 21 and 28, (±SE)

Ефектът на светлинния източник (като интензитет, спектър и фотопериод) варира при растителните видове, както и в различните етапи на *in vitro* размножаване, оказвайки влияние върху растежните параметри, като регенерация на летораст, височина и размер на растенията, свежо тегло, съдържание на хлорофил и каротеноиди при различни растения като картофи (Yeh and Chung, 2009), захарна тръстика (Sengar et al., 2011), цитруси (Niedz et al., 2015) и банани (Buah, 2016).

Проучвания с *Gerbera* показват, че култивирането на LED червена светлина има подобен ефект върху *in vitro* вкореняването, като намалява

The effect of the light source (as intensity, spectrum and photoperiod) varies in plant species, as well as in different stages of *in vitro* propagation, influencing growth parameters such as shoot regeneration, plant height and size, fresh weight, chlorophyll and carotenoid contents in variety of crops including potato (Yeh and Chung, (2009), sugarcane (Sengar et al., 2011), citrus (Niedz et al., 2015), banana (Buah, 2016).

Research in *Gerbera* has shown that LED red radiation had a similar effect on *in vitro* rooting, as decreasing of root formation, due to reduced chlorophyll

формирането на корени и се обяснява с по-ниското съдържание на хлорофил в листата (Nhut et al., 2003; Wang et al., 2011). Poudel et al. (2008) също съобщават, че светлинните спектри са съществени за процеса на вкореняване при рапица.

Морфогенезата при растенията се регулира чрез различни микро-екологични фактори като светлина, температура, влажност и въглероден диоксид (Kozai and Smith, 1995). Качеството, количеството и фотопериодът на светлината играят централна роля при растежа и диференциацията на растителните клетки (Moshe and Dalia, 2007). Флуоресцентните лампи, като основен светлинен източник използван при *in vitro* култивиране, имат фиксирани емисионни спектри, съставени от множество ивици в обхват на дължината на вълна от 320 до 800 nm, без възможност за различни параметри на осветяване, като спектрални и времеви характеристики (Kurilcik et al., 2008).

LED източниците имат редица уникални предимства, включващи способността да контролират спектралния състав, продължителност, дълъг експлоатационен живот, специфичността на дължината на вълната, относително хладните излъчващи повърхности (Li et al., 2010), но тяхната ефективност в настоящото проучване с *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav. не се потвърждава в етапите на микроразмножаването.

content in leaves (Nhut et al., 2003; Wang et al., 2011).

Poudel et al. (2008) also reported that light spectra are essential for the rooting process in rapes.

Plant morphogenesis is regulated by various micro-ecological factors such as light, temperature, humidity and carbon dioxide (Kozai and Smith, 1995). The light quality, quantity, and photoperiod play a central role in the growth and differentiation of plant cells (Moshe and Dalia, 2007).

Fluorescent lamps, the main light source commonly used for *in vitro* culture, have fixed emission spectra composed of multiple bands in the wavelength range of 320 to 800 nm, without the possibility of different illumination parameters, such as spectral and time characteristics (Kurilcik et al., 2008).

LEDs have several unique advantages including the ability to control spectrum composition, durability, long service life, wavelength specificity, relatively cool radiating surfaces (Li et al., 2010) but their efficiency in the present study with *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav micropropagation was not confirmed.

ИЗВОДИ

Въз основа на получените данни може да се направи заключението, че бялата флуоресцентна светлина е най-ефективна при микроразмножаване на *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav. Експерименталните резултати показаха, че LED източниците на светлина с различни спектри имат специфичен ефект върху *in vitro* култивиране на *Fabiana*. Въпреки това, светодиодите могат да се използват като алтернативна светлина по отношение на по-икономичния им характер и разходите за електричество.

CONCLUSIONS

Based on the data obtained could be concluded that the white fluorescent light is the most suitable for the micropropagation of *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav. The experimental results showed that the LED light sources with different spectra have a specific effect on *in vitro* grown *Fabiana* plants.

Nevertheless, LEDs could be used as an alternative light in term of their more economical nature and electricity cost.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Alonso, J. and C. Desmarchelier**, 2006. Autochthonous Medicinal Plants of Argentina. Editor: Phytoscience, Spain, ISBN-10: 9872287503 (Es).
2. **Barz, W. and B. E. Ellis**, 1981. Potential of Plant Cell Cultures for Pharmaceutical Production. In: Beal, J. L. and E. Reinhard (eds.) Natural Products as Medicinal Agents. Stuttgart, Hippokrates, 471-507.
3. **Buah, J. N.,** 2016. *In vitro* Growth of Dwarf Cavendish Banana Plantlets in Different Culture Vessels and Light Intensities. *International Journal of Agricultural Research*, 11 (1) 23-31.
4. **Deus, B. and M. H. Zenk**, 1982. Exploitation of Plant Cells for the Production of Natural Compounds. *Biotechnol Bioeng*., 24 (9), 1965-74.
5. **Festy, D.**, 2016. My Bible of Essential Oils. *Leduc.s Practice*, ISBN-13:979-1028502614 (Fr).
6. **Kozai, T. and M. A. L. Smith**, 1995. Environmental Control in Plant Tissue Culture – General Introduction and Overview. In: Aitken-Christie J., T. Kozai and M. A. L. Smith (eds) Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture. *Springer*, Dordrecht.
7. **Kurilcik, A., M. R. Canova, S. Dapkuniene, S. Zilinskaite, G. Kurilcik, G. Tamulaitis, P. Duchovskis and A. Zukauskas**, 2008. *In vitro* Culture of Chrysanthemum Plantlets Using Light Emitting Diodes. *Cent Eur J Biol,* (3) 161-167.
8. **Li, H., Z. Xu and C. Tang**, 2010. Effect of Light-Emitting Diodes on Growth and Morphogenesis of Upland Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Plantlets *in vitro*. *Plant Cell, Tissue Organ Culture,* 103, 155-163.
9. **Morrow, R. C.**, 2008. LED Lighting in Horticulture, *HortScience*, 43 (7), 1947-1950.
10. **Moshe, R. and E. Dalia**, 2007. On the Effect of Light on Shoot Regeneration in Petunia. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 89, 49-54.
11. **Murashige, T. and F. Skoog**, 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio-Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
12. **Nhut, D. T., L. T. A. Hong, H. Watanabe, M. Goi and M. Tanaka**, 2000. Growth of Banana Plantlets Cultured *in vitro* under Red and Blue Light Emitting Diode (LED) Irradiation Source. *Acta Hortic*, 575, 7-23.
13. **Nhut, D. T., T. Takamura, H. Watanabe, K. Okamoto and M. Tanaka**, 2003. Responses of Strawberry Plantlets Cultured *in vitro* Under Superbright Red and Blue Light-Emitting Diodes (LED). *Plant Cell Tissue Organ Culture,* 73, 43-52.
14. **Niedz, R. P., J. P. Albano and M. Marutani-Hert**, 2015. Effect of Various Factors on Shoot Regeneration from Citrus Epicotyl Explants, *Journal of Applied Horticulture*,17(2): 121-128
15. **Okwuonu, I. C., G. N. Nsofor, C. I. Ihezie, G. Okogbue and C. N. Egesi**, 2017. Effect of Light Intensity and Orientation on *in-vitro* Regeneration of Cassava Plantlets, *Journal of Biotechnology and Biochemistry* (IOSR-JBB), 3 (5), 63-69.
16. **Pinker, I., H. Grueneberg and S. Yancheva**, 2008. *Fabiana imbricata* Ruiz et Pav. – Attempts for Propagation and Protoplast Culture. *Propagation of Ornamental Plants*, 8 (1), 36-38.
17. **Poudel, P. R., I. Kataoka and R. Mochioka**, 2008. Effect of Red and Blue-Light-Emitting Diodes on Growth and Morphogenesis of Rapes. *Plant Cell Tissue and Organ Culture,* 92, 147-153.
18. **Raoa, S. R. and G. A. Ravishankar**, 2002. Plant Cell Cultures: Chemical Factories of Secondary Metabolites. *Biotechnology Advances,* 20 (2), 101-153.

19. **Rätsch, C.**, 1998. The Encyclopedia of Psychoactive Plants: Ethnopharmacology and Its Applications. Rochester: *Park Street Press*, 264.
20. **Schmeda-Hirschmann, G., M. Jordan, A. Gerth, D. Wilken, E. Hormazabal and A. A. Tapia**, 2004. Secondary Metabolite Content in *Fabiana imbricata* Plants and *in vitro* Cultures. *Zeitschrift für Naturforschung C.*, 59 (1-2), 48-54.
21. **Sengar, K., R. S. Sengar and S. K. Garg**, 2011. The Effect of *in vitro* Environmental Conditions on Some Sugarcane Varieties for Micropropagation, *African Journal of Biotechnology*, 10 (75), 17122-17126.
22. **Shin, K. S., H. N. Murthy, J. W. Heo, E. J. Hahn and K. Y. Paek**, 2008. The Effect of Light Quality on the Growth and Development of *in vitro* Cultured *Doritaenopsis* Plants. *Acta Physiol. Plant*., 30, 339-343.
23. **Tripathi, L. and J. N. Tripathi**, 2003. Role of Biotechnology in Medicinal Plants. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2 (2), 243-253.
24. **Wang, Z., G. Li, S. He, A. Jaime, T. Silva and M. Tanaka**, 2011. Effect of Cold Cathode Fluorescent Lamps on Growth of *Gerbera jamesonii* Plantlets *in vitro*. *Scientia Horticulturae,* 130, 482-484.
25. **Wu, M. C., C. Y. Hou, C. M. Jiang, Y. T. Wang and C. Y. Wang**, 2007. A Novel Approach of LED Light Radiation Improves the Antioxidant Activity of Pea Seedlings. *Food Chemistry, Cambridge*, 101, 1753-1758.
26. **Yeh, N. and J. P. Chung**, 2009. High-Brightness LEDs: Energy Efficient Lighting Sources and Their Potential in Door Plant Cultivation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13 (8), 2175-2180.

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2019, 22 (1), 348-357
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan
ISSN 1311-0489 (Print)
ISSN 2367-8364 (Online)

Влияние на температурата и времето на експозиция върху инхибиторния ефект на *Serratia plymuthica* спрямо картофена цистообразуваща нематода *Globodera pallida*

Костадин Траянов[1*], Дима Маркова[2], Иванка Тринговска[2], Хари Самалиев[1]

[1]Аграрен университет, Пловдив 4000, България
[2]Институт по зеленчукови култури Марица, Пловдив, 4003, България

Influence of the Temperature and the Time of Exposure on the Inhibitory Effect of *Serratia plymuthica* on the Potato Cyst Nematode *Globodera pallida*

Kostadin Trayanov[1], Dima Markova[2], Ivanka Tringovska[2], Harry Samaliev[1]

[1]Agricultural University, Department of Entomololy, 4000 Plovdiv, Bulgaria
[2]Maritsa Vegetable Crops Research Institute, 4003 Plovdiv, Bulgaria
**E-mail*: *kostadin_traqnov@abv.bg*

Original scientific paper

Received: 14.04.2019 *Accepted:* 25.04.2019 *Published:* 03.07.2019

РЕЗЮМЕ

Проведени са *in vitro* експерименти за изследване влиянието на бактерията *Serratia plymuthica* върху излюпването и смъртността на ларви втора възраст ($Л_2$) на картофена цистообразуваща нематода *Globodera pallida* при различни температури и експозиция. При температури 24±1 и 19±1°C и експозиция от шест дни на *S. plymuthica*, излюпването на ларви втора възраст ($Л_2$) на *G. pallida* почти напълно се инхибира. Излюпването на $Л_2$ не се намалява значително при температура 14±1°C до експозиция на бактерията след двадесет и четири дни. Действието на *S. plymuthica* при температури 24±1 и 19±1°C за 24 часа повишава смъртността на $Л_2$ на *G. pallida*. При температура 14±1°C, смъртност на $Л_2$

SUMMARY

In vitro experiments were conducted to examine the influence of *Serratia plymuthica* on the hatching and mortality of second-stage juveniles (J_2s) of potato cyst nematode *Globodera pallida* at different temperatures and exposure.

Hatching of second-stage juveniles (J_2s) of *G. pallida* was almost inhibited after six days exposure to the *S. plymuthica*, at 24±1 and 19±1°C. The hatching was not reduced significantly at 14±l°C until after twenty-four days exposure to the bacterium.

Exposure of J_2s of *G. pallida* to *S. plymuthica* for 24 h increased mortality of J_2s at 24±1°C and 19±1°C. At 14±1°C mortality of J_2s was also reported after 72

също беше отчетена, но след експозиция от 72 часа, като ефектът на бактерията е по-слаб, отколкото при двете по-високи температури. Резултатите показаха, че бактерията *S. plymuthica* може да бъде използвана като алтернативен метод за борба на картофената цистообразуваща нематода *G. pallida*.

Ключови думи: *Globodera pallida*, картофена цистообразуваща нематода, температура, *Serratia plymuthica*, биоконтрол

h exposure, but the effect being less marked than at the two higher temperatures.

The results showed that the bacterium *S. plymuthica* can be used as an alternative method of control of the potato cyst nematode *G. pallida*.

Key words: *Globodera pallida*, potato cyst nematode, temperature, *Serratia plymuthica*, biocontrol

УВОД

Растително-паразитните нематоди (РПН) са сериозен проблем за селскостопанското производство в световен мащаб, което от своя страна оказва влияние върху международната търговия, социалното и икономическото развитие (Perry and Maurice, 2013). Към растително-паразитните нематоди принадлежат, картофените цистообразуващи нематоди (КЦН) – *Globodera rostochiensis* (Wollenweber) и *Globodera pallida* (Stone), които предизвикват повреди по корените на картофените растения. Контролът на тези нематоди е по-труден от този на други вредители, тъй като нематодите обитават предимно почвата и атакуват подземните части на растенията (Stirling, 1991). Химично синтезираните нематоциди са лесно приложими и се характеризират със сравнително висока ефикасност, но в повечето случаи те са скъпи, а в някои развити страни, част от тези нематоциди се изтеглят от пазара на пестициди, поради опасения за общественото здраве и безопасността на околната среда (Schneider et al., 2003). Поради това, търсенето на други методи за контрол на тези групи вредители, които са по-екологосъобразни, стават все по-важни. Развитието на повечето растително-паразитни нематоди, включително КЦН, преминава в почвата и поради тази причина те могат да бъдат инфектирани от различни гъби и бактерии, на

INTRODUCTION

Plant-parasitic nematodes (PPN) are a serious problem for agricultural production worldwide, in turn, impacting on international trade, social and economic development (Perry and Maurice, 2013).

To the plant-parasitic nematodes are belonged the potato cyst nematodes (PCN) *Globodera rostochiensis* (Wollenweber) and *Globodera pallida* (Stone), which are damage the roots of potato plants.

The control of these nematodes is more difficult than that of other pests because nematodes mostly inhabit the soil and attack the underground parts of the plants (Stirling, 1991). The chemical nematicides are easy to apply and show rapid effects, but in most cases, they are expensive and have begun to be withdrawn from the market in some developed countries due to concerns about public health and environmental safety (Schneider et al., 2003).

Because of this, the search for other methods of control of these group of pests which are more environmentally friendly, become increasingly important. The ontogenesis of most PPN including PCN occurs in the soil and for this reason, they are infected by difference fungi and bacteria which are rich in soil and some of them have been shown great potential as

които е богата почвата и някои от тях са показали голям потенциал като агенти за биоконтрол на нематоди (Jatala, 1986; Weller 1988; Sayre and Walter, 1991; Stirling, 1991; Siddiqui and Mahmood, 1993, 1995). Бактериите са числено най-разпространените организми в почвата (Clark, 1967). Бактериите, които се срещат в почвата, принадлежат към родове *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Pasteuria*, *Clostridium*, *Serratia* и др. Видът *Serratia plymuthica* е ризобактерия, принадлежаща към род *Serratia*. Повечето ризобактерии въздействат върху растително-паразитните нематоди чрез метаболитни странични продукти, различни летливи органични съединения (ЛОС), ензими и токсини. Ефектите на тези съединения включват потискането на възпроизводството на нематодите, излюпването на яйцата и жизнеността на ларвите, както и директно убиване на нематодите (Zuckerman and Jasson, 1984; Siddiqui and Mahmood, 1999).

Целта на настоящото изследване е да се проучи възможността на непаразитната ризобактерия *Serratia plymuthica* (*in vitro*) за борба срещу картофената цистообразуваща нематода *G. pallida*.

biocontrol agents for nematodes (Jatala, 1986; Weller 1988; Sayre and Walter, 1991; Stirling, 1991; Siddiqui and Mahmood, 1993, 1995).

Bacteria are numerically the most abundant organisms in the field soil (Clark, 1967). The bacteria wich occur in soil belong to genera *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Pasteuria*, *Clostridium, Serratia* and others. The species *Serratia plymuthica* is rhizobacterium belong to genus *Serratia*. Most rhizobacteria impact on the plant-parasitic nematodes by means of metabolic by-products, various volatile organic compounds (VOCs), enzymes and toxins.

The effects of these compounds include the suppression of nematode reproduction, egg hatching and juvenile survival, as well as direct killing of nematodes (Zuckerman and Jasson, 1984; Siddiqui and Mahmood, 1999).

The aim of the present study is to research the possibility of the non-parasitic rhizobacterium *Serratia plymuthica* (*in vitro*) for the management against potato cyst-forming nematode *G. pallida*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Експериментите бяха проведени през 2017 и 2018 г. в лабораторията по Ентомология и Нематология в Аграрен университет - Пловдив.

G. pallida

Картофената цистообразуваща нематода *G. pallida* (патотип Pa2), първоначално беше изолирана от почвени проби (местоположение Самоков, Софийски картофен район), и размножена от единични цисти, върху чувствителния сорт картофи – Надежда. Цистите бяха екстрахирани след изсушаване на почвата, по метода на мокрото сито (Southey, 1986). За стимулиране излюпването на инвазионните ларви втора

MATERIAL AND METHODS

The experiments were conducted during 2017 and 2018 in a laboratory of Entomology and Nematology at Agricultural University - Plovdiv.

Culture of G. pallida

The potato cyst nematode *G. pallida* (pathotype Pa2), originally isolated from soil simples (location Samokov, Sofia 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 difusate (PRD), was used for cyst hatching. The second stage juveniles

възраст ($Л_2$) от цистите беше използван картофен коренов ексудат (ККЕ). $Л_2$ се събираха всеки ден и факторите, които оказват влияние на излюпването се подменяха всеки път. Събраните по този начин $Л_2$ се съхраняваха в хладилник при температура около 5°C в малък обем вода за максимум една седмица преди да бъдат използвани за целите на експериментите. Цистите на *G. pallida* се стерилизираха в 1% разтвор на натриев хипохлорит за 30 min, а $Л_2$ в стрептомицин сулфат (0.1%) за 15 min (Mountain, 1955). Всички те се изплакваха в стерилна дестилирана вода (СДВ) преди да бъдат включени в експериментите.

Приготвяне на бактерията Serratia plymuthica

Бактериалният изолат *Serratia plymuthica* В72 (българска популация) беше получен от бактериалната колекциия на Институт по зеленчукови култури - Марица, Пловдив.

За приготвяне на стартер култури на *Serratia plymuthica* изолат В72 беше използвана течна хранителна среда Luria-Bertani (LB). От култивирания изолат се приготвяше стартерна култура, като към 2 ml от разредената 1/10 хранителна среда беше добавен бактериален инокулум. Епруветките се поставяха на тъмно в шейкър инкубатор при температура 27°C и 140 оборота за 12 часа. Тест културите на *S. plymithica* изолат В72 се приготвяха, като 10 µl от стартер културата беше култивирана в 10 ml хранителна среда. Така приготвени епруветките се поставяха на тъмно в шейкър инкубатор при температура 24°C и 140 оборота за 72 часа.

Необходимите за експериментите концентрации бяха получени чрез разреждане със стерилизирана течна хранителна среда.

Ефективност на бактериална суспензия на Serratia plymuthica изолат В72 върху излюпването на (J_2s) were collected every day and the hatching factors were renewed every time.

The J_2s were stored in a refrigerator at about 5°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.

Preparation of the bacterium Serratia plymuthica

The bacterial isolate *Serratia plymuthica* isolate B72 (Bulgarian population) was obtained from the culture collections of Maritsa Vegetable Crops Research Institute, Plovdiv, Bulgaria.

Bacterial isolate of the *Serratia plymuthica* isolate B72 was cultured in Luria-Bertani (LB) broth. A starter culture was prepared from the cultured isolate - bacterial inoculum was added to 2 ml of the diluted 1/10 broth.

The tubes were placed in the dark in a shaker at 27°C and 140 rpm per 12 hours.

Test culture of *Serratia plymuthica* isolate B72 was prepared as 10 µl of starter culture was cultured in 10 ml of culture medium. The tubes were placed in the dark in a shaker incubator at 24°C and 140 rpm per 72 hours.

Concentrations required for the experiments were obtained by diluting with sterilized liquid nutrient medium.

Effect of Serratia plymuthica isolate B72 bacterial suspension on the hatching of second-stage juveniles of G. pallida from cysts at different

ларви втора възраст на G. pallida от цисти при различни температури

Бактериалната суспензия на *S. plymuthica*. изолат B72 (концентрация $1.7x10^7$ клетки/mL) се смесва с картофено-декстрозен агар (КДА) в петриеви блюда при 45°C, докато се охлажда. След 48 часа развитие на бактерията при 28±1°C, в петриевите блюда се поставят по пет предварително стерилизирани цисти (~300 яйца/циста) на *G. pallida*, запечатват се с парафилм и се преместват в термостат при температури 24±1°C, 19±1°C and 14±1°C и експозиция 1, 2, 3 и 6 седмици. Контролата се състои от пет цисти, поставени в чист КДА. Всеки вариант е в четири повторения. След изтичане на експозицията цистите се изваждат, промиват с ДВ, и се поставят в часовникови стъкла с картофен коренов ексудат (ККЕ). Излюпването на $Л_2$ се наблюдаваше под стереомикроскоп. Броят на излю-пените от цистите $Л_2$ се отчита ежеседмично в продължение на 28 дни (4 седмици), като след всяко отчитане, ККЕ в часовниковите стъкла се подменя. След това цистите се строшаваха в дестилирана вода и броят на яйцата с неизлюпени ларви се преброяваха. Процента на излюпване се изчисляваше по формулата:

temperatures

The bacterial suspension of *Serratia plymuthica* isolate B72 (concentration $1.7x10^7$ cells/ml) was mixed with potato dextrose agar (PDA) at 45°C while cooling. After 48 hours of bacterial growth at 28±1°C, five sterilized cysts (~300 eggs/cyst) of *G. pallida* were placed into petri dishes, sealed with Paraffilm and incubated into the thermostat at temperature, 24±1°C, 19±1°C and 14±1°C and exposure 1, 2, 3 and 6 weeks.

The control consists of five cysts placed in a pure PDA. Each variation is in four replicates. Hatching of J_2s is observed under a stereomicroscope. After the exposure, the cysts were removed, washed with SW, and placed into clock-glasses with potato root difusate (PRD).

The number of hatched J_2s from cysts was counted for 28 days (4 weeks), and after each counting, the PRD in the clock-glasses 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 излюпване = излюпени $Л_2$ x 100/пълни яйца + $Л_2$.
hatching rate = hatched J_2 x 100/eggs + J_2

Ефективност на бактериална суспензия на Serratia plymuthica изолат B72 върху смъртността на ларви втора възраст на G. pallida при различни температури

Бактериалната суспензия на *S. plymithica*. изолат B72 (концентрация $1.7x10^7$ клетки/mL) се смесва с картофено-декстрозен агар (КДА) в петриеви блюда при 45°C, докато се охлажда. След 48 часа развитие на бактерията при 28±1°C, в петриевите блюда се поставят предварително стерилизирани 100 $Л_2$ на *G. pallida*, запечатват се с парафилм и се преместват

Effect of Serratia plymuthica isolate B72 bacterial suspension on mortality J_2s of G. pallida at different temperatures

The bacterial suspension of *Serratia plymuthica* isolate B72 (concentration $1.7x10^7$ cells/ml) was mixed with PDA at 45°C while cooling. After 48 hours of bacterial growth at 28±1°C, sterilized 100 J_2 of *G. pallida* were placed into petri dishes, sealed with Paraffilm and incubated into the thermostat at temperature, 24±1°C, 19±1°C and 14±1°C and exposure 72, 48

в термостат при температури 24±1°C, 19±1°C и 14±1°C и експозиция 72, 48 и 24 часа. Контролата се състои от 100 $Л_2$ поставени в чист КДА. Всеки вариант е в четири повторения. След изтичане на експозицията, $Л_2$ се промиваха, прехвърляха се в ДВ и тяхното поведения се наблюдаваше в продължение на 72 часа, след което се прехвърляха в разтвор на метиленово синьо (0,2%) за 24 часа. $Л_2$, оцветени в синьо, бяха идентифицирани като мъртви, неоцветените като живи. Броят на оцветените и неоцветените $Л_2$ се отчиташе с помощта на стереомикроскоп.

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.

and 24 hours.

The control consists of 100 J_2 placed in a pure PDA. Each variation is in four replicates. After the exposure, J_2 was washed, transferred to SW and their behavior was observed for 72h, than transferred to a methylene blue solution (0.2%) for 24h.

The J_2s which stained in a blue were identified as a dead, the unstained as a live. The number of stained and unstained J_2s were counted using a stereomicroscope

Statistical analysis

Statistical analysis was carried out by 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

Ефикасност на бактериална суспензия на Serratia plymuthica изолат B72 върху излюпването на ларви втора възраст на G. pallida от цисти при различни температури

Данните за ефекта на БС *Serratia. plymuthica* изолат B72 (концентрация $1.7x10^7$ клетки/mL) върху излюпването на ларви втора възраст на *G. pallida* са представени в Таблица 1. Резултатите показват, че инхибиращият ефект на БС *S. plymuthica* изолат B72 зависи значително от температурата.

При вариантите с най-ниска температура 14±1°C и експозиция 1 и 2 седмици беше отчетен инхибиторен ефект, съответно 59.50% и 53.25%. При тези условия се съобщава за намаляване на броя на излюпените $Л_2$, сравнени с контролния вариант, но процентът на излюпените $Л_2$ е сравнително висок и инхибиторният ефект на БС *S plymuthica* изолат B72 е нисък. При същата температура, но при екс-

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of Serratia plymuthica* isolate B72 *bacterial suspension on the hatching of second-stage juveniles of G. pallida from cysts at different temperatures

Data on the effect of bacterial suspension (BS) *Serratia plymuthica* isolate B72 (concentration $1.7x10^7$ cells/ml) on the hatching of *G. pallida* second stage juveniles are presented in Table 1. The results showed that the inhibitory effect of BS *S. plymuthica* isolate B72 is highly dependent on temperature.

Even in the lowest temperature 14±1°C with an exposure of 1 and 2 weeks inhibitory effect was reported, respectively 59.50% and 53.25%. Under these conditions, a reduction in the number of hatched J2s compararing with the control variant was reported, but the percentage of the hatched J2 is relatively high and the inhibitory effect of BS *S plymuthica* isolate B72 is low. At the same temperature but at 3 weeks and 6 weeks

позиция от 3 и 6 седмици, беше отчетен задоволителен инхибиращ ефект, съответно 29.50% и 15.75% (Таблица 1). Предполагаме, че това се дължи на по-бавното развитие на бактерията при по-ниски температури.

exposure, a satisfactory effect was reported, respectively 29.50% and 15.75% (Table 1). We assume that this is due to the low temperature at which the development of the bacterium is delayed.

Таблица 1. Ефикасност на БС *S plymuthica* изолат B72 (1.7 x10^7 клетки/mL) върху излюпването на *Л*$_2$ на *G. pallida*. при различна температура и експозиция и 4 седмици след пренасянето на цистите в ККЕ

Table 1. Efficacy of BS *Serratia plymuthica* isolate 72 (1.7 x 10^7 cells/ml) on the hatching of *G. pallida* J_2s. at different temperatures and exposure and 4 weeks after cyst transfered in PRD

Експозиция / седмици* Exposure / weeks*	Излюпени $Л_2$ [%] / Температури Hatching J_2 [%] / Temperatures					
	14±1°C		19±1°C		24±1°C	
	B72	*контрола control*	B72	*контрола control*	B72	*контрола control*
1	59.50d**	68.50c	13.00c	76.50b	8.25c	75.75b
2	53.25e	72.25b	8.00d	80.50a	7.00cd	81.75a
3	29.50f	74.75a	5.75d	78.25ab	5.50cd	81.25a
6	15.75g	76.25a	5.50d	80.00a	4.25d	82.50a

* експозиция на БС *Serratia plymuthica* изолат B72 върху цистите при различни температури / exposure of BS *Serratia plymuthica*. isolate B72 on the cysts at different temperatures

** стойностите за всяка температура, последвани от една и съща буква, не се различават значително според теста Дънкан ($P_{0.05}$) / values for each temperature followed by the same letter are not significantly different according by Duncan's test ($P_{0.05}$)

При вариантите с температури 19±1°C и 24±1°C се наблюдава задоволителен инхибиторен ефект за всички тествани експозиции, съответно 13.00-5.50% и 8.25-4.25% спрямо контрола (Таблица 1). При всички варианти с увеличаване на експозицията на БС *S. plymuthica* изолат B72 върху цистите, инхибиторният ефект се увеличава, съответно, намалявайки процента на излюпване на инвазионните ларви втора възраст спрямо контролните варианти.

Инхибиторният ефект на БС *S. plymuthica* най-вероятно се дължи на различни летливи органични съединения (ЛОС), които инхибират растежа на различни микроорганизми и нематоди (Kai et al., 2007; Dandurishvili et al., 2011). Много малко учени са тествали летливите органични съединения (ЛОС) получени от бактериални изолати спрямо негативното им влияние върху нематодите. Повече тестове са прове-

At temperatures of 19±1°C and 24±1°C, a satisfactory inhibitory effect was observed for all tested exposures, respectively, 13.00-5.50% and 8.25-4.25% relative to the control (Table 1).

In all variants with an increase in the exposure of BS *Serratia plymuthica* isolate B72 on the cysts, the inhibitory effect increased, respectively, reducing the percentage of hatching second stage juveniles compare to the control variants.

The inhibitory effect of BS *Serratia plymuthica* is most likely due to various volatile organic compounds (VOCs), which inhibit the growth of various microorganisms and nematodes (Kai et. al., 2007; Dandurishvili et. al., 2011). Very few researchers have tested VOCs from bacterial isolates on the nematode antagonism.

More of tests have been conducted

дени предимно *in vitro*, оценявайки подвижността или смъртността на ларви втора възраст ($Л_2$), и излюпването им от цистите в резултат на експозицията на ЛОС (Campos et al., 2010). Huang et al. (2010) откриват, че летливите органични съединения отделени от *Bacillus megaterium* причиняват висока процент на смъртност (100%) на ларви втора възраст на *Meloidogyne incognita* и силно инхибират излюпването им от яйчните торбички.

Ефикасност на бактериална суспензия на Serratia plymuthica изолат B72 върху смъртността на ларви втора възраст на G. pallida при различни температури

При всички тествани температури 14±1, 19±1, 24±1°C и експозиция на *Serratia plymuthica* изолат B72 към ларви втора възраст за 24, 48 и 72 часа, повишава броя на мъртвите $Л_2$ ($P_{0.05}$). При 14±1°C беше отчетена значителна смъртност в броя на $Л_2$ при всички варианти на експозиция в сравнение с контролата, но ефектът е по-нисък, отколкото при температури 19±1 и 24±1°C (Таблица 2).

mostly *in vitro*, evaluating motility or mortality of second stage juvenile (J_2), and egg-hatching resulting from VOCs exposure (Campos et. al., 2010).

Huang et al. (2010) found that *Bacillus megaterium* VOCs caused strong death (100%) of *Meloidogyne incognita* J_2 and strong egg-hatching inhibition.

Effect of Serratia plymuthica* isolate B72 *bacterial suspension on mortality J_2s of G. pallida different temperatures

At all tested temperatures 14±1, 19±1 and 24±1°C exposure of J_2s to *Serratia plymuthica* isolate B72 for 24, 48 and 72 h increased the number of mortality J_2s ($P_{0.05}$). At 14±1°C there was a significant mortality in the number of J_2s at all variants of exposure compared with the control, but the effect being less marked than at 19+1 and 24±1°C (Table 2).

Таблица 2. Ефикасност на БС *S. plymuthica* изолат B72 ($1.7x10^7$ клетки / mL) срещу $Л_2$ на *G. pallida* при различни температури и експозиция
Table 2. Efficacy of BS *Serratia plymuthica* isolate 72 ($1.7x10^7$ cells/ml) against J_2s of *G. pallida* at different temperatures and exposure

Време на излагане на $Л_2$ към *Serratia* sp. [h] Time of J_2s exposure to *Serratia* sp. [h]	Смъртност на $Л_2$ / Mortality of J_2 [%]					
	Температури / Temperatures [°C]					
	14±1		19±1		24±1	
	B72	*контрола control*	*B72*	*контрола control*	*B72*	*контрола control*
24	27.75c*	3.50d	45.00c	4.25d	64.50c	4.50d
48	32.50b	3.00d	62.50b	3.25d	83.00b	4.75d
72	38.00a	2.50d	68.25a	5.00d	88.75a	5.25d

* стойностите за всяка температура, последвани от една и съща буква, не се различават значително според теста Дънкан ($P_{0.05}$) / values for each temperature followed by the same letter are not significantly different according by Duncan's test ($P_{0.05}$)

При температури 19±1°C и 24±1°C ефектът на бактериалната суспензия на *S. plymuthica* се проявяваше много бързо и при експозиция от 72 часа, смъртността на $Л_2$ на *G. pallida* нараства съответно до 68.25% (19±1°C) и

At 19±1°C and 24±1°C the effect of bacterial BS was very rapid, and at 72 hours exposure, the mortality rate for *G. pallida* increased to 68.25% (19±1°C) and 88.75% (24±1°C).

88.75% (24±1°C). При 14±1°C смъртността е значително по-висока в сравнение с контролата, но ефектът е по-силен при двете по-високи температури (Таблица 2). По-ниската ефикасност на БС на *S. plymuthica* при температура 14±1°C вероятно се дължи на потиснатия бактериален растеж. Въпреки това, беше отчетена ефикасност на бактерията в сравнение с контролите, дори и при вариантите с ниска температура. Това е така, защото *S. plymuthica* принадлежи към мезофилните микроорганизми, които могат да се развиват при температури в диапазона от 10 до 45°C (Kenneth, 2008).

At 14±1°C mortality was significantly increased comparing with the control, but the effect was stronger at the two higher temperatures.

This was probably due to the inhibited bacterial growth at this temperature. However, the efficacy of the bacterium compared to control variants is present even in low temperature variants.

This is because the *Serratia* sp. belongs to the mesophilic microorganisms which developed in temperatures range from 10 to 45°C (Kenneth, 2008).

ИЗВОДИ

Настоящото изследване показва, че видът *Serratia plynmuthica* изолат B72 притежава нематицидна ефикасност от проведените *in vitro* експерименти и има значителен потенциал като средство за биологичен контрол срещу *G. pallida*.

Ефикасността на бактерията се проявява дори при ниска температура от 14°C, което е свързано с поведението на картофената цистообразуваща нематода *G. pallida* в почвата, чието развитие и вредна активност започва при температура 8-10 °C.

CONCLUSIONS

The present study show that the species *Serratia plynmuthica* has a nematicidal efficacy *in vitro* and it has considerable potential as a biological control agent against *G. pallida*.

The efficacy of bacterium appears even in lower temperature like 14°C which is associated with the behaviour of *G. pallida* in the soil whose development and harmful activity begins at a temperature of 8-10°C.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Campos, V., R. Canuto de Pinho and E. Freire,** 2010. Volatiles Produced by Interacting Microorganisms Potentially Useful for the Control of Plant pathogens, Ciênc.agrotec., 34 (3), Lavras May/June 2010, Print version ISSN 1413-7054
2. **Clark, F.,** 1967. Bacteria in Soil. In: Eurges, A., Raw, F. (Eds), Soil Biology, Academic Press, London, pp 15-19.
3. **Dandurishvili, N., N. Toklikishvili, M. Ovadis, P. Eliashvili, N. Giorgobiani, R. Keshelava, M. Tediashvili, A. Vainstein, I. Khmel, E. Szegedi and L. Chernin,** 2011. Broad-range Antagonistic Rhizobacteria Pseudomonas Fluorescens and Serratia Plymuthica suPpress Agrobacterium Crown Gall Tumours on Tomato Plants. *Journal of Applied Microbiology*, 110 (1), 341-352.
4. **Huang, Y., C. Xu, L. Ma, K. Zhang, C. Duan and M. Mo,** 2010. Characterization of Volatiles Produced from *Bacillus megaterium* YFM 3.25 and their Nematicidal Activity against *Meloidogyne incognita. European Journal of Plant Pathology*, Dordrecht, v. 126, 417-422, Jan. 2010.
5. **Jatala, P.,** 1986. Biological Control of Plant Parasitic Nematodes. *Annual Reviews in Phytopathology*, 24, 453-489.

6. **Kai, M., U. Effmert, G. Berg and B. Piechulla,** 2007. Volatiles of Bacterial Antagonists Inhibit Mycelial Growth of the Plant Pathogen Rhizoctonia Solan. Archives *of Microbiology*, 187 (5), 351-360.
7. **Kenneth, T.,** 2008. Nutrition and Growth of Bacteria. Online Textbook of Bacteriology, www.textbookofbacteriology.neteria in so
8. **Mountain, W.,** 1955. A Method of Culturing Plant-parasitic Nematodes under Sterile Conditions. In: Proceeding of the Helminthological Society of Washington. 16: 154-155.
9. **Perry, R. and M. Maurice,** 2013. Plant Nematology, 2nd edn. CAB International, Wallingford, UK.
10. **Sayre, R. and D. Walter,** 1991. Factors Affecting the Efficacy of Natural Enemies of Nematodes. *Annual Reviews in ' Phytopathology*, 29, 149-166.
11. **Schneider S., E. Rosskopf, J. Leesch, D. Chellemi, C. Bull, and M. Mazzola,** 2003. Research on Alternatives to Methyl Bromide: Pre-plant and Post-Harvest. *Pest Manag Sci*, 59: 814-826.
12. **Siddiqui Z. and I. Mahmood,** 1999. Role of Bacteria in the Management of Plant Parasitic Nematodes: a review. *Bioresource Technol*, 69: 167-179.
13. **Siddiqui, Z. and I. Mahmood,** 1993. Biological Control of Meloidogyne Incognita Race 3 and Macrophomina phasolina by Paecilomyces lilacinus and Bacillus Subtilis Alone and in Combination on Chickpea. *Fundamental Applied Nematology*, 16, 215-218.
14. **Siddiqui, Z. and I. Mahmood,** 1995. Management of Meloidogyne incognita Race 3 and Macrophomina phaseolina by Fungus Culture Filtrates and Bacillus subtilis on Chickpea. Fundamental Applied Nematology, 18, 71-76.
15. **Southey, J.,** 1986. Laboratory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes. Ministry of Agriculture, Fisheries and Foods. London, U.K., pp. 202.
16. **Stirling, G.,** 1991. Biological Control of Plant Parasitic Nematode: Progress, Problems and Prospects. CAB International, Wallington, UK.
17. **Stirling, G.,** 1991. Biological Control of Plant Parasitic Nematodes, Progress, Problems and Prospects. CAB International, Willingford.
18. **Weller, D.,** 1988. Biological Control of soil Borne Plant Pathogens in the Rhizosphere with Bacteria. *Annual Reviews in Phytopathology*, 26, 379-407.
19. **Zuckerman B. and H. Jasson,** 1984. Nematode Chemotaxis and Possible Mechanisms of Host/prey Recognition. *Ann Rev Phytopathol*, 22: 95-113. FEMSark, F.E., 1967.

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2019, 22 (1), 358-369
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan
ISSN 1311-0489 (Print)
ISSN 2367-8364 (Online)

Влияние на различни форми торове върху добива от лук в условията на фертигация

Асен Николов*, Веселин Кутев

Лесотехнически университет, 1797 София, България

Influence of Different Forms of Fertilizers on Yield of Onion under Fertigation

Asen Nikolov*, Vesselin Koutev

University of Forestry, 1797 Sofia, Bulgaria
**E-mail: asen30@abv.bg*

Original scientific paper

Received: 08.04.2019 *Accepted:* 02.05.2019 *Published:* 03.07.2019

РЕЗЮМЕ

Опитът с кромид е изведен на УОП Враждебна, на Алувиална почва. Изпитваните торове са внасяни както следва: фосфорните торове Duofertil и Eurofertil са внасяни с основната обработка. Амониевата селитра, Sulfamo и KSC са внасяни с фертигацията. Вариантите са изравнени по основните хранителни елементи с помощта на калиев сулфат и троен суперфосфат.

Кромидът е насаден през есента, а добивите са отчетени през юли. Наблюдават се разлики в добивите при торовете с различна фосфорна формулация – орто и полифосфати.

При контролния вариант се наблюдават по-високи при торенето с амониева селитра. Добивите от KSC са близки до тези на селитрата. В същото време добивите при Sulfammo са ниски и доближават до тези без азотно торене.

На фон DUOFERTIL, най-висока торова норма е получена при варианта с KSC. Добивът от вариант с амониева селитра е по-нисък.

SUMMARY

The experiment with onion was carried out in the Experimental station Vrajdebna, on Alluvial soil. The following fertilizers were applied as follows: The phosphorus fertilizers Duofertil and Eurofertil were applied with the main soil treatment. Ammonium nitrate, Sulfammo and KSC were applied with fertigation. The treatments were equalled quantitatively on nutrients with potassium sulfate and triple superphosphate.

The onion is planted in the Autumn and the yield was harvested in July. Different yields were observed depending on phosphorus forms – ortho and poly-phosphates.

In Control treatment conditions, highest yields were obtained on treatment with ammonium nitrate application. KSC treatment yield is like ammonium nitrate. In same time Sulfammo yield is as low as treatment without nitrogen application.

At DUOFERTIL background the highest onion yield were obtained in treatment with KSC. Onion yield in ammonium nitrate treatment was less than the KSC treatment yield.

Най-висок добив от кромид беше получен също при варианта с KSC на фон EUROFERTIL. Малко по-ниски резултати са получени при амониевата селитра и Sulfammo.

Влиянето на самостоятелното фосфорно торене с ортофосфати – EUROFERTIL и полифосфати – DUOFERTIL показва, че добивите се увеличават дори без азотно торене.

При изучаваната схема на внасяне на торовете, ортофосфатите са по-добрия източник за фосфорно хранене при отглеждане на кромид.

Ключови думи: лук, азотни торове, фосфорни торове, фертигация, добив

The highest yield of onion was obtained on KSC treatment at the background EUROFERTIL. Lower results were obtained for ammonium nitrate and Sulfammo.

The influence of singly application of orthophosphates – EUROFERTIL and polyphosphates – DUOFERTIL shows that phosphorus fertilization is increasing onion yields without applied nitrogen.

Orthophosphates are better source for phosphorus nutrition in this scheme of fertilizer application for onion growing.

Key words: onion, nitrogen fertilizers, phosphorous fertilizers, ortho and polyphosphates fertigation, yield

УВОД

През последните десетилетия промените в климата свързани с повишаване на температурите и намаляване количеството на валежите все по-загрижено се коментират от учени метеоролози, агротехници, селекционери, както и от широката общественост (Parry, 1990; Mitova et al., 2016). Глобалното затопляне и намаляване на валежите в повечето от географските региони имат отрицателен ефект върху производителността на културите (Parry, 1990). Редица автори са изследвали ефекта от минералното торене за преодоляване на последиците от различни по продължителност засушавания (Slavov and Alexandrov, 1996). Използването на минерални торове се е превърнало в неразделна част от технологията на отглеждане на основните земеделски култури и е основен фактор за получаване на високи и стабилни добиви. Необходим е устойчив баланс между елементите в системата: почва - тор - растение - добив - качество (Yancheva and Manolov, 2003; Babrikov et al., 2010; Petkova, 2012)

Тези обстоятелства налагат търсене и прилагане на методи за по-ефективно използване на водните ресурси и минералните торове.

INTRODUCTION

In recent decades, climate change associated with increasing temperatures and decreasing the amount of rainfall is being discussed by meteorologists, agronomists, breeders, and the general public (Mitova et al., 2016; Parry, 1990).

Global warming and rainfall in most of the geographic regions have a negative effect on crop productivity (Parry, 1990).

A number of authors have studied the effect of mineral fertilization to overcome the effects of different droughts over time (Slavov and Aleksandrov, 1996).

The application of inorganic fertilizers has become an integral part of the basic crop farming technology and is a key factor in obtaining high and stable yields.

Sustainable balance between elements of the system: soil - fertilizer - plant - yield - quality is needed (Yancheva and Manolov, 2003; Babrikov et al., 2010; Petkova, 2012).

These circumstances require the search and implementation of methods for more efficient use of water resources and inorganic fertilizers.

Водата и азотът са разглеждани като основни лимитиращи фактори при отглеждане на зеленчуци у нас. Начинът на тяхното използване е един от факторите силно влияещи на ефективността им (Atanasova et al., 2007; Tzenova and Mitova, 2010; Shaban et al., 2014). Успешното управление на азота можа да оптимизира добива и да увеличи рентабилността, като същевременно да сведе до минимум загубите му в околната среда. Сравнително изследване за ефективността на капково напояване и класическо напояване с внасяне на азотни торове е извършено от Janat, 2007. Изследвани са четири нива на торене – 70, 140, 210 и 280 kg азот на хектар. По високи добиви са постигнати с капковото напояване, съответно 13, 27, 20 и 35% за четирите нива на торене.

Необходимостта от фертигация произтича от факта, че традиционните методи за торене са само частично ефективни и при тях има много какво да се желае. Подобрение в процеса на фертигация е това, че торовете се прилагат пряко с водата за напояване с поливната система. Те се разтварят във водата и докъдето достига тя, достигат и торовете. Освен това така торовете се прилагат само там, където е необходимо, в подходящи количества и в правилния момент.

При изследване в почвени колони Donagemma et al., 2008 са получили резултати за придвижване на азот, фосфор и калий по почвения профил в зависимост от честотата на поливане и използваните дози торове. Реда на измиване на хранителните елементи намалява по следния начин – NO_3^- > NH_4^+ > K^+ > $H_2PO_4^-$. В повечето случай нитратния азот се е измил извън изследваната дълбочина – 60 cm. Измиването на калия варира от 20 до 40 cm. фосфора се е задържал в слоя 3.5 cm. Много ниската подвижност на фосфора при изследваните почви показва, че този елемент трябва да се

Water and nitrogen are considered as the main limiting factors in the growing of vegetables in our country. The way they are used is one of the factors that strongly influence their effectiveness (Atanasova et al., 2007; Tzenova and Mitova, 2010; Shaban et al., 2014). Successful nitrogen management could optimize yield and increase profitability while minimizing environmental losses.

A comparative study on the effectiveness of drip irrigation and classical irrigation with the application of nitrogen fertilizers was carried out by Janat, 2007. Four levels of fertilization - 70, 140, 210 and 280 kg nitrogen per hectare were studied. High yields were obtained by drip irrigation, respectively 13, 27, 20 and 35% for the four fertilization levels.

The need for fertilization stems from the fact that traditional fertilizing methods are only partially effective and there is much to be desired for them. Improvement in the fertilization process is that fertilizers are applied directly to irrigation water with the irrigation system. They dissolve in the water and wherever it reaches, the fertilizers reach, too. Furthermore, so fertilizers are only applied where necessary in appropriate quantities and at the right time.

In a study in soil columns, Donagemma et al., 2008 have obtained results for the movement of nitrogen, phosphorus and potassium into the soil profile, depending on the watering frequency and the used fertilizer doses. The nutrient wash line decreases as follows: - NO_3^- > NH_4^+ > K^+> $H_2PO_4^-$. In most cases, nitrate nitrogen is leached away from the depth of study – 60 cm. Potassium wash ranges from 20 to 40 cm. Phosphorus is retained in the 3.5 cm layer. The very low mobility of phosphorus on the soils studied indicates that this element should be applied with the main treatment of the soil, and not to wait for its

внася с основната обработка на почвата, а не да се чака разпределението му при фертигацията. При подобни изследвания, фосфорът е измит до 15-20 cm в колони с различни ненарушени почви (Lefroy et al., 1995). Измиването на хранителните елементи по почвения профил изменя тяхната достъпност за растенията. Азотните торове ставата по-недостъпни, а фосфорните се придвижват по-близо до корените на растенията в началото.

Смята се, че торовете базирани на полифосфати са по-усвоими за растенията от тези базирани на ортофосфати. Полифосфатите са 100% разтворими във вода, а ортофосфатите в най-добрия случай – 85%. Но в повечето изследвания при полски култури не се откриват разлики (Lohry Raun, 2001; Rehm et al., 2002).

Целта на изследванията е да се провери ефективността на орто и полифосфатите при зеленчукови култури в условията на фертигация и повишена подвижност.

distribution during fertigation.

In such studies, phosphorus is leached up to 15-20 cm in columns with various undisturbed soils (Lefroy et al., 1995). Leaching nutrients on the soil profile alters their accessibility to plants.

Nitrogen fertilizers are more inaccessible, and phosphorus moves closer to the roots of the plants at the beginning.

It is believed that polyphosphate based fertilizers are more available for plants than those based on orthophosphates. Polyphosphates are 100% water-soluble and orthophosphates at best 85%. However, in most field studies, no differences are found (Lohry Raun, 2001; Rehm et al., 2002).

The aim of the research is to verify the effectiveness of ortho and polyphosphates in vegetable crops in fertigation and increased mobility.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Заложен е полски торов опит с опитна култура лук (*Alium cepa*) с есенно засяване и предшественик тиквички (*Cucurbita pepo*). Почвата е Алувиално ливадна, леко песъчливо-глинеста, преобладаващата фракция е дребния пясък – 23.3% в A^{I} орен. Съдържа голям процент едрочастични материали. Значително участие има фракцията на едрия чакъл, която е 37.2%. По съдържание на хумус почвата е слабохумусна. По отношение на запасеност с общ азот е много слаба запасена. Почвата е безкарбонатна и слабо кисела. Слабозапасена е с подвижни форми на фосфор и калий.

Лукът е сорт “Пловдивски 10“ и се отглежда само чрез арпаджик. Според характеристиката си луковиците на “Пловдивски-10” са плоско-кръгли и средно едри. (Shaban et al., 2014). Те са засети на четири реда при дължина

MATERIAL AND METHODS

Field experiment was carried out experimental onion as experimental plant (*Alium cepa)* with pre-winter planting and courgettes as precursor of (Cucurbita pepo). The soil is Alluvial meadow, slightly sandy-clayey, the predominant fraction is small sand - 23.3% in A_I plowing horizon. It contains a large percentage of large particles. Significant participation is the fraction of the gravel, which is 37.2%. The humus content in soil is poor. In terms of total nitrogen supply, it is very poorly stockpiled. The soil is non-carbonate and slightly acidic. It is deficient in phosphorus and potassium.

Onion variety is a "Plovdivski 10" and is grown only by seed onions. According to their characteristics, the bulbs of "Plovdivski-10" are flat-round and medium-sized. (Shaban et al., 2014). They are sown in four rows at a plot

на парцелката – 12 m . За фертигация е използван лентов капков маркуч AQUATRAXX 6MIL 16MM/10CM/1.14L/H, двойно разположен в средата, по дължина на парцелката, между 2-ри и 3-ти ред на луковиците. 1-ви и 4-ти ред са на 23-35 cm от капковия маркуч. Растенията на кромид лук са отглеждани до глави техническа зрялост. Предполивната влажност на почвата се поддържаше на 80% от ППВ до момента на оформяне на луковиците (Gadjalska et al., 2012; 2015).

Използвани са следните торове:

Фосфорни:

1. Duofertil TOP 34 (N-P-K 5-19-10 + 19SO_3 + 0,1% B + 0,1 Zn). Съдържа полифосфати.
2. Eurofertil Plus 36 (Physio +) (P_2O_5 – 12%, K2O – 24%, SO_3 – 15%, B – 0.2%). Съдържа ортофосфати.

Азотни:

1. KSC за зеленчуци – N- 15%, P_2O_5 - 5%, K_2O - 35%, B - 0.1%,Fe - 0.1%, Mo - 0.1%
2. SULFAMMO (N-PRO) (N - 25%, SO_3 - 31%, MgO - 2%). На базата на амониев сулфат.
3. Амониева селитра – амониево-нитратен тор – N-34%.

Торовете са внесени с еднакво количество фосфор 15 kg P2O5 da^{-1} преди засаждането на лука. Азотът е изравнен с амониев сулфат до 4 kg.da^{-1} преди засаждането на лука. Изравняването на калия е извършено с K_2SO_4 до 30 kg $K_2O.da^{-1}$. Азотосъдържащите торове са внасяни неколкократно, на равен интервал от време (10 дни), за постигане на торова норма от 13,5 kg N.da^{-1}, по следната схема: I-во и II-ро торене с норма 1,5 kg N.da^{-1}, III-то и IV-то торене с норма 2,25 kg N.da^{-1}, V-то и VI-то торене с норма 3 kg N.da^{-1}.

Схема на опита:

1. Контрол
2. SULFAMMO (N-PRO)
3. KSC за зеленчуци
4. Амониева селитра

length of 12 m. For fertigation, AQUATRAXX 6MIL 16MM/10CM/1.14L/H tape drip hose is used doubled in the middle, along the plot, between the 2nd and 3rd row of bulbs. 1st and 4th row are 23-35 cm from the drip hose.

Onion plants are grown to technical maturity. The pre-irrigation humidity of the soil was maintained at 80% of the FC until the bulbs were formed (Gadjalska et al., 2012; 2015).

The following fertilizers were used:

Phosphorous:

1. Duofertil TOP 34 (N-P-K 5-19-10 + 19SO_3 + 0.1% B + 0.1 Zn). Contains polyphosphates.
2. Eurofertil Plus 36 (Physio +) (P_2O_5 - 12%, K_2O - 24%, SO_3 - 15%, B - 0.2%). Contains orthophosphates.

Nitrogen:

1. KSC for vegetables – N-15%, P_2O_5 - 5%, K_2O - 35%, B - 0.1%, Fe - 0.1%, Mo - 0.1%
2. SULFAMMO (N-PRO) (N - 25%, SO_3 - 31%, MgO - 2%). Ammonium sulphate based.
3. Ammonium nitrate – N-34%.

Fertilizers were applied with an equal amount of phosphorus 15 kg. P_2O_5 da^{-1} prior to onion planting. The nitrogen is equilibrated with ammonium sulphate to 4 kg.da^{-1} before the onion is planted. The potassium leveling was performed with K_2SO_4 to 30 kg $K_2O.da^{-1}$. Nitrogen fertilizers were applied repeatedly, at an equal time interval (10 days), to achieve a fertilizer rate of 13.5 kg N.da^{-1}, according to the following scheme: 1st and 2nd fertilization at a rate of 1.5 kg Nda-1, III and IV fertilization with a rate of 2,25 kg N.da^{-1}, Vth and VI fertilization at a rate of 3 kg N.da^{-1}.

Scheme of experiment

1. Control
2. SULFAMMO (N-PRO)
3. KSC for vegetables
4. Ammonium nitrate

5. Duofertil TOP 34
6. Duofertil TOP 34 + SULFAMMO (N-PRO)
7. Duofertil TOP 34 + KSC за зеленчуци
8. Duofertil TOP 34+ Амониева селитра
9. Eurofertil Plus 36
10. Eurofertil Plus 36 + SULFAMMO (N-PRO)
11. Eurofertil Plus 36 + KSC за зеленчуци
12. Eurofertil Plus 36 + Амониева селитра

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

За осигуряване на оптимални условия за развитие и гарнираност на насаждението през вегетаиционния период се извършваха редовни поливки чрез система за капково напояване.

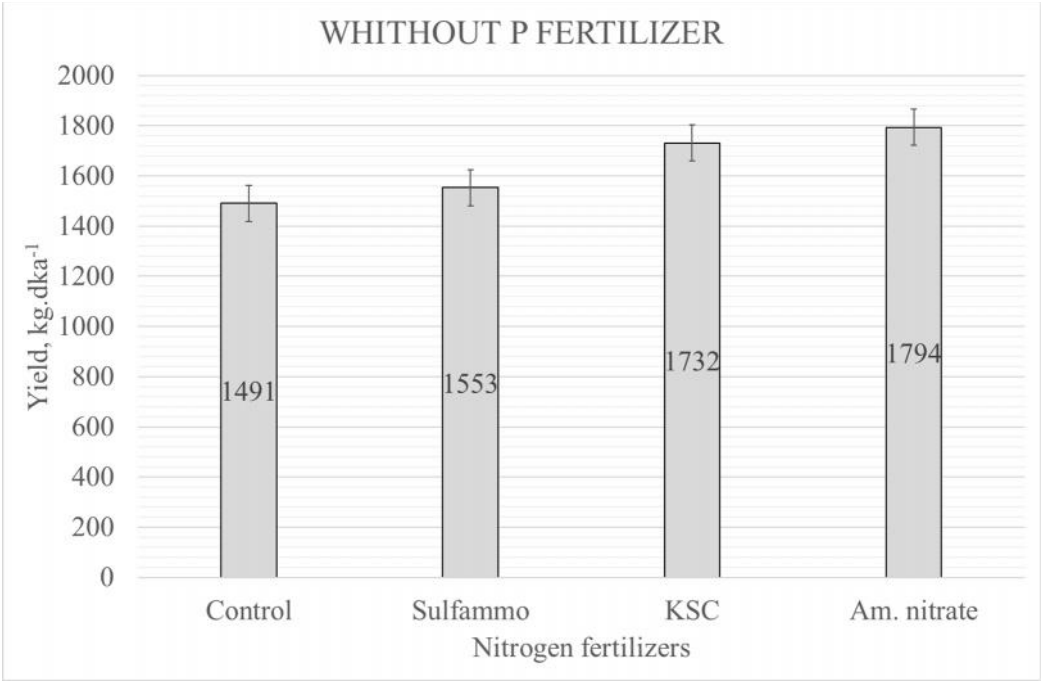
Сравнението на вариантите без фосфорно торене показа следните резултати. При контролния вариант се наблюдават най-ниски добиви, а най-висок при амониева селитра (Фигура 1). При варианта торен със SULFAMMO (N-PRO) добива е приблизително сходен с този от неторения с азот вариант, а варианта с тор KSC се доближава до този с амониевата селитра. Като цяло добивите от четирите варианта на азотно торене могат да се разделят на две групи. Първата, характеризираща се с относително по-нисък добив , включва вариантите: Контрол – 1491 kg.da^{-1} и SULFAMMO (N-PRO) – 1553 kg.da^{-1}. Втората група, включваща вариантите с очертаващи се по-високи добиви се състои от KSC – 1732 kg.da^{-1} и амониева селитра 1794 kg.da^{-1}.

5. Duofertil TOP 34
6. Duofertil TOP 34 + SULFAMMO (N-PRO)
7. Duofertil TOP 34 + KSC for vegetables
8. Duofertil TOP 34+ Ammonium nitrate
9. Eurofertil Plus 36
10. Eurofertil Plus 36 + SULFAMMO (N-PRO)
11. Eurofertil Plus 36 + KSC for vegetables
12. 12. Eurofertil Plus 36 + Ammonium nitrate

RESULTS AND DISCUSSION

In order to ensure the optimal conditions for the development and garnishment of the plantation during the vegetation period, regular irrigation was carried out by a drip irrigation system.

Comparison of treatments without phosphorous fertilization showed the following results. The control treatment shows the lowest yields and the highest yield was with ammonium nitrate treatment (Figure 1). In the SULFAMMO (N-PRO) fertilizer treatment, the yield is approximately similar to that of the nitrogen-free treatment and the KSC fertilizer treatment approaches that of the ammonium nitrate. Generally, the yields of the four nitrogen fertilization options can be divided into two groups. The first, characterized by a relatively lower yield, includes the treatments: Control – 1491 kg.da^{-1} and SULFAMMO (N-PRO) – 1553 kg.da^{-1}. The second group, including treatments with higher yields, consists of KSC – 1732 kg.da^{-1} and ammonium nitrate 1794 kg.da^{-1}.

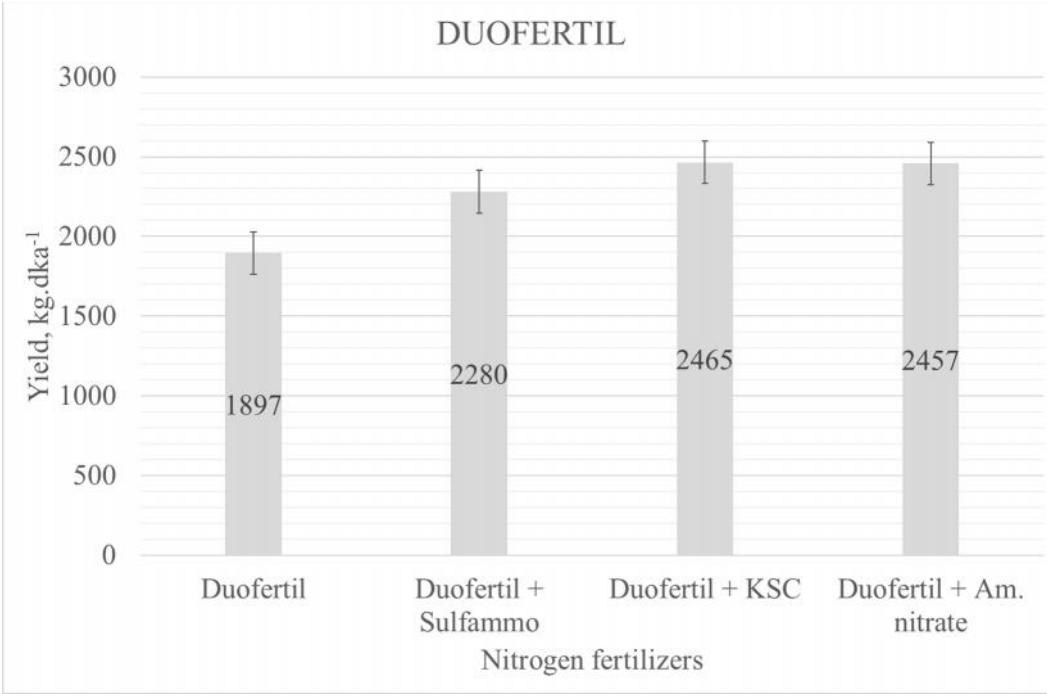


Фиг. 1. Влияние на азотните торове върху добивите от лук без фоново фосфорно, kg.da^{-1}

Fig. 1. Influence of nitrogen fertilizers without phosphorus application on onion yields, kg.da^{-1}

На фосфорен фон от DUOFERTIL най-слаби резултати показва неторения с азот вариант 1897 kg.da^{-1}, а най-висок е добива при вариант KSC 2465 kg.da^{-1} (Фигура 2). При варианта с амониева селитра 2457 kg.da^{-1} отново се наблюдава добив, доближаващ се до този с KSC. На трето място по добив се нарежда варианта с тор SULFAMMO (N-PRO) 2280 kg.da^{-1}, но вече ясно отличаващ се от неторения с азот вариант.

On a phosphorus background DUOFERTIL the worst results show the nitrogen-free treatment of 1897 kg.da^{-1}, and the highest yield in the KSC treatment 2465 kg.da^{-1} (Figure 2). In the ammonium nitrate version, 2457 kg.da^{-1} again observed a yield close to that of KSC. The third treatment is the SULFAMMO (N-PRO) 2280 kg.da^{-1} fertilizer treatment, but now clearly distinguishable from the nitrogen-free treatment.

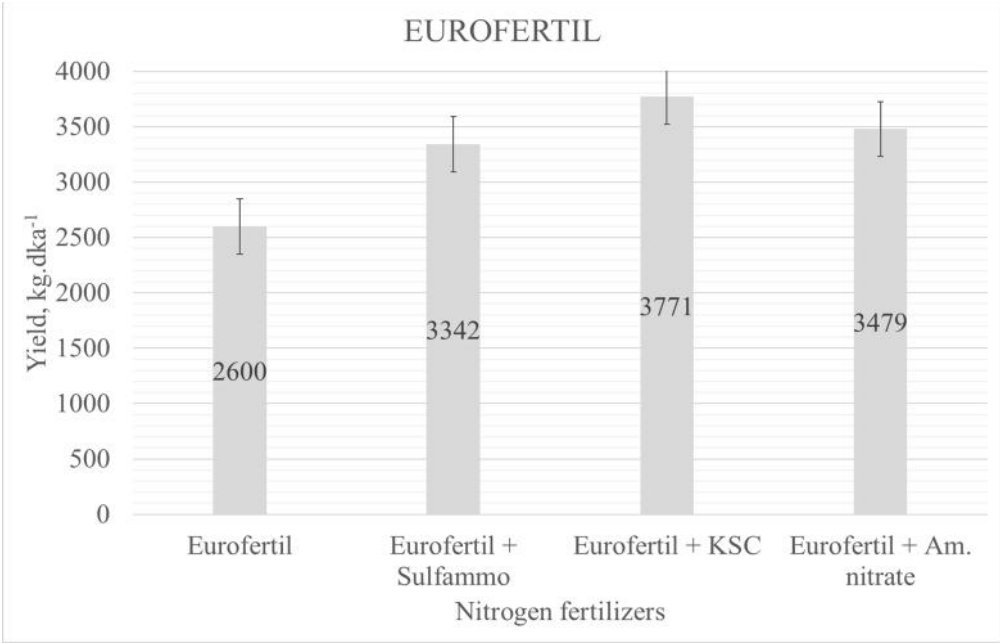


Фиг. 2. Влияние на азотните торове върху добивите от лук на фон DUOFERTIL, kg.da^{-1}

Fig. 2. Influence of nitrogen fertilizers on DUOFERTIL background on onion yields, kg.da^{-1}

На фосфорен фон от EUROFERTIL отново най-нисък добив е получен при неторения с азот вариант 2600 kg.da^{-1} (Фигура 3). Най-висок добив дава варианта с KSC 3771 kg.da^{-1}, а вариантите с амониева селитра 3479 kg.da^{-1} и SULFAMMO (N-PRO) 3342 kg.da^{-1} имат близки по стойност резултати.

On a phosphorus background EUROFERTIL again the lowest yield was obtained in the nitrogen-free treatment – 2600 kg.da^{-1} (Figure 3). Highest yield has KSC – 3771 kg.da^{-1}, and the 3479 kg.da^{-1} and SULFAMMO (N-PRO) 3342 kg.da^{-1} ammonium nitrate treatment have similar results.

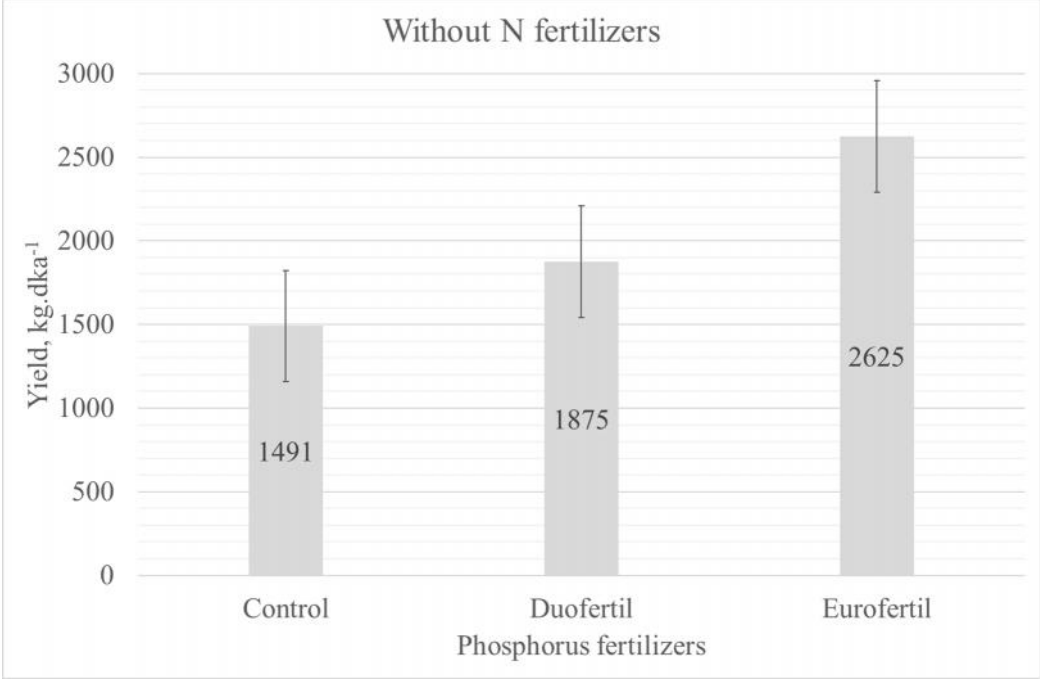


Фиг. 3. Влияние на азотните торове върху добивите от лук на фон EUROFERTIL, kg.da^{-1}

Fig. 3. Influence of nitrogen fertilizers on EUROFERTIL background on onion yields, kg.da^{-1}

Оценката на влиянието на фосфоросъдържащите торове върху общия добив ни показва, че при контролния вариант, без фосфорно торене въпреки внасянето на азотсъдържащи торове, недостигът на обменен фосфор в почвата не позволява на растенията да разгърнат пълния си потенциал (Фигура 4).

The assessment of the impact of phosphorus fertilizers on total yields shows that in the control treatment, without phosphorous fertilization, despite the application of nitrogen fertilizers, the soil phosphorus deficiency does not allow plants to develop their full potential (Figure 4).



Фиг. 4. Влияние на фосфорните торове върху добивите от лук без азотно торене, kg.da^{-1}
Fig. 4. Influence of phosphorus fertilizers without nitrogen application on onion yields, kg.da^{-1}

Внасянето на фосфоросъдържащите торове (DUOFERTIL и EUROFERTIL) значително увеличават добивите спрямо контролния вариант. Това се дължи на добрата запасеност на почвата с органичен азот, дължащ се на продължителното отглеждане на тревна растителност на мястото на опита и минерализацията на остатъците и при зеленчуковите култури.

Най-високи добиви са получени на фон EUROFERTIL при класическата формулация за фосфорни торове на базата на ортофосфати.

По-ниските резултати при DUOFERTIL спрямо EUROFERTIL се дължат на неговата по-висока подвижност в условията на фертигация и усвояването му от растенията в началото на развитието им. Така при условията на капковото напояване интензивна употреба на фосфора от растенията в началото на опита не е

The application of phosphorus fertilizers (DUOFERTIL and EUROFERTIL) significantly increased the yields compared to the control treatment. This is due to the good soil supply with organic nitrogen due to the continuous growing of grass vegetation at the place of experiment and the mineralization of the residues and in the vegetable crops.

The highest yields are obtained on the background of EUROFERTIL in the classical formulation for phosphorus fertilizers based on orthophosphates.

The lower results for DUOFERTIL vs. EUROFERTIL are due to its higher mobility in fertigation condition and its absorption by plants at the beginning of their development.

Thus, under the drip irrigation conditions, intensive phosphorus use by the plants at the beginning of the experiment did not

позволила доброто им развитите след средата на вегетацията.

allow their good development after the middle of vegetation.

ИЗВОДИ

1. Внасянето на фосфорсъдържащи торове увеличава добива, независимо от азотното торене

2. Азотосъдържащите торове и най-вече KSC оказват положително влияние на добива.

3. Комбинираното използване на азот и фосфорсъдържащи торове значително увеличават добива, като най-добрата комбинация между тях е KSC и EUROFERTIL.

CONCLUSIONS

1. The introduction of phosphorus fertilizers increases the yield, regardless of nitrogen fertilization

2. Nitrogen fertilizers and especially KSC have a positive impact on yield.

3. The combined use of nitrogen and phosphorus fertilizers significantly increases yield, with the best combination being KSC and EUROFERTIL.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работата е подкрепена от договор №ДНТС/Австрия 01/2 от 23.08.2017 година на Фонд „Научни изследвания“: „Разпределение на хранителните елементи в почвата при интензивно отглеждане на зеленчуци с фертигация и оптимизиране на хранителния режим на културите за намаляване на въздействието на торовете върху околната среда - ОПТИМА“

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Contract No: DNTS / Austria 01/2 of 23.08.2017, from the Research Fund: "Distribution of nutrients in soil by intensive cultivation of vegetables by fertigation and optimization of the nutritional regime of crops to reduce the impact of fertilizers on the environment - OPTIMA "

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Atanasova, E., I. Mitova, I. Dimitrov and I. Stancheva**, 2007. Effect of Different Fertilizer Sources on the Quality of Head Cabbage. *Journal of Applied Horticulture*, 9 (1), 74-76.

2. **Babrikov, T., N. Neykov, N. Velcheva, P. Chavdarov, K. Uzundzhalieva and S. Neykov**, 2010. Collection, Characterization and Maintenance of Specimens of the Genus Allium L. Scientific Papers of Plovdiv Agrarian University, vol. 2, 369-374.

3. **Donagemma G.K., H. A. Ruiz, V. H. Alvarez V., P. A. Ferreira, R. B. Cantarutti, A. T. da Silva and G. C. Figueiredo,** 2008. Dstribuição do amônio, nitrato, potássio e fósforo em colunas de latossolos fertirrigadas. *R. Bras. Ci. Solo*, 32: 2493-2504.

4. **Gadjalska, N. and Pl. Petkov**, 2012. Application of Good Irrigation Practices in Bulgaria, Balwois, 2012 - Ohrid, Macedonia, 28 May - 2 June 2012, CD Version.

5. **Gadjalska, N., V. Petrova and T. Tashev**, 2015. Model Ecological Irrigation Schemes Using Water-Saving Technologies for Growing Intensive Crops. In: International Conference "Soil and Agro-Technology in a Changing World", 2015. IZAZR, Sofia, Electronic Collection of Scientific Reports, pp. 138-143, ISBN 978-619-9056.

6. **Janat M.**, 2007. Efficiency of Nitrogen Fertilizer for Potato under Fertigation Using a Nitrogen Tracer Technique. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 38: 2401-2422.

7. **Lefroy R. D. B., D Santoso and G J. Blair**, 1995. Fate of Applied Phosphate and Sulfate in Weathered Acid Soils under Leaching Conditions. *Aust. J. Soil Res.*, 33, 135-151.
8. **Lohry Raun**, 2001, Ortho Vs. Poly, Fluid Journal = Fall 2001
9. **Mitova, Iv., N. Dinev, V. Vassileva, V. Petrova and A. Mikova**, 2016. Growth Indicators and Onion Yield Depending on the Effect, Fertilization with Organic and Mineral Fertilizers. *Soil Science, Agrochemistry and Ecology*, 50 (3-4), 16-22 (Bg).
10. **Parry, M. L.** 1990. Climate Change and World Agriculture. London, pp. 230.
11. **Petkova, Z.**, 2012, Influence of Organic Materials and Fertilizers Introduced into the Soil on the Additional Mineralization of the Soil Organic Matter (POP). *Soil Science, Agrochemistry and Ecology*, XLVI (2), 3-13 (Bg).
12. **Rehm G, M Schmitt, J Lamb, G Randall, and L Busman**, 2002. Understanding Phosphorus Fertilizers. Regents of the University of Minnesota.
13. **Shaban, N., S. Bistrichanov, Ts. Moskova, E. Kadum, Iv. Mitova, M. Titianov and P. Bumov**, 2014. Vegetable Production. Sofia, Ed. house at LU, pp. 380.
14. **Slavov, N. and V. Aleksandrov**, 1996. Global Climate Warming also Affects Bulgaria. "Stopanin" newspaper, 21.02.-27.02, No 8, pp. 10.
15. **Tzenova V. and Iv. Mitova**, 2010. Influence of the Soil Moister Regime on the Nitrogen and Plastid Pigments Content in Wheat Varieties. *Journal of Environmental Protection and Ecology*, 11 (2), 540-546
16. **Yancheva Hr. and I. Manolov**, 2003. Fundamentals of Organic Farming, FIBL, Plovdiv (Bg).

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2019, 22 (1), 370-377
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan
ISSN 1311-0489 (Print)
ISSN 2367-8364 (Online)

Сравнение на генотоксичното въздействие на рентгенови лъчи и хербицид Monosan върху корени на лук (*Allium cepa*)

Башким Далипи[1], Кемал Куртеши[2], Наим Сила[3]

[1]Образователен факултет, Университет "Кадри Зека", Гниляне, Косово
[2]Катедра по биология, Факултет по естествени науки, Университет на Прищина, Косово
[3]Катедра по физика, Факултет по естествени науки, Университет на Прищина, Косово

Comparison of Genotoxic Effect of X-ray and Herbicide Monosan, in Onion Roots (*Allium cepa*)

Bashkim Dalipi[1], Kemajl Kurteshi[2], Naim Syla[3]

[1]Faculty of Education, University of Gjilani "Kadri Zeka", Kosovo
[2]Department of Biology, Faculty of Natural Science, University of Prishtina, Kosovo
[3]Department of Physics, Faculty of Natural Science, University of Prishtina, Kosovo
Emails: dalipibashkim@yahoo.com[1]; kkurteshi@yahoo.com[2]

Original scientific paper

Received: 26.05.2019 *Accepted:* 11.06.2019 *Published:* 03.07.2019

РЕЗЮМЕ

Цел на настоящото изследване е да се сравнят генотоксичното влияние на рентгеновите лъчи и хербицид Monosan. Третирани са луковици с две различни дози рентгенови лъчения 300 и 900 rad за период от 10 секунди. Използвани са различни концентрации хербицид от разтвор на Monosan (5, 10, 15, 20, 30 ml разредени в 2 l питейна вода). Всяка една от концентрациите спира растежа на корените на лука. Растенията се третират в продължение на 9 дни. Дължината на корените на лука намалява с повишаване на концентрацията на разтвора. Въз основа на нашето изследване, е установено, че хербицидът има отрицателно въздействие върху митотичното деление на

SUMMARY

Aim of this research is to compare the genotoxic effects of x-ray and herbicide Monosan. We treated the onion bulb in two different x-ray doses 300 and 900 rad, for 10 second. We used, different concentrations (5, 10, 15, 20, 30 ml herbicide, diluted in 2 l of drinking water) of Monosan solutions.

All the concentrations used caused inhibition to the growth of the onion root. The plants treated for 9 days. The length of onion root decreased as the concentration of Monosan solution increased. Based on our investigation, that herbicide has negative effects on mitotic divisions in onion root tip cells.

клетките на кореновия връх на лука. При концентрация на хербицида от 30 ml дължината на корена остава непроменена (нула), докато в контролната група, дължината на корена се удължава с 8 cm за 8 дни. За сравнение, луковици облъчени от 300 и 900 rad не спират растежа на корените си, както при хербицид Monosan в концентрация 30 ml. Получените резултати показват, че по-голямо генотоксично въздействие оказва хербицида Monosan.

Ключови думи: генотоксичност, рентгенови лъчи, Monosan, корени, *Allium Cepa*

At concentration of 30 ml herbicide the length of root it was zero. While at control group the length of onion root it was till 8 cm for 8 days.

While the onion bulbs treated at 300 and 900 rad, did not block the growth of onion roots, such as herbicide Monosan at 30 ml concentration. Obtained results show that more genotoxic effect has herbicide monosan.

Key words: Genotoxicity, X-Ray, monosan, Root, *Allium Cepa*

УВОД

Пестицидите влизат в почвата чрез директно добавяне (селскостопански практики) или чрез непреки методи (изхвърляне от производствени площадки, случайно изтичане, изтичане от сметища на пестициди, повърхностно оттичане и др.). Известно е, че пестицидите влияят върху поведението на почвената ензимна система, която играе важна роля в биологичната активност на растенията (Singh and Kumar, 2008).

Излагането на електромагнитно лъчение (EMF-r) на живи организми предизвиква увреждането на ДНК (Redlarski, 2015). Въпреки засилената и широка употреба на тези устройства, това е тема на загриженост за учените, поради последиците от EMF-r за здравето на живите същества (Redlarski, 2015; Vian, 2016). Проучвания са документирали различни биологични въздействия, като поява на лезии в жизнено важни органи (Sepehrimanesh, 2014) и промени в генната експресия, клетъчния цикъл, ензимната активност (Lee, 2005), експресията на протеини, хормоналните нива, оксидативния метаболизъм, пропускливост на клетъчната мембрана и генотоксичност при излагане на EMF-r (Ruediger, 2009). Въпреки това, повечето от тези резултати са получени от проучвания върху животинската система и по-малко внимание

INTRODUCTION

Pesticides enter the soil by direct supplementation (agricultural practices) or by indirect methods (discharge from production sites, accidental spillage, leakage from pesticide dumpsites, surface run off, etc.). Pesticides are known to affect the behaviour of soil enzymatic system that plays an important role insoil-plant biological activity (Singh and Kumar, 2008).

Exposure of electromagnetic field radiations (EMF-r) to the living beings, induce the damage of DNA (Redlarski, 2015). Notwithstanding, the accelerated and widespread use of these gadgets, it has become a topic of utmost concern among the scientists owing to the health implications of EMF-r on living beings (Redlarski, 2015; Vian, 2016). Studies have documented various biological effects like induction of lesions in vital organs (Sepehrimanesh, 2014), and alterations in gene expression, cell cycle, enzyme activity (Lee, 2005), protein expression, hormone levels, oxidative metabolism, cell membrane permeability, and genotoxicity on exposure to EMF-r (Ruediger, 2009).

However, most of these findings have been derived from studies on animal system and less attention has been paid

е отделено на влиянието върху растенията. Нещо повече, сред оскъдните публикации за растенията, малко от тях съобщават, че EMF-r увеличават растежа на растенията, докато други посочват инхибиторните ефекти на EMF-r. Например EMF-r понижава кълняемостта на семената (Akbal, 2012; Jakubowski, 2012), нарушава растежа на корените, ранния растеж на разсада и ризогенезата, и предизвиква биохимични промени в растенията (Sharma, 2010).

to explore the effect on plants. Moreover, amongst the scanty publications on plants, few have reported EMF-r to enhance plant growth, whereas, others have documented the inhibitory effects of EMF-r. For example, EMF-r cause reduction in seed germination (Akbal, 2012; Jakubowski, 2012), impair root growth, early seedling growth and rhizogenesis and induce biochemical changes in plants (Sharma, 2010).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Използваните в експеримента главички от лук са подготвени за третиране чрез рязане на стария корен. Отгледани са в епруветка при стайна температура.

Прилагат се пет различни концентрации на хербицида Monosan (5, 10, 15, 20 и 30 ml). Тези концентрации се получават чрез разреждане на хербицида в 2 литра питейна вода.

Третирането на корените на лука продължава 8 дни. След третирането се измерва дължината на корена.

Луковиците са третирани с две различни дози рентгенови лъчения 300 и 900 rad за 10 секунди

Използвани са 20 луковици за всяка концентрация.

MATERIAL AND METHODS

The onion bulbs used in the experiment have been prepared for treatment by cutting the old root. They were grown in a test tube at room temperature.

Five different concentrations of herbicide Monosan (5, 10, 15, 20 and 30 ml) were applied. These concentrations were prepared by dilution of herbicide Monosan in 2 l of drinking water.

The treatment of onion roots has lasted for 8 days. After the treatment, the length of the onion root was measured.

We treat the onion bulb and in two different x-ray doses 300 and 900 rad, for 10 second.

For each concentration, 20 onions were used.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Резултатите за токсичността на хербицида Monosan към корените на лук се получават чрез измерване на дължината на корена (Таблица 1). Дозата от 30 ml хербицид има силен генотоксичен ефект, като блокира растежа на корените (Фигура 1).

Генотоксичният ефект на доза от 5 ml хербицид, разтворен в 2 l вода, спира растежа на корена, в сравнение с контролната група. Средната дължина на корена при концентрация от 5 ml хербицид е 3.1 mm. Най-голямата измерена дължина е 6 mm, а най-малката е 1 mm.

RESULTS AND DISCUSSION

The results of toxicity of herbicide Monosan to onion roots was assessed by measurement of the root length (Table 1). The dose of 30 ml herbicide has very genotoxic effect by blocking the growth of onion root (Figure 1).

Genotoxic effect of the herbicide at dose of 5 ml per 2 l water, caused negative effect – Inhibition of root elongation, compared with the root of control group of onions. The average length of onion root at concentration of 5 ml herbicide is 3.1 mm. The largest length of the onion root is 6 mm, while the smallest length of the onion root is 1 mm.

Таблица 1. Резултати от дължината на корена на лука, при различна концентрация на хербицида Monosan, разреден в 2 литра питейна вода.
Table 1. Results of the onion root length, in different concentration of herbicide monosan, diluted in 2 liter of drinking water

Луковица Bulb	Дължина на корен (mm) на лук при различна концентрация на хербицид Monosan, разреден в 2 литра l питейна вода Length of onion root (mm) in different concentration of herbicide Monosan, in 2 l of drinking water					
	5ml	10ml	15ml	20ml	30ml	Контрола / Control
1	3	2	2	1	0	5
2	5	0	0	0.5	0	8
3	3	1	**0.5**	0	0	7
4	2	0	0	**0.5**	0	8
5	**1**	1	0	0	0	5
6	3	2	0	0	0	6
7	2	2	1	**1**	0	8
8	3	2	0.5	0	0	8
9	1	0	0	0	0	7
10	4	2	0	0	0	8
11	**6**	0	0	0	0	2
12	3	**4**	**2**	0	0	**9**
13	3	2	0	0	0	6
14	4	0.5	1	0	0	8
15	2	1	2	1	0	**4**
16	3	0	0.5	1	0	7
17	3	2	1	0	0	6
18	5	0	0	0	0	8
19	3	2	1	1	0	5
20	3	**4**	0.5	0	0	9
Средна дължина на корен на лук Average length of onion root	62 :20= 3.1 mm	27 : 20= 1.35 mm	8: 20= 0.40 mm	6:20= 0.30 mm	0	134: 20= 6.7 cm

Фиг. 1. Луковици без корени при 30 ml концентрация на хербицида
Fig. 1. Onion bulbs without roots at 30 ml concentration of herbicide

При доза от 10 ml на 2 l вода, дължината е по-малка, в сравнение с корен третиран при концентрация 5 ml и с контролна група. Средната дъл-

At dose of 10 ml herbicide per 2 l water the length of onion root became shorter, compared with the root of onions treated at concentration of 5 ml and with

жина на корените при концентрация от 10 ml хербицид/2 l е 1.35 mm. Най-голямата измерена дължина е 4 mm, а най-малката е 0.5 mm.

При доза от 15 ml хербицид на 2 l вода, дължината е по-малка, в сравнение с корени третиран с концентрация 5 ml и 10 ml и спрямо контролна група. Средната дължина на корените при концентрация от 15 ml хербицид на 2 l вода е 0.40 mm. Най-голямата измере-на дължина е 22 mm, а най-малката дължина на е 0.5 mm.

Третирането с доза от 20 ml хербицид на 2 l вода води до по-силно отрицателно въздействие, като например дължината на корена е по-малка в сравнение с третиране при концентрация 5, 10 и 15 ml и спрямо контролата. Средната дължина при концентрация от 20 ml хербицид е 0.30 mm. Най-голямата дължина е 1 mm, а най-малката дължина на е 0.5 mm (Фигура 2).

Средната дължина на корен от лук при контролната група е 6.7 cm. Най-голямата дължина е 9 cm, а най-малката дължина е 4 cm.

На Таблица 2 представяме резултатите от вариантите с рентгеново лъчение. Както се вижда в таблицата, дозите от 900 rad имат по-голям генотоксичен ефект от дозите с 300 rad. Средната дължина на корен от лук при дози 900 rad е 2.6 cm, докато при дози 300 rad тя е 3.65 cm, което е два до три пъти по-къса, отколкото в контролната група (средна дължина на корен от лук 6,7 cm).

Най-голямата дължина на корените на лука при експозиция 300 rad е 7 cm, докато най-малката дължина на корена на лук е 1 cm.

Най-голямата дължина на корените на лука при експозиция 900 rad е 5 cm, докато най-малката дължина на корена на лук е 1 cm (Фигура 3).

Най-голямата дължина в контролната група е 9 cm, а най-малката дължина е 2 cm.

control group of onions. The average length of onion root at concentration of 10 ml herbicide/2 l, is 1.35 mm. The largest length of the onion roots is 4 mm, while the smallest length of the onion root is 0.5 mm.

At dose of 15 ml herbicide per 2 l water, the length of onion root became shorter, compared to the onion roots treated at concentration of 5 and 10 ml and to control group of onions. The average length of onion root at concentration of 15 ml herbicide/2 l, is 0.40 mm. The largest length of the onion roots is 2 mm, while the smallest length of the onion root is 0.5 mm.

Treatment with the dose of 20 ml herbicide per 2 l water caused more negative effect – the length of onion root became shorter, compared to the root of onions treated at concentration of 5, 10 and 15 ml and to control group of onions. The average length of onion root at concentration of 20 ml herbicide/1 l, is 0.30 mm. The largest length of the onion roots is 1 mm, while the smallest length of the onion root is 0.5 mm (Figure 2).

The average length of onion root at control group of onions is 6.7 cm. The largest length of the onion roots is 9 cm, while the smallest length of the onion root is 4 cm.

At Table 2, we present the results of treatment with x-ray. As it show in table the doses of 900 rad, has more genotoxic effect than doses of 300 rad. Average length of onion root at doses 900 rad it is 2.6 cm, while at doses 300 rad it is 3.65 cm, it is two till three fold shorter than at control group (average length of onion root 6.7 cm).

The largest length of the onion roots at exposure 300 rad is 7 cm, while the smallest length of the onion root is 1 cm.

The largest length of the onion roots at exposure 900 rad is 5 cm, while the smallest length of the onion root is 1 cm (Figure 3).

The largest length of the onion roots at control group is 9 cm, while the smallest length of the onion root is 2 cm.

Таблица 2. Дължина на корен от лук, в две различни рентгенови дози 300 и 900 rad за 10 секунди
Table 2. Results of the onion root length, in two different x-ray doses 300 and 900 rad for 10 second

Луковица Bulb	Дължина на корен (cm) на лук при две различни рентгенови дози 300 и 900 rad за период от 10 секунди Length of onion root (cm) in two different x-ray doses 300 and 900 rad for 10 second.		
	300 kv	900 kv	Контрола / Control group
1	4	2	5
2	5	3	8
3	3	3	7
4	2	4	8
5	6	3	5
6	3	3	6
7	**1**	4	8
8	2	**1**	8
9	3	**5**	7
10	4	3	8
11	6	2	**2**
12	3	**1**	**9**
13	3	2	6
14	4	2	8
15	2	1	4
16	3	2	7
17	3	2	6
18	5	4	8
19	4	3	5
20	**7**	2	9
Средна дължина на корен на лук Average length of onion root	73 :20=3.65 cm	52 : 20=2.6 cm	134: 20= 6.7 cm

Фиг. 2. Дължина на корени на лук при различна концентрация на хербицид
Fig. 2. Different length of onion roots at different concentration of herbicide

Фиг. 3. Дължина на корени на лук при различна експозиция на рентгенови лъчи
Fig. 3. Different length of onion roots at different exposure of x-ray

ИЗВОДИ

Въз основа на резултатите може да се заключи, че хербицидът Monosan в концентрация от 30 ml има по-голям генотоксичен ефект, спирайки растежа на корените, в сравнение с рентгеновите лъчи.

Вариантите с други концентрации (5, 10, 15, 20 ml) имат най-малка дължина на корена, спрямо контролната група.

CONCLUSIONS

Based on the results it can be concluded that herbicide Monosan, has more genotoxic effect, compared with x-ray, blocking the growth of the onion root in 30 ml herbicide concentrations.

The treatment of onion root in other concentration (5, 10, 15, 20 ml) has the shortest length compared with control group.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Akbal, A., Y. Kiran, D. Turgut-Balik, A. Sahin and H. H. Balik**, 2012. Effects of Electromagnetic Waves Emitted by Mobile Phones on Germination, Root Growth, and Root Tip Cell Mitotic Division of *Lens culinaris* Medik. *Polish J Environ Stud*, 21: 23-29.
2. **Jakubowski, T.**, 2010. The Impact of Microwave Radiation at Different Frequencies on Weight of Seed Potato Germs and Crop of Potato Tubers. *Agric Eng,* 14: 57-64.
3. **Lee, S., D. Johnson, K. Dunbar, H. Dong, X. Ge, Y. C. Kim et al.**, 2005. 2.45 GHz Radiofrequency Fields Alter Gene Expression in Cultured Human Cells. *FEBS Lett,* 579 (21), 4829-36.
4. **Redlarski, G., B. Lewczuk, A. Zak, A. Koncicki, M. Krawczuk, J. Piechocki et al.**, 2015. The Influence of Electromagnetic Pollution on Living Organisms: Historical Trends and Forecasting Changes. *BioMed Res Int*, 1-18.

5. **Ruediger, H. W.**, 2009. Genotoxic Effects of Radiofrequency Electromagnetic Fields. *Pathophysiology*, 16 (2), 89-102.
6. **Sepehrimanesh, M., N. Azarpira, M. Saeb, S. Nazifi, N. Kazemipour and O**. **Koohi**, 2014. Pathological Changes Associated with Experimental 900-MHz Electromagnetic Wave Exposure in Rats. *Comp Clin Path*, 23 (5), 1629-31.
7. **Sharma, V. P., H. P. Singh, D. R. Batish and R. K**. **Kohli**, 2010. Cell Phone Radiations Affect Early Growth of *Vigna radiata* (Mung Bean) through Biochemical Alterations. *Z Naturforsch C*, 65 (1-2), 66-72.
8. **Singh, D. K. and S. Kumar**, 2008. Nitrate Reductase, Arginine Deaminase, Urease and Dehydrogenase Activities in Natural Soil (Ridges with Forest) and in Cotton Soil after Acetamiprid Treatments. *Chemosphere*, 71, 412-418.
9. **Vian, A, E. Davies, M. Gendraud and P. Bonnet**, 2016. Plant Responses to High Frequency Electromagnetic Fields.

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2019, 22 (1), 378-387
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan
ISSN 1311-0489 (Print)
ISSN 2367-8364 (Online)

Влияние на инокулацията на почвата с дъждовни червеи върху ензимната активност в ризосферата на люцерна

Йонита Перфанова*, Костадинка Недялкова, Галина Петкова, Христо Вълчовски

ИПАЗР „Н. Пушкаров“, 1080 София, България

Influence of Earthworm Inoculation of Soil on Enzyme Activity in Alfalfa Rhizosphere

Jonita Perfanova*, Kostadinka Nedyalkova, Galina Petkova, Hristo Valchovski

ISSAPP „N. Poushkarov“, 1080 Sofia, Bulgaria
**E-mail: JPerfanova@gmail.com*

Original scientific paper

Received: 21.04.2019 *Accepted:* 07.05.2019 *Published:* 03.07.2019

РЕЗЮМЕ

През последните години у нас се проучва влиянието на инокулацията на почвата с дъждовни червеи върху почвеното плодородие и растителната продуктивност, както и върху микробиологичните и физични показатели на почвата. В настоящата работа се съобщават данни за ефекта от инокулацията на излужена канелена горска почва с дъждовни червеи върху ензимната активност в ризосферата на люцерна. Изследвани са в динамика самостоятелни и смесени инокулации с ендогеик, анесик и епигеик червеи и със симбиотични азотфиксиращи бактерии *Rhizobium meliloti* щам 116. Данните показват, че приложените инокулации влияят по различен начин върху активността на изследваните ензими. Установен е подчертан положителен ефект на самостоятелните инокулации с епигеик и ендогеик червеи върху инвертазната активност на почвата.

SUMMARY

In recent years, soil inoculation with earthworms has been investigated in our country with an aim to increase soil fertility and plant productivity, and to assess the effect on soil microbiological and physical parameters. In this study, data on the effect of earthworm inoculation of Chromic Luvisol on enzyme activity in alfalfa rhizosphere are reported.

Single and mixed inoculations with endogeic, anecic and epigeic earthworms, and with nitrogen-fixing bacteria *Rhizobium meliloti* strain 116 were performed. Data showed that inoculations applied had different influence manner on enzyme activities of rhizosphere soil.

Single epigeic and endogeic earthworm inoculations had a pronounced positive effect on soil invertase activity.

Mixed inoculation with earthworms+*Rh.*

При смесената инокулация с трите групи червеи+ *Rh. meliloti* и самостоятелната с *Rh. meliloti* е установена тенденция на увеличение на уреазната активност при първи откос на люцерната. Всички самостоятелни и смесени инокулации оказват положително влияние върху фосфатазната активност в края на изследването. Като цяло, активността на изследваните ензими се понижава в края на вегетацията.

Ключови думи: ензимна активност, дъждовни червеи, канелена горска почва, люцерна

melliloti 116 and single inoculation with *Rh. melliloti* 116 tended to increase the urease activity at the first alfalfa cutting.

All single and mixed inoculations positively affected acid phosphatase activity at the end of the experiment. In general, the activity of all enzymes studied declined at the end of vegetation.

Key words: enzyme activity, earthworm inoculation, Chromic Luvisol, alfalfa

УВОД

През последните десетилетия в много страни се експериментира по прилагането на нов биологичен способ за повишаване на растителната продуктивност и почвеното плодородие – инокулация на почвата с дъждовни червеи. Дъждовните червеи са доминиращ компонент на почвената макрофауна и чрез своята дейност подобряват почвената структура, въздушния и воден режим на почвата, ускоряват разлагането на органичните съединения, участват в кръговрата на веществата и увеличават достъпността на хранителните елементи, необходими за развитието на растенията (Lee and Foster, 1991; Lavelle at el, 2004; Six at el, 2004). Дъждовните червеи са добре известни като вектори на разпространение на редица микроорганизми, едни от които са симбиотичните азотфиксиращи бактерии от род *Rhizobium spp*. (Madsen and Alexander, 1982; Doube et al., 1994a). Установено е, че при почви с по – голямо разпространение на земни червеи, има засилена ензимна активност – протеаза, уреаза, инвертаза и фосфатаза (Tao et al, 2009). Инокулацията на почвата с дъждовни червеи е особено подходяща за приложение при биологичните системи на земеделие за получаване на екологично чиста растителна продукция. (Thompson, 1993; Doube et al, 1994b).

INTRODUCTION

During the past decades in many countries earthworm inoculation of soil has been investigated as a mean for increasing plant production and soil fertility.

Earthworms are dominant in soil macrofauna communities. Their activities in soil improve soil structure, water and air regime.

They accelerate residue decomposition, take part in element cycling and improve nutrient availability to plants (Lee and Foster, 1991; Lavelle at al, 2004; Six at al, 2004).

Earthworms are well known vectors of microorganisms. As such, they facilitate the distribution of many microbial species, *Rhizobium spp*. being among them (Madsen and Alexander, 1982; Doube et al., 1994a). Higher soil enzyme activity (protease, urease, invertase and phosphatase) was found in the soil with earthworms than in the soil without added earthworms (Tao et al, 2009).

Soil inoculation with earthworms is appropriate for biological agriculture systems aiming to provide healthy and environmentally friendly plant production (Thompson, 1993; Doube et al., 1994b).

С този метод у нас се експериментира сравнително отскоро. Публикувахме данни за влиянието на инокулацията с дъждовни червеи върху добива от люцерна (Valchovski et al., 2018). Успоредно с основната цел си поставихме задача да установим влия-нието на инокулацията на почвата с различни видове червеи върху ензимната активност в ризосферата на лю-церна, което е предмет на настоящата работа.

In our country, the experimentation with this method started recently. We published data on the influence of earthworm inoculation on the yield of alfalfa (Valchovski et al., 2018). In parallel with the main aim, we planned to study the influence of inoculation with different types of earthworms on enzyme activity of alfalfa rhizosphere which was the subject of this investigation.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Опитът е проведен върху излужена канелена горска почва от опитна база „Челопечене“, при ИПАЗР „Н. Пушкаров“. Изследваната почва се характеризира със следните агрохимични показатели: хумус – 1.61 %; минерален азот – 8.6 mg/kg; P (P_2O_5) – 13.5 mg/100 g; K (K_2O) – 23.0 mg/100g; pH (H_2O) – 6.1. Включени са варианти на самостоятелна и смесена инокулация на почвата с местни видове дъждовни червеи, обитаващи почвите на Софийско поле. Тест-културата е люцерна (*Medicago sativa*), сорт “Плевен 6“. Растенията са отгледани в съдове от 10 l в 3 повторения. Опитът е изведен по следната схема: 1. Контрола – без инокулация; 2. Инокулация на почвата с ендогеик червеи; 3. Инокулация с анесик червеи; 4. Инокулация с епигеик червеи; 5. Инокулация с представители на трите екологични групи дъждовни червеи; 6. Инокулация с представители на трите екологични групи червеи и *Rh. melliloti* 116; 7. Инокулация с *Rh. melliloti* 116. За осигуряване добра преживяемост на дъждовните червеи в почвата е внесен 2 % разложен оборски тор. Съдовете са овлажнявани ежедневно до 60-70% от ППВ.

Проследено е влиянието на инокулациите с дъждовни червеи и азотфиксиращи бактерии върху активността на ензимите инвертаза, уреаза и кисела фосфатаза в ризосферната почва при първи и четвърти откос на

MATERIAL AND METHODS

The experiment was conducted on Cromic-Vertic Luvisol collected from 0-20 cm layer of the experimental field of Chelopechene village near Sofia. Agrochemical characteristics of the soil was, as follows: humus content - 1.61 %, mineral nitrogen - 8.6 mg/kg; available phosphorus (P_2O_5) - 13.5 mg/100 g; available potassium (K_2O) - 23.0 mg/100g; and soil reaction pH (H_2O) - 6.1. In the treatments, different types of earthworms picked from local soils of Sofia region were used. The test-plant was the Bulgarian “Pleven 6” alfalfa (*Medicago sativa*) variety. Plants were grown in 10 L pots with tree replicates per variant. The experiment was carried out according to the following scheme: 1) control without inoculation, 2) single inoculation with endogeic earthworms, 3) single inoculation with anecic earthworms, 4) single inoculation with epigeic earthworms, 5) mixed inoculation with the three groups of earthworms, 6) mixed inoculation with the three groups of earthworms + symbiotic nitrogen-fixing bacteria *Rhizobium meliloti* strain 116, 7) single inoculation with *Rhizobium meliloti* 116. For better earthworm life, 2% manure was introduced in the soil. Pots were watered daily up-to 60-70% of water-holding capacity.

The influence of different types of inoculation on the activity of invertase, urease and acid phosphatase in rhizosphere soil at the first and fourth alfalfa cuttings was investigated. The

люцерната. В проучването са подбрани ензими с ключова роля за трансформацията на три от основните биогенни елементи в почвата – C, N и P. Анализите са извършени чрез внасяне на съответен субстрат и отчитане на продукта от реакцията по следните методи: уреазна активност – по Hoffman-Teicher (1961); инвертазна – по модификация на метода на Hoffman (Ampova and Paskaleva, 1970) и фосфатазна – по Tabatabai and Bremner (1969).

Данните са обработени статистически чрез ANOVA (LSD-тест при p<0.05).

enzymes studied play a key role in the transformation of the three main biogenic elements – carbon, nitrogen and phosphorus. Enzyme assays were based on soil incubation with appropriate substrate, and after incubation the enzyme reaction products were determined colorimetrically. The following methods were used: for invertase activity – Hoffman and Teicher (1961), for urease activity – modification of Hoffman' method (Ampova and Paskaleva, 1970), for phosphatase activity – Tabatabai and Bremner (1969).

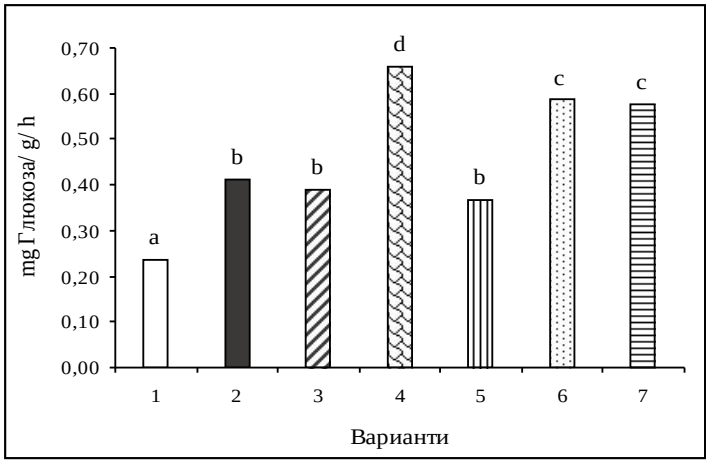
Data were processed through ANOVA (LSD-test at p<0.05).

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Резултатите от изследването на инвертазната активност при първи откос показаха увеличение при всички инокулирани варианти (Фигура 1). Най-високо увеличение се наблюдава във варианта с епигеик червеи, при смесената инокулация на трите екологични групи червеи с азотфиксиращите бактерии *Rh. melliloti* 116 и при самостоятелната инокулация с *Rh. melliloti* 116.

RESULTS AND DISCUSSION

At the first alfalfa cutting, invertase activity significantly increased in all treatments (Figure 1). The activity was the highest in the single epigeic earthworm inoculation, in the mixed inoculation earthworms+ *Rh. melliloti* 116 and in the single inoculation with *Rh. melliloti* 116.

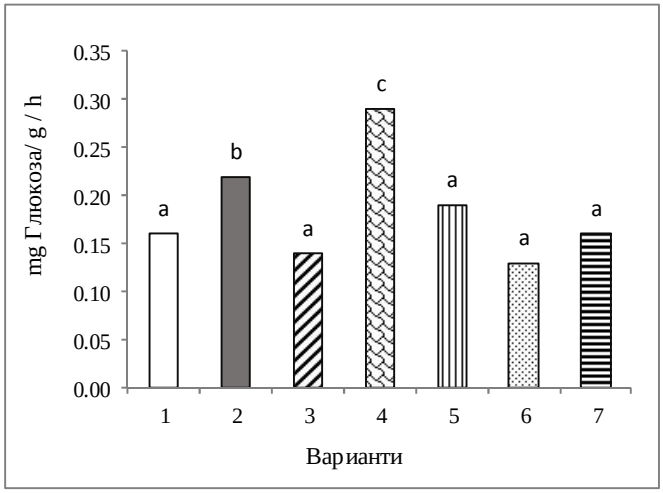


Фиг. 1. Активност на ензима инвертаза в ризосферната почва при първи откос на люцерна. Варианти: 1) Контрола; 2) Инокулация с ендогеик червеи; 3) Инокулация с анесик червеи; 4) Инокулация с епигеик червеи; 5) Смесена инокулация с представители на трите екол. групи червеи; 6) Смесена инокулация+ *Rh. melliloti* 116, 7) *Rh. melliloti* 116.

Fig. 1. Invertase activity in alfalfa rhizosphere at the first cutting. Variants: 1) control, 2) endogeic earthworms, 3) anecic earthworms, 4) epigeic earthworms, 5) the three groups of earthworms, 6) the three groups of earthworms + *Rhizobium meliloti*, 7) *Rhizobium meliloti* 116

При четвърти откос стойностите на инвертазната активност се понижават в сравнение с първия откос. В отделни инокулирани варианти - при самостоятелните инокулации с епигеик и ендогеик червеи, активността е по-висока от контролата (Фигура 2). Понижението на инвертазната активност в края на изследването вероятно е свързано с намаление на количеството на леснодостъпните за микроорганизмите въглеродни съединения в почвата.

At the fourth cutting, lower values of invertase activity comparing to those at the first cutting were registered. In some threatments (single inoculations with epigeic and endogeic earthworms) the activity was higher than the control (Figure 2). Such a decrease at the end of the experiment was probably related to the reduction of available carbon sources for microorganisms.



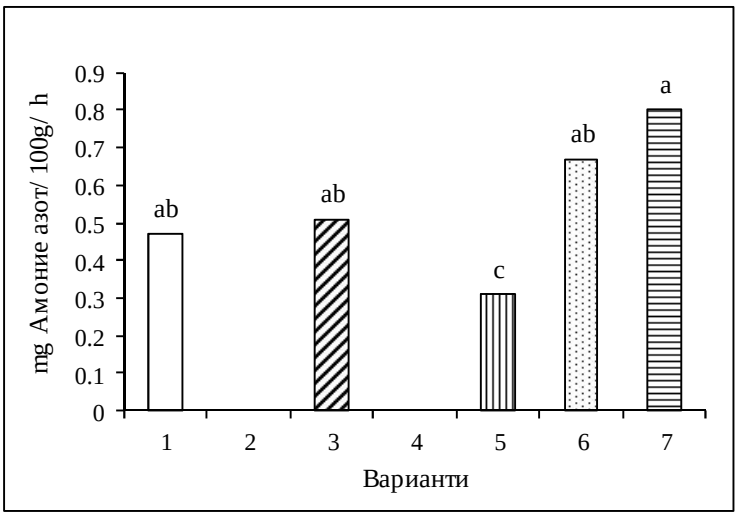
Фиг. 2. Активност на ензима инвертаза в ризосферната почва при четвърти откос на люцерна.
Варианти: 1) Контрола; 2) Инокулация с ендогеик червеи; 3) Инокулация с анесик червеи; 4) Инокулация с епигеик червеи; 5) Смесена инокулация с представители на трите екол. групи червеи; 6) Смесена инокулация+ *Rh. melliloti* 116, 7) *Rh. melliloti* 116.
Fig. 2. Invertase activity in alfalfa rhizosphere at the fourth cutting. Variants: 1) control, 2) endogeic earthworms, 3) anecic earthworms, 4) epigeic earthworms, 5) the three groups of earthworms, 6) the three groups of earthworms + *Rhizobium meliloti*, 7) *Rhizobium meliloti*

Установена е тенденция на увеличение на уреазната активност при смесената инокулация с трите екологични групи червеи + *Rh. melliloti* 116 (вар. 6) и при самостоятелна инокулация със същия щам азотфиксиращи бактерии (вар. 7) в началото на опита (Фигура 3). Тези резултати вероятно са свързани с метаболитната активност на азотфиксиращите бактерии. При самостоятелните

The urease activity tended to increase in the mixed inoculation with earthworms+ *Rh. melliloti* 116 (var.6) and in the single inoculation with *Rh. melliloti* 116 (var. 7) at the first alfalfa cutting (Figure 3). This was probably related to metabolic activity of nitrogen fixing bacteria. The single inoculations with endogeic and epigeic earthworms and

инокулации с ендогеик и епигеик червеи и смесената с трите групи червеи уреазната активност се понижава, а при анесик червеите е близка до контролата. В края на експеримента (четвърти откос) са отчетени минимални стойности на уреазната активност във всички варианти. Получените резултати показват, че ефектът от инокулациите с дъждовни червеи върху уреазната активност е по-изразен в началото на опита и варира силно между различните варианти.

the mixed inoculation with the three earthworm groups resulted in a decrease of urease activity. The activity in anecic earthworm treatment was close to that in the control. At the end of the experiment (fourth alfalfa cutting) urease activity was too low. Results obtained showed that the effect on urease activity was better pronounced at the first alfalfa cutting and that it highly varied among the types of earthworm inoculations.



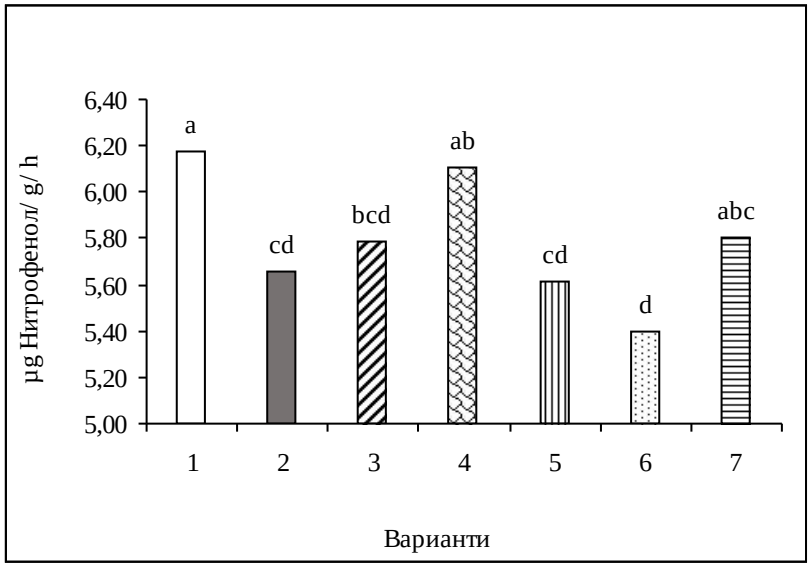
Фиг. 3. Активност на ензима уреаза в ризосферната почва при първия откос на люцерна.
Варианти: 1) Контрола; 2) Инокулация с ендогеик червеи; 3) Инокулация с анесик червеи; 4) Инокулация с епигеик червеи; 5) Смесена инокулация с видове от трите екологични групи; 6) Смесена инокул. + *Rh. melliloti* 116, 7) *Rh. melliloti* 116.
Fig. 3. Urease activity in alfalfa rhizosphere at the first cutting. Variants: 1) control, 2) endogeic earthworms, 3) anecic earthworms, 4) epigeic earthworms, 5) the three groups of earthworms, 6) the three groups of earthworms + *Rhizobium meliloti*, 7) *Rhizobium meliloti*

Данните за фосфатазната активност при първия откос показват тенденция на понижение на стойностите в инокулираните варианти спрямо контролата (Фигура 4). При самостоятелните инокулации с епигеик червеи и симбиотични азотфиксиращи бактерии фосфатазната активност е близка до контролата. Понижението е доказано за самостоятелните инокулации с

Data on acid phosphatase activity showed a decreasing trend in inoculated variants at the first cutting (Figure 4). Close to the control values were found in single inoculations with epigeic earthworms and nitrogen fixing bacteria. Significant differences with the control for single inoculations with anecic and endogeic earthworms and for mixed inoculation with the three groups were

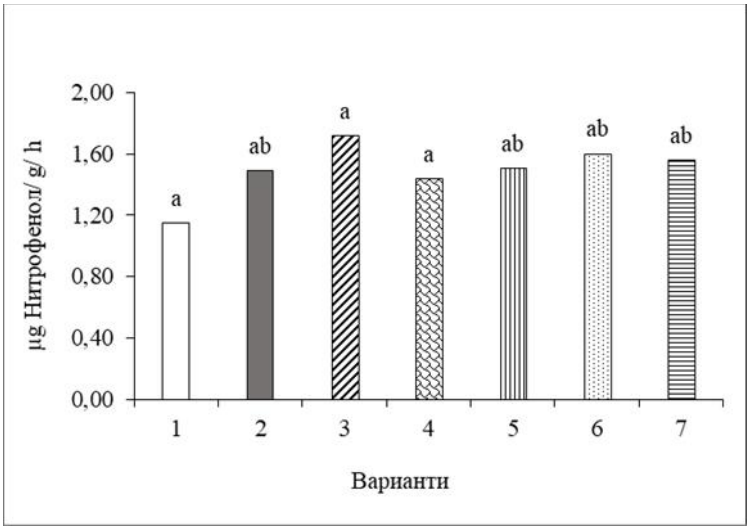
анесик и ендогеик видове и за смесените инокулации с червеи от трите групи. Както и другите два ензима, фосфатазната активност се променя при двата откоса. При четвърти откос тя се понижава по абсолютна стойност в сравнение с активността при първи откос, но инокулациите имат доказан положителен ефект във всички варианти (Фигура 5), като най-висок е ефекта от анесик червеите. Подобно изследване е извършено и от Aira and Domingues (2011), които изпитват три различни вида земни червеи, съвместно с внасяне на оборски тор в почвата и установяват динамика във фосфатазната активност на почвата в течение на времето.

found. As the other two enzymes, phosphatase activity changed with the cutting stages. At the fourth cutting, phosphatase activity lowered by absolute value comparing to the first cutting, but all inoculated variants had positive influence compared to the control (Figure 5). Anecic earthworms produced the highest increment of phosphatase activity. Similar study was made by Aira and Domingues (2011). They investigated the influence of three different earthworm types in manure amended soil and found that soil phosphatase activity dynamically changed with the time.



Фиг. 4. Активност на ензима кисела фосфатаза в ризосферната почва при първи откос на люцерна. Варианти: 1) Контрола; 2) Инокулация с ендогеик червеи; 3) Инокулация с анесик червеи; 4) Инокулация с епигеик червеи; 5) Смесена инокулация с видове от трите екологични групи; 6) Смесена инокул. + *Rh. melliloti* 116; 7) *Rh. melliloti* 116.

Fig. 4. Acid phosphatase activity in alfalfa rhizosphere at the first cutting. Variants: 1) control, 2) endogeic earthworms, 3) anecic earthworms, 4) epigeic earthworms, 5) the three groups of earthworms, 6) the three groups of earthworms + *Rhizobium meliloti*, 7) *Rhizobium meliloti*



Фиг. 5. Активност на ензима киселa фосфатаза в ризосферната почва при четвърти откос на люцерна. Варианти: 1) Контрола; 2) Инокулация с ендогеик червеи; 3) Инокулация с анесик червеи; 4) Инокулация с епигеик червеи; 5) Смесена инокулация с видове от трите екологични групи; 6) Смесена инокул. + *Rh. mellilоti* 116; 7) *Rh. mellilоti* 116.

Fig. 5. Acid phosphatase activity in alfalfa rhizosphere at the fourth cutting. Variants: 1) control, 2) endogeic earthworms, 3) anecic earthworms, 4) epigeic earthworms, 5) the three groups of earthworms, 6) the three groups of earthworms + *Rhizobium meliloti*, 7) *Rhizobium meliloti*

Ross and Cairns (1982) изследват влиянието на земните червеи върху ензимната активност на почвата при райграс за период от 13 месеца. Установено е, че активността на уреазата и фосфатазата намаляват, докато инвертазната активност се увеличава по – време на изпитването. Но като цяло наличието на земните червеи допълнително стимулира активността на трите ензима. Заключава се, че червеите стимулират биохимичните процеси и допринасят за повишаване продуктивността на пасищата.

Данните от изведения опит показват, че активността на изследваните ензими в ризосферата на люцерната се променя динамично, както под влияние на приложените инокулации, така и във връзка с етапите на изследване. Инокулациите с дъждовни червеи и азотфиксиращи бактерии влияят положително върху инвертазната активност, което е по-силно изразено в началния етап на изследването. Под влияние на инокула-

Ross and Cairns (1982) studied the influence of earthworms on enzyme activity of ryegrass for a period of 13 months. They found that soil urease and phosphatase activities diminished during the experimental period, while invertase activity increased during the time. As a whole, earthworm inoculation stimulated the enzyme activities. Authors concluded that earthworms stimulate soil biochemical processes and contribute to increasing pasture production.

Data obtained in our study showed that the activity of enzymes studied in alfalfa rhizosphere change dynamically under the influence of inoculations and experimental stages. As a whole, the inoculation with earthworms and nitrogen-fixing bacteria have positive influence on the invertase activity in alfalfa rhizosphere, more pronounced in the first stage.

циите активността на уреазата се понижава или слабо се увеличава в отделни варианти в началото на опита. Положителен ефект от внесените инокуланти върху фосфатазата е установен в края на вегетацията.

Активността на трите изследвани ензима в ризосферата намалява по абсолютна стойност в края на опита. Известно е, че ензимната активност на почвата е динамичен показател, който реагира чувствително на промените в почвените условия. В ризосферата освен микроорганизмите, корените също продуцират ензими. Понижението на ензимната активност както в контролите, така и в инокулираните варианти, вероятно се дължи на намалената физиологична активност на корените и понижената продукция на ензими в края на вегетационния период.

Urease activity highly varied among different types of inoculation and the effect was better pronounced at the first alfalfa cutting. The effect on acid phosphatase activity was positive at the end of vegetation.

The activity of the three enzymes lowered at the end of experiment. It is known that enzyme activity is a dynamic soil indicator which has sensitive response to changes in soil environment. In the rhizosphere, except soil microorganisms, roots produce soil enzymes, as well. The low enzyme activity in the controls and in inoculated variants was probably due to reduced physiological activity and enzyme production of roots at the end of vegetation.

ИЗВОДИ

В условията на съдов опит с люцерна върху излужена канелена горска почва самостоятелните инокулации с ендогеик и епигеик червеи оказват подчертан положителен ефект върху инвертазната активност на ризосферната почва в началото и в края на опита. Ефектът върху уреазната активност е по-изразен в началото на опита и варира силно между различните варианти. При смесената инокулация с трите екологични групи червеи + *Rh. melliloti* 116 и при самостоятелна инокулация със *Rh. melliloti* 116 в началото на опита е установена тенденция на увеличение на активността, а при самостоятелните инокулации с ендогеик и епигеик червеи и смесената с трите групи червеи уреазната активност се понижава. Всички приложени инокулации влияят положително върху фосфатазната активност в края на опита, като най-висок е ефекта от анесик червеите. Като цяло, в края на вегетацията активността на трите изследвани ензима в контролата и инокулираните варианти намалява по абсолютна стойност.

CONCLUSIONS

In the pot experiment with alfalfa on Chromic-Vertic Luvisol, the single inoculations with endogeic and epigeic earthworms had a pronounced positive effect on invertase activity in the rhizosphere at the beginning and at the end of the experiment. The effect of inoculations on urease activity was better pronounced at the first alfalfa cutting and it highly varied among different treatments. In the mixed inoculation with earthworms+ *Rh. melliloti* 116 and in the single inoculation with *Rh. melliloti* 116 urease activity tended to increase, while in the single inoculations with endogeic and epigeic earthworms and in the mixed inoculation with the three earthworm groups it significantly decreased.

All single and mixed inoculations positively affected acid phosphatase activity at the end of the vegetation, with anecic species giving the highest increment. In general, the activity of all enzymes studied declined at the end of vegetation.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Aira, M. and J. Domingues**, 2011. Earthworm Effects without Earthworms: Inoculation of Raw Organic Matter with Worm-Worked Substrates Alters Microbial Community Functioning. *PLoS One*, 6(1): e16354
2. **Ampova, G. and K. Paskaleva**, 1970. The Use of Schoorl's Method in Determining the Activity of the Invetrase Enzyme in Soil. *Soil Science and Agrochemistry,* 5(6), 69-72 (Bg).
3. **Doube, B.M., P.M. Stephens, C.W. Davoren and M.H. Ryder**, 1994a. Earthworms and the Introduction and Management of Beneficial Soil Microorganisms. In: Pankhurst, C.E., Doube, D.M., Gupta, V.V.S.R., Grace, P.R. (Eds.), Soil Biota: Management in Sustainable Farming Systems. 46 CSIRO Information, Melbourne, pp. 32-41.
4. **Doube, B.M., M.H. Ryder, C.W. Davoren and P.M.Stephens**, 1994b. Enhanced Root Nodulation of Subterranean Clover (*Trifolium subterraineum*) by Rhizobium trifolii in the Presence of the Earthworm Aporrectodea trapezoids. *Biol. Fertil. Soils*, 18, 169-174.
5. **Hoffman, G. and K. Teicher**, 1961. Ein kolorimetrisches Verfahren zur Bestimmung der Ureaseaktivität in Böden. *Zeit. Pflanzenernaehr. Dung. Bodenkunde*, 95, 55-63.
6. **Jun Tao, B. Griffiths, S. Zhang and X. Chen**, 2009. Effects of Earthworms on Soil Enzyme Activity in an Organic Residue Amended Rice-Wheat Rotation Agro-Ecosystem. *Applied Soil Ecology*, 42 (3), 221-226.
7. **Lavelle, P., M. Blouin, J. Boyer, P. Cadet, D. Laffray and A.T. Pham-Thi**, 2004. Plant Parasite Control and Soil Fauna Diversity. *C. R. Biol*., 327, 629-638.
8. Lee K. and R. Foster, 1991. Soil Fauna and Soil Structure. *Aust. J. Soil Res.,* 290, 745-775.
9. **Madsen, E.L. and M. Alexander**, 1982. Transport of Rhizobium and Pseudomonas through Soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 46, 557-560.
10. **Ross, D. and A. Cairns**, 1982. Effects of Earthworms and Ryegrass on Respiratory and Enzyme Activities of Soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 14 (6), 583-587.
11. **Six, J.**, 2004. A History of Research on the Link between (Micro) Aggregates, Soil Biota and Soil Organic Matter Dynamics. *Soil Till. Res*. 79, pp. 7-31.
12. **Tabatabai, M. and J. Bremner**, 1969. Use of p-Nitrophenyl Phosphate for Assay of Soil Phosphatase Activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 1, 301-307.
13. **Thompson, L.**, 1993. The effect of Earthworms and Snails in a Simple Plant Community. *Oecologia,* 95, 171-178.
14. **Valchovski, H., M. Kercheva, J. Perfanova, K. Nedyalkova and J. Hodjev**, 2018. Effect of Inoculation of Earthworms and Soil Microorganisms on Soil Structure and Productivity of Alfalfa. *Eurasian Journal of Agricultural Research*, 2 (1), 22-29.

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2019, 22 (1), 388-397
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan
ISSN 1311-0489 (Print)
ISSN 2367-8364 (Online)

Технологични показатели за получаване на сладкарско изделие линцер предназначено за специфични здравословни нужди

Илиана Лазова-Борисова

Институт по криобиология и хранителни технологии, 1407 София, България

Technological Indicators for Obtaining a Confectionery Product Linzer for Specific Health Needs

Iliana Lazova-Borisova

Institute of Cryobiology and Food Technologies, 1407 Sofia, Bulgaria
E-mail: iliana_lazova@abv.bg

Original scientific paper

Received: 08.05.2019 *Accepted:* 30.05.2019 *Published:* 03.07.2019

РЕЗЮМЕ

Разработеният иновативен продукт е получен на основата на безглутенови брашна (оризово, бадемово) с добавка на спирулина (сух екстракт *Spirulina Platensis* – 30 % фикоцианин), спомагателни суровини (краве масло, набухвател, пудра захар и др.) и хидроколоид, с които се обогатява асортиментната листа на сладкарските изделия в страната. Целта на изследването е да се разработят рецептурна формула и нова технология за получаване на сладкарски продукт „линцер“, предназначен за специфични здравословни нужди.

Проучени са физико-химичният и минералният състав на суровините и са проведени опитни лабораторни изпичания на продукта. Тестеното сладкарско изделие е обогатено на фикоцианини, микро- и макроелементи, протеини и мазнини. Ниското съдържание на протеин в оризовото брашно (6,72%) се компенсира чрез добавка на бадемово брашно (21,20%). По отношение на мазнините в бадемовото брашно

SUMMARY

The innovative product developed is based on gluten-free flours (rice, almond) dry extract of spirulina (*Spirulina Platensis* – 30% phycocyanin), auxiliary raw materials (cow butter, raspberry, powdered sugar, etc.) and hydrocolloid assortment of confectionery products in the country.

The aim of the study is to develop a formula and a new technology for obtaining a 'linger' confectionery product designed for specific health needs.

The physico-chemical and mineral composition of the raw materials has been studied and experimental laboratory firing of the product has been carried out. The pasta confectionery product is enriched with phycocyanins, trace- and macroelements, proteins and fats. The low protein content in rice flour (6.72%) is compensated by the addition of almond flour (21.20%). With regard to the fat in almond meal (51.40%) and its inclusion at

(51,40%), и неговото включване за сметка на оризовото брашно (0,92% мазнини) води до нарастване на съдържанието на мазнини в тестения къс. Количеството на вложените мазнини (28,64%) повишава пластичността на тестото и му придава необходимата ронливост. Енергийната стойност на готовия продукт (500 kcal/100 g продукт) съдържа 28,64% мазнини, 9,09% протеин, 12,79% влакнини и 43,04% безазотни екстрактни вещества.

От направеното проучване за получаването на линцер е установено, че продуктът има добра порьозност на сърцевината, характеризира се с приятен вкус, специфичен мирис и аромат характерни за вложените суровини.

Асортиментът е предназначен за хора, със специфични здравословни нужди – болни от цьолеакия, хора активно спортуващи, както и с профилактична цел.

Ключови думи: безглутенови брашна, цьолиакия, линцер, спирулина

the expense of rice flour (0.92% fat) leads to an increase in the fat content of the dough.

The amount of fat input (28.64%) increased the doughtiness of the dough and gives it the necessary friability. The energy value of the finished product (500 kcal / 100 g product) contains 28.64% fat, 9.09% protein, 12.79% fiber and 43.04% non-extractable substances.

The study for the preparation of a lincer had shown that the product had a good porosity of the medium, characterized by a pleasant taste, specific smell and aroma characteristic of the raw materials used.

The assortment is designed for people with specific health needs - patients with celiac disease, active sportsmen and prophylactics.

Key words: gluten-free flours, celiac, lincer, spirulina

УВОД

Съществен проблем, който е пряко свързан с храненето на човека при използването на традиционните зърнени храни е непоносимостта към глутен. Глутеновата ентеропатия (ГЕ), известна още като цьолиакия, представлява хронична болест, засягаща деца и възрастни във всяка една възраст, малко по-често при жени, отколкото при мъже, с прицелен орган тънкото черво. Глутенът е съставен от белтъците на глиадина и глутенина, които са свързани с нишестето в ендосперма на някои житни зърнени култури (Atanasova et al., 1977; Vangelov, 1999; Krachanova, 2000; Karadjov, 2007). Те имат различни молекулни маси и физични свойства. Тези два белтъка изграждат около 80% от белтъчното съдържание в зърното на пшеницата и са главната причина за развитието на глутеновата ентеропатия. Болните с ГЕ не понасят глиадин-алкохол-разтворима

INTRODUCTION

A major problem that is directly related to human nutrition when using traditional cereals is gluten intolerance. Glutteny Enteropathy (GE), also known as celiac disease, is a chronic disease affecting children and adults at all ages, slightly more frequent in women than in men, with the target organ in the small intestine.

Gluten is composed of the proteins of gliadin and glutenin which are related to starch in the endosperm of certain cereal crops (Atanassova et al., 1977, Vangelov, 1999, Krachanova, 2000, Karadjov et al. 2007). They have different molecular masses and physical properties.

These two proteins make up about 80% of the protein content in the wheat grain and are the main cause of the development of gluten enteropathy. PE patients do not tolerate a gliadin-alcohol-soluble gluten

фракция на глутена. Единственият ефективен начин за да се избегнат симптомите е прилагането на подбрани диети, в които отсъстват протеините на пшеницата, ръжта, ечемика и някой други зърнени култури, които могат да увредят чревната лигавица (Kozmina, 1971; Grishin et al.,1974; Kazakov et al. 1980). Технологията на безглутеновите хлебни изделия се основава на използването на брашна от царевица, ориз, соя и елда, както и употребата на нишестета с различен ботанически произход (Ostrovskii, 1959; Lenindger, 1985; Krachanova, 2000). Полизахариди и хидроколоиди, като ксантан, целулоза, пектини, β-глюкани, гума гуар и техните смеси се използват като структурообразуващи компоненти към безглутенови текстури и тяхното формиране (Ostrovskii, 1959; Genadiev et al., 1968; Lenindger , 1985).

Хидроколоидите са хидрофилни полимери, които обикновено съдържат много хидроксилни групи и могат да бъдат полиелектролити. Те подобряват стабилността на тестото, формоустойчивостта и получаването на хляб с по-висок специфичен обем (Ostrovskii, 1959; Haralampiev et al.,1970; Lenindger, 1985).

При добавяне на гума гуар, пектин, ксантан и хидроксипропилметилцелулоза се получава хляб с по-мека средина и се наблюдава забавяне на страреенето на хляба.

Химическият състав на безглутеновите храни обуславя по-ниска хранителна стойност в сравнение с традиционните. Това налага провеждането на изследвания за използването на хранителни и диетични добавки за производството на диетичен хляб (Radoev, 1962; Asp et al., 1983; Antonova et al., 2003; Ayalew et al., 2006).

Целта на изследването е да се установи рецептурна формула и иновативна технология за получаване на сладкарско изделие линцер с помощта на подходящи безглутенови брашна и подбран хидроколоид.

fraction. The only effective way to avoid symptoms is to apply selected diets in which wheat, rye, barley and some other cereals that may damage the intestinal mucosa are absent (Kozmina, 1971; Grishin et al.,1974; Kazakov et al. 1980).

The technology of gluten-free bakery products is based on the use of corn, rice, soy and buckwheat meal as well as the use of starches of different botanical origin (Ostrovskii, 1959; Lenindger, 1985; Krachanova, 2000).

Polysaccharides and hydrocolloids such as xanthan, cellulose, pectins, glucans, guar gum and their mixtures are used as structuring components for gluten-free textures and their formation (Ostrovskii, 1959; Genadiev et al., 1968; Lenindger , 1985).

Hydrocolloids are hydrophilic polymers, which usually contain many hydroxyl groups and may be polyelectrolytes. They improve the stability of the dough, the mold resistance, and the production of bread with a higher specific volume (Ostrovskii, 1959; Haralampiev et al.,1970; Lenindge , 1985).

When guar gum, pectin, xanthan gum and hydroxypropylmethylcellulose are added, bread is obtained with a softer medium and there is a slowing of the brewing of the bread.

The chemical composition of gluten-free foods has a lower nutritional value than traditional ones. This necessitates research on the use of dietary and dietary supplements for the production of dietetic bread (Radoev, 1962; Asp et al., 1983; Antonova et al., 2003; Ayalew et al., 2006) .

The purpose of the study is to establish a formula formulation and innovative technology for making a confectionery liner by using suitable gluten-free flours and a selected hydrocolloid.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

За получаването на сладкарско изделие линцер са използвани безглутенови брашна: оризово и бадемово. Като допълнителни суровини са вложени – пудра захар и царевично нишесте. Съгласно наредба № 8 на МЗ за изисквания към използване на добавки в храните е включен хидроколоид – Е412-гума гуар.

Количеството на глутена е определено чрез конкурентен ензимен имуноанализ-R5 ELISA RIDASCREEN (AOAC-OMA, 2012). Проведено е пробното лабораторно изпичане на продукта.

Иновативният продукт е тестено сладкарско изделие – обогатено на фикоцианини, на основата на оризово брашно, бадемово брашно, спирулина (сух екстракт Spirulina Platensis 30 % фикоцианин), допълнителни суровини и хидроколоид, с които се обогатява асортиментната листа на сладкарските изделия в страната.

Замесва се маслено линцер тесто от брашната и останалите компоненти по еднофазния метод на замесване. Готовото тесто е с по- голяма пластичност. Вложения химичен набухвател (бакпулвер) увеличава шупливостта на тестото. То се разточва с точилка с дебелина 4-5 mm и престоява 1 час в хладилник за втвърдяване на маслото. Формира се на топчета и се приготвя във намазнени със слънчогледово олио форми за изпичане. Тъй като тестото е безглутеново и се разлива при изпичане се налага употребата на форми.

Изпичането е проведено за 5 минути при 180 ℃.

Количеството на вложените мазнини (28,64%) повишава пластичността на тестото и му придава необходимата ронливост. Енергийната стойност (500 kcal/100 g продукт) е висока на база високото съдържание на мазнините (28,64%) и безазотните екстрактни вещества (43,04%). Влагата е сравнително ниска (4,35%), тъй като вложените

MATERIAL AND METHODS

For obtaining lincer confectionery product, gluten-free flours were used: rice and almonds. Additional ingredients are added – powdered sugar and corn starch. According to the Ordinance No 8 of the Ministry of Health on requirements for the use of food additives, hydrocolloid – E412-guar gum is included.

The amount of gluten is determined by competitive enzyme immunoassay-R5 ELISA RIDASCREEN (AOAC-OMA, 2012). Laboratory firing of the product was done.

The innovative product is a pastry product – enriched with phycocyanins based on rice flour, almond flour, spirulina (Spirulina Platensis 30% phycocyanin dry extract), additional raw materials and hydrocolloid, which enrich the assortment of pastry products in the country.

Mix the oil dill paste from the flour and other ingredients by the single-step blending method. The finished dough is more plastic.

The spent chemical baking agent (baking powder) increases the dough's porosity. It is rolled with a 4-5 mm thick grinder and stays for 1 hour in a refrigerator to cure the oil. It is formed into balls and is prepared in sunflower oil-soaked baking molds. Since the dough is gluten-free and spills during baking, the use of molds is necessary.

The roasting is carried out for 5 minutes at 180 ° C.

The amount of fat input (28.64%) increases the doughtiness of the dough and gives it the necessary friability. The energy value (500 kcal / 100 g product) is high based on the high fat content (28.64%) and the non-nitrogenous extracts (43.04%). The moisture content is relatively low (4.35%), as the raw materials involved in the dough are damp

суровини в замесването на тестото са сухи компоненти с ниска влажност – това играе важна роля при времето за изпичане на готовия асортимент, което е намалено от 12 на 5 минути. Това спестява електрическа енергия, както и време за приготвяне на продукта. Влагането на всички продукти при еднофазен метод на замесване също играе важна роля при времето, което е необходимо.

dry components – this plays an important role in the baking time of the finished assortment, which is reduced from 12 to 5 minutes.

This saves electricity, as well as time to prepare the product. The incorporation of all products in a single-phase incubation method also plays an important role in the time it takes.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Химичният състав на използваните брашна е отразен на Таблица 1.

RESULTS AND DISCUSSION

The chemical composition of the flours used is shown in Table 1.

Таблица 1. Физико- химичен състав на брашната
Table 1. Physico-chemical composition of flours

Вид проба Type of flours	Влага Moisture % (x±sd)	Киселинност Acid °H (x±sd)	Мазнини Fat % (x±sd)	Протеини Proteins % (x±sd)	Влакнини Fibers % (x±sd)	Пепел Ash % (x±sd)	Глутен Gluten mg/kg (x±sd)	БЕВ Carbohydrates % (x±sd)	Енергия kcal/100 g продукт Energy kcal/100 g product
Оризово брашно Rice flour	11.90±0.02	0.6±0.01	0.92±0.01	6.72±0.02	1.40±0.01	1.00±0.02	14.5±0.05	78.06±0.02	359
Бадемово брашно Almond flour	4.04±0.01	1.5±0.01	51.40±0.02	21.20±0.02	11.15±0.01	3.23±0.02	11.2±0.05	8.98±0.01	614

Протеиновото съдържание в бадемовото брашно е 21,20%, а в оризовото е 6,72%. Мазнините в бадемовото брашно са 51,40%, а с по-ниско съдържание са в оризовото брашно – 0,92%. По-висока влага е установена в оризовото брашно (11,90%), а респективно с по-ниска влага е бадемовото брашно (4,04%). С по-висока киселинност е бадемовото брашно (1,5°H), а с по-ниска е оризовото брашно (0,6°H). По отношение на влакнините с по-високо съдържание е бадемовото брашно (11,15%), а с по-ниско съдържание е оризовото брашно (1,40%). Безазотните екстрактни вещества са с по-високо съдържание в оризовото брашно (78,06%), а с по-ниско съдържание в бадемовото брашно (8,98%).

The proteins with higher content, almond meal (21.20%) and lower content of rice flour (6.72%). The higher fat content, the almond meal (51.40%) and the lower flour content (0.92%). In terms of moisture with higher moisture, the rice flour (11.90%) and, respectively, with lower moisture is the almond meal (4.04%). In terms of acidity with higher acidity, almond meal (1.5 ° H) and lower rice flour (0,6 ° H).

In terms of fibers with higher content, almond meal (11.15%) and lower content of rice flour (1.40%). With regard to the non-insulating extracts with higher content of rice flour (78.06%) and with lower content of almond meal (8.98%).

Таблица 2. Съдържание на макро- и микроелементи в брашната
Table 2. Macro- and trace elements content in flours

Видове брашна Type of flours	Макроелементи, mg/kg ОС Macro elements, mg/kg					Микроелементи, mg/kg ОС Trace elements, mg/kg			
	Ca	K	Mg	Na	Co	Cu	Fe	Mn	Zn
Оризово Rice flour	114.25	2743.30	400.67	2.46	9.63	5.18	76.77	111.45	70.37
Бадемово Almond flour	275.49	6174.95	2954.66	543.21	7.09	12.93	57.32	28.04	56.61

Макроелементите Ca, Mg, Na и K са с по-високо съдържание е бадемовото брашно, а респективно с по-ниско съдържание в оризовото брашно. Микроелементите Mn и Zn са с по-високо съдържание в оризовото брашно, а с по-ниско съдържание в бадемовото брашно.

With regard to the macroelements Ca, Mg, Na and K with higher content of almond flour, and respectively with lower content of rice flour. With regard to the Mn and Zn micronutrients, the rice content of the flour is higher and the lower the content of almond flour.

Обогатен продукт на протеини и мазнини – линцер „СПИРУЛИНА“

Enriched product of proteins and fats – lincer "SPIRULINA"

Таблица 3. Рецептура на тестото
Table 3. Dough formulation

основни суровини / basic raw material	структурообразуващи елементи / structuring elements
оризово брашно rice / flour - 40% бадемово брашно / almond meal -15% царевично нишесте / corn starch - 5% бакпулвер / baculus - 0.5% ванилия / vanilla - 0.5% готварска сол / salt - 0.5% краве масло cow butter - 28% Spirulina Platensis (30 % фикоцеанин)- 5% Spirulina Platensis (30% phycoceanin) -5% лиофилизиран плод банан - 5% lyophilized fruit banana - 5%	Гума гуар / Guar gum 0.5%

Технологична подготовка

Направена е предварителна подготовка като хидроколоида се залива с 30 ml вода с температура 38 ^{0}C, престоява 10 минути за да хидратира. Замесва се маслено линцер тесто от брашната и останалите компоненти по еднофазния метод на замесване. Готовото тесто е с по-голяма пластичност. Вложения химичен набухвател (бакпулвер) увеличава шупливостта на тестото. То се разточва с точилка с дебелина 4-5 mm и престоява 1 час в хладилник за втвърдяване на маслото. Формира се на топчета и се приготвя във намазнени със слънчогледово олио форми за изпичане. Тъй като тестото е безглутеново и се разлива

Technological preparation

Preconditioning was done by pouring the hydrocolloid with 30 ml of water at 38 ° C, staying 10 minutes to hydrate. Mix the oil dill paste from the flour and other ingredients by the single-step blending method.

The finished dough is more plastic. The spent chemical baking agent (baking powder) increases the dough's porosity. It is rolled with a 4-5 mm thick grinder and stays for 1 hour in a refrigerator to cure the oil. It is formed into balls and is prepared in sunflower oil-soaked baking molds.

Since the dough is gluten-free and spills

при изпичане се налага употребата на форми.

Изпичането е проведено за 5 минути при 180 ºC. Теглото на един линцер е средно 5,83g.

Направен е микробиологичен анализ, при което е установено, че липсват плесени. Срокът на годност е 3 месеца.

Външен вид и характеристика на продукта

during baking, the use of molds is necessary.

The roasting is carried out for 5 minutes at 180 °C. The weight of a lincer is 5.83g on average.

A microbiological analysis has been carried out, showing that no mold is found. The shelf life is 3 months.

Appearance and characteristic of the product

Фиг. 1. Външен вид на продукта
Fig. 1. Appearance of the product

Готовият продукт е с правилна кръгла форма и добре изпечен. Характеризира се с високата си ронливост поради съдържанието на много захари и мазнини, ниското съдържание на влага и особеностите в провеждането на технологичния процес. Той се характеризира със сладък вкус и аромат, характерен за вложените суровини. Цветът на тестото двуцветен – в кремав и тъмно зелен цвят, които е характерен за вложеното количество сух концентрат Spirulina Platensis.

The finished product has the right round shape and is well baked. It is characterized by its high friability due to the content of many sugars and fats, the low moisture content and the peculiarities of the technological process. It is characterized by a sweet taste and aroma, characteristic of the input raw materials. The color of the dough is two-color – in cream and dark green color, which is characteristic of the amount of Spirulina Platensis dry concentrate.

Таблица 4. Физико-химичен състав на готовия продукт линцер „СПИРУЛИНА“
Table 4. Physico-chemical composition of lincer „SPIRULINA“

Вид проба sample type	Киселинност Acid ◦H (x±sd)	Влага Moisture% (x±sd)	Протеини Proteins % (x±sd)	Мазнини Fat % (x±sd)	Пепел Ash % (x±sd)	Влакнини Fibers % (x±sd)	БЕВ, Carbohydrates % (x±sd)	Енергия kcal/100 g продукт Energy kcal/100 g product
Линцер lincer	3.0±0.01	4.35±0.02	9.09±0.02	28.64±0.02	2.14±0.02	12.79±0.02	43.04±0.02	500

Протеините в продукта са 9,09%. Количеството на вложените мазнини (28,64%) повишава пластичността на тестото и му придава необходимата ронливост. Енергийната стойност (500 kcal/100 g продукт) е висока на база високото съдържание на мазнините (28,64%) и безазотните екстрактни вещества (43,04%). Влагата е сравнително ниска (4,35%), тъй като вложените суровини в замесването на тестото са сухи компоненти с ниска влажност – това играе важна роля при времето за изпичане на готовия асортимент, което е намалено от 12 на 5 минути. Това спестява електрическа енергия , както и време за приготвяне на продукта. Влагането на всички продукти при еднофазен метод на замесване също играе важна роля при времето, което е необходимо. То намалява значително (5 минути), за разлика от други технологии за приготвяне на асортименти от линцер тесто (15 минути). Удължен е срокът на годност, които е 3 месеца, за разлика на този при традиционната технология – 2 месеца.

The proteins in the product is 9.09%. The amount of fat input (28.64%) increases the doughiness of the dough and gives it the necessary friability. The energy value (500 kcal/100 g product) is high based on the high fat content (28.64%) and the non-nitrogenous extracts (43.04%).

The moisture content is relatively low (4.35%), as the raw materials involved in the dough are damp dry components – this plays an important role in the baking time of the finished assortment, which is reduced from 12 to 5 minutes. This saves electricity, as well as time to prepare the product. The incorporation of all products in a single-phase incubation method also plays an important role in the time it takes.

It decreases considerably (5 minutes), unlike other technologies for making a mix of dough paste (15 minutes). The expiration date is 3 months, as opposed to traditional technology - 2 months.

Таблица 5. Влага на линцер 1-я, 2-я, 3-я месец
Table 5. Moisture analysis of lincer 1, 2, 3 month

Вид проба Sample type	Влага, Moisture % (x±sd) 1 месец 1month	Влага, Moisture % (x±sd) 2 месец 2 month	Влага Moisture % (x±sd) 3 месец 3 month
линцер „СПИРУЛИНА“ lincer „SPIRULINA“	4.35±0.02	3.41±0.02	3.03±0.02

Таблица 6. Микробиологичен анализ на линцер
Table 6. Microbiological analysis of lincer

Вид проба Sample type	Изпитван показател Test item	Методи Metods	Единица на величината Unit of magnitude	Резултати от изпитването Results of the test	Условия на изпитването Conditions of examination
линцер „СПИРУЛИНА“ lincer „SPIRULINA“	плесени molds	БДС ISO 21527-2:2011	cfu/g	Не се установяват They are not established	Т◦ инк=25±1˚C

Направен е микробиологичен анализ на готовото изделие, при което е установено, че липсват плесени.

С иновативната технология срока на годност е удължен на 3 месеца, за разлика от този при традиционната технология, който е 2 месеца.

Was made a microbiological analysis of the product, no was found molds.

With innovative technology, the expiration date is extended to 3 months, as opposed to traditional technology, which is 2 months.

ИЗВОДИ

Иновативният продукт линцер „СПИРУЛИНА“ е безглутенов, без ГМО, без консерванти и без изкуствени оцветители, обогатен на фикоцеанин, ω-3 и ω-6 мастни киселини, витамини Е, В1, В6, В12, В17, микро- и макроелементи, аминокиселини, протеини и мазнини. Продуктът е със значими ползи за здравето, както и без странични ефекти. Намира приложение при производството в сладкарската промишленост. Този продукт въздейства положително върху имунната, отделителната и кръвоносната системи в човешкия организъм.

CONCLUSIONS

The innovative "SPIRULINA" lincer product is gluten-free, GMO-free, preservative-free and non-artificial coloring agents enriched in phycoceanin, ω-3 and omega-6 fatty acids, vitamins E, B1, B6, proteins and fats.

The product has significant health benefits as well as no side effects. It is used in the confectionery industry. This product has a positive effect on the immune, secretory and circulatory systems of the human body.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Antonova, N. and M. Mangova**, 2003. Grain Biochemical Characterization of Mina Naked Oat. In: 10th Yugoslav Congress of Nutrition. Belgrade, 16-19 October. Journal "Zito-Hleb / Cereal-Bread". Novi sad. Serbia. Vol.30, 2, 65-69.

2. **Asp Nils G, C. G. Johansson, H. Hallmer and M. Siljestroem**, 1983. Rapid enzymic assay of insoluble and soluble dietary fiber. *J. Agric. Food Chem.*, 31 (3), 476-482.

3. **Atanasova, E. and V. Popova**, 1977. A Guide on Bread Production. Technika, Sofia, 3pp. 51(Bg).

4. **Ayalew, A., H. Fehrmann, J. Lepschy, R. Beck and D. Abate**, 2006. Natural Occurrence of Mycotoxins in Staple Cereals from Ethiopia. *Mycopathologia*, 162, 57-63.

5. **Genadiev, A., D. Kalcheva, N. Nenchev, D. Tevekelev and N. Chavdarov**, 1968. Analysis of Food Products. Sofia, Technika (Bg).

6. **Grishin, A. and Ekinina L.**, 1974. Influence of Different Methods in the Preparation of Quality Bread. Food Industry, pp. 111 (Ru).

7. **Haralampiev, D., A. Chepisheva, M. Minchev and G. Velev**, 1970. Paper on Bread Production, Sofia, Technika (Bg).
8. **Karadzhov, G., R. Vasileva and M. Nikolova**, 2007. Technology of Bread, Bakery and Confectionery. Sofia, Matcom Ltd (Bg).
9. **Kazakov, E. D. and W. L. Kretovic**, 1980. Biochemistry of Zeros and Product Ego Treatments, Colos(Ru).
10. **Kozmina, G. P.**, 1971. Biochemical baking (Bg).
11. **Krachanova, M.**, 2000. Functional Foods. In: Scientific Conference with International Participation "Food and Quality of Life 2000", vol. XLIV, 7-9 Leninger A., 1985. The basics of Biochemistry, Mir, Moscow, pp. 725 (Ru).
12. **Mihalkova, N., S. Ivanova, I. Borissova, G. Marinova and V. Bachvarov**, 2015. Bread and biscuits of one-grain spelled. *Agriculture plus*, № 9/10, 29-32.
13. **Ostrovski, A.I.**, 1959. General Technology Bakery Products. Pishtepromizdat (Ru).
14. **Radoev, A.**, 1962. Handbook for Laboratory Biochemistry of Grain and Grain Products. Plovdiv (Bg).
15. **Vangelov, A.**, 1999. Raw Materials for Production of Bread, Bakery and Confectionery Products. Sofia, Matcom, pp. 199 (Bg).