Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2017, 20 (1), 227-250 ISSN 1311-0489 (Print)
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan ISSN 2367-8364 (Online)

Предимства на микоризните гъби *Glomus* spp. за усвояване на хранителни вещества, биоконтрол и микробна екология при лозата

Иван Цветков[1]*, Лилия Георгиева[1], Деница Цветкова[3], Виктория Михайлова[4], Диян Георгиев[2]

[1]Агробиоинститут Агробиоинститут, бул. Драган Цанков 8, 1164 София, България
[2]Институт по планинско животновъдство и земеделие, ул. Васил Левски 281, 5600 Троян, България
[3]Лесотехнически университет, бул. Климент Охридски 10, 1756 София, България
[4]Химикотехнологичен и металургичен университет, бул. Климент Охридски 8, 1756 София, България
**E-mail: ivantsvetkov@abi.bg*

Benefits of the micorrhizal fungi Glomus spp. for grapevine nutrient uptake, biocontrol and microbial ecology

Ivan Tsvetkov[1]*, Liliya Georgieva[1], Denitsa Tsvetkova[3], Victoria Michailova[4], Diyan Georgiev[2]

[1]Agrobioinstitute, 8 Dragan Tsankov Blvd., 1164 Sofia, Bulgaria
[2]Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, 281 Vasil Levski Str., 5600 Troyan, Bulgaria
[3]University of Forest, 10 Kliment Ohridski Blvd., 1756 Sofia, Bulgaria
[4]University of Chemical Technology and Metallurgy, 8 Kliment Ohridski Blvd., 1756 Sofia, Bulgaria

РЕЗЮМЕ

Glomus spp. е най-големият род от арбускуларните микоризни гъби (АМ). Всички видове от този род имат способности да формират симбиотични отношения с корените на растенията. В зависимост от плътността, тази симбиоза може да има значителен принос за растежа и усвояването на хранителни вещества при растенията. Основният ефект на *Glomus* spp. при храненето е резултат от хифалното транспортиране на неподвижни минерални йони. Това е важно предимство, особено за бавно дифундиращи минерални йони като

SUMMARY

Glomus spp. is the largest genus of the arbuscular mycorrhizal fungi (AM). All of the species of this genus has abilities to form symbiotic relationships with plant roots. Depends of the density, this symbiosis could makes a significant contribution to the plant growth and nutrient uptake. The major effect of *Glomus* spp. on the nutrition is result from the hyphal transport of immobile mineral ions. It is important advantage especially for the slowly diffusing mineral ions such as phosphorus. The AM mycorrhizal fungi фосфор. АМ микоризните гъби *Glomus* spp. имат способността да подобряват устойчивостта на корените към атака от патогени, също и положителен принос към почвената структура и стабилност. Прилагане на практики, които благоприятстват размножаването им, може да бъде важен аспект при управлението на лозарството. Изследванията в този преглед представят механизма на симбиоза и полезните ефекти на микоризните гъби *Glomus* spp. върху растежа, усвояването на хранителните вещества, толерантността към болести, почвеното плодородие и микробна екология при лозата

Ключови думи: лоза, арбускуларни микоризни гъби, *Glomus* spp., усвояване на хранителните вещества, биоконтрол, микробна екология

Glomus spp. has the ability to improve the root resistance to attack by pathogens, also to contribute positively to the soil structure and stability. Implementation of practices that favors their multiplication could be important aspect of viticulture management.

The studies in this review presented the mechanism of symbiosis and the beneficial effects of mycorrhizal fungi *Glomus* spp. on the grapevine growth, nutrient uptake, disease tolerance, soil fertility and microbial ecology.

Key words: grapevine, arbuscular mycorrhizal fungi, Glomus spp., nutrient uptake, biocontrol, microbial ecology

УВОД

Арбкускуларната микокриза (АМ) е симбиотична връзка между растение и гъби, при която гъбните хифи проникват в клетките на корените на висши растения. Тази асоциация е известна също като везикуло-арбускуларна микокриза (VAM), поради образуването на везикули (мехуровидни структури) и арбускули (разклонени хифи) след колонизиране на кореновите клетки. Арбускуларната микокриза е най-честият вид симбиозна асоциация. Предполага се, че до 90% от световните растителни видове имат способността да образуват микоризни взаимоотношения (Bonfante and Genre, 2010).Този тип асоциация увеличава абсорбционната повърхност на корена и носи ползи от растението по отношение на усвояването на вода и хранителни вещества (Sylvia et al., 2005; Smith and Read, 2008), и осигурява защита от биотични и абиотични стресови фактори (Zhang et al., 2010; Yang et al., 2014). Гъбните хифи са доста по-тънки в сравнение с корените на растенията и лесно достигат дори до ограничени пространства в почвата. Растенията им осигуряват захари (въглероден източник), синтезирани чрез фотосинтеза (Allen et al., 2003). АМ носи значителни ползи и за околната среда, тъй като води до подобряване устойчивостта на екосисте-

INTRODUCTION

Arbuscular mycorrhiza (AM) is a symbiotic association between plant and fungi, in which the fungus hyphae penetrate into the cells of the roots of a vascular plants. This association is also known as vesicular-arbuscular mycorrhiza (VAM) due to the formation of vesicles (bladder-like structures) and arbuscules (branched hyphae) after colonization of root cells. Arbuscular mycorrhiza is the most common type of symbiotic association. It is assumed that up to 90% of the world's plant species have the ability to form a mycorrhizal relationship (Bonfante and Genre, 2010). This type of association increases the absorption surface area of the root and brings benefits of the plant in terms of water and nutrients (Sylvia et al., 2005; Smith and Read, 2008), and provides protection from biotic and abiotic stress factors (Zhang et al., 2010; Yang et al., 2014). Fungal hyphae are much thinner than plant roots and easily reach even limited surfaces in soil. The plants provide it sugars (carbon source) synthesized by photosynthesis (Allen et al., 2003). AM also brings significant environmental benefits as it leads to the improvement of ecosystem sustainability, maintenance and мите, поддържане и подобряване на структурата на почвата и др.(Wu, 2017).

Европейската лоза (*Vitis vinifera* L.), е една от най-важните от икономическа гледна точка култури в света, с широко разпространено отглеждане и висока търговска стойност (Vivier and Pretorius, 2002; Balestrini, 2010)

Растенията в лозовите насаждения се повлияват положително от съдържанието на почвени арбускуларни микоризни гъби (АМГ) (Deal et al., 1971; Menge et al., 1983; Nappi et al., 1985; Cheng and Baumgartner, 2004; Oehl et al., 2009). Най-често срещаните видове АМГ използвани в лозарството са Glomus intaradices, Glomus macrocarpum, Glomus mosseae и Paraglomus occultum (Menge et al., 1983; Karagiannidis et al., 1997; Cheng and Baumgartner, 2004, Oehl et al., 2005).

Биология и екология на арбускуларните микоризни гъби от р. *Glomus* .

Характеристика и систематика

Glomus spp. е най-големият род арбускуларни микоризни гъби (АМГ), принадлежащ към клас *Glomeromycetes*, отдел *Glomeromycota* (Tulasne and Tulasne, 1844.). До момента са описани 85 вида, като всички образуват симбиотични връзки с растителни корени (Kirk et al., 2008)

Видовете от род *Glomus* са облигатни биотрофи, зависещи от тяхната микоризна асоциация с растителни корени, за да завършат своя жизнен цикъл и да произведат следващото поколение спори (Фигура 1). Спорите са способни да покълнат и без наличието на гостоприемник, но първичните хифи реагират на кореновите ексудати (напр. Стриголактони), които са в състояние да индуцират пресимбиотичен растеж на АМГ спори (Tamasloukht et al., 2003; Akiyama and Hayashi, 2006; Bücking et al., 2008; Bücking et al., 2012). Те не могат да бъдат култивирани в лабораторни усло-вия без наличие на растение гостоприем-ник. АМГ *Glomus* spp. се намират в почти всички сухоземни местообитания, включително обработваеми земи, пустини, ливади, тропически гори и тундри (Bidartondo et al., 2002).

improvement of the soil structure, etc. (Wu, 2017).

European grapevine (*Vitis vinifera* L.) is one of the most economically important crops in the world, with widespread cultivation and high commercial value (Vivier and Pretorius, 2002; Balestrini, 2010).

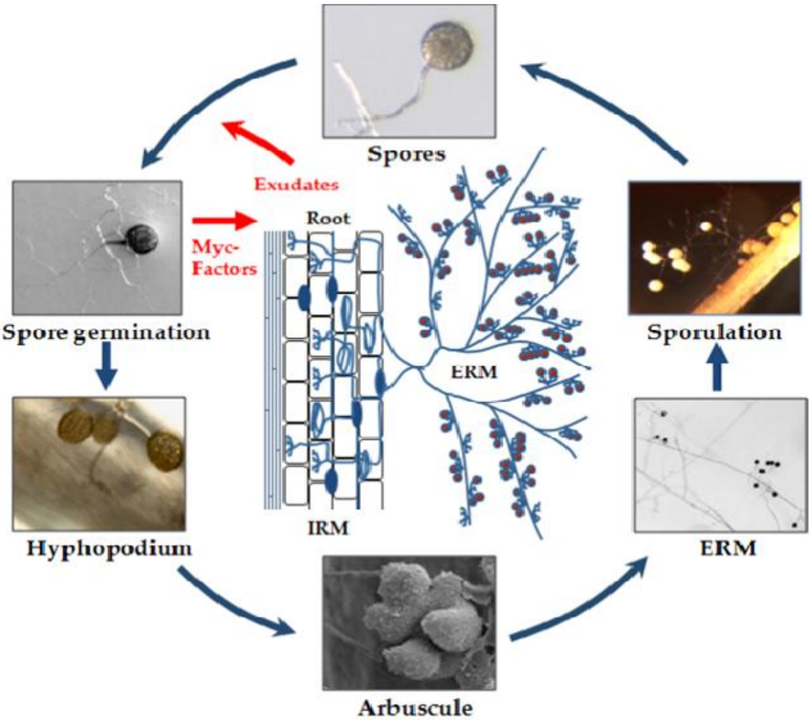
Plants in the vineyards are positively influenced by the soil arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) (Deal et al., 1971; Menge et al., 1983; Nappi et al., 1985; Cheng and Baumgartner, 2004; Oehl et al., 2009). The most common AMF species reported from vineyard soils have been *Glomus intraradices, Glomus macrocarpum, Glomus mosseae* and *Paraglomus occultum* (Menge et al., 1983; Karagiannidis et al., 1997; Cheng and Baumgartner, 2004; Oehl et al., 2005).

Biology and ecology of the arbuscular mycorrhizal fungi from the Glomus spp.

Characteristics and systematics

Glomus spp. is the largest genus of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) belonging to the *Glomeromycetes* class, division *Glomeromycota* (Tulasne and Tulasne, 1844). Up to now, 85 species have been described, and all of them forms symbiotic relationships with plant roots (Kirk et al., 2008)

Glomus species are obligate biotrophs, dependended on their mycorrhizal association with plant roots to complete their life cycle and produce the next generation of spores (Figure 1). Spores are able to germinate without the presence of a host, but germination tube respond to root exudates (eg, strigolactones) that are capable of inducing pre-symbiotic growth of AM spores (Tamasloukht et al., 2003; Akiyama and Hayashi, 2006; Bücking et al., 2008; Bücking et al., 2012). They cannot be cultured in laboratory conditions without the presence of a host plant. AMF *Glomus* spp. are found in almost all terrestrial habitats, including arable land, deserts, grasslands, tropical forests, and tundras (Bidartondo et al., 2002).



Фиг.1. Жизнен цикъл и развитие на Glomus spp.
Fig.1. Life cycle and stage of development of Glomus spp. (Bücking et al., 2012).

Glomus spp. трябва да се отглеждат заедно с жива растителност за да предоставят материал за научни цели, практически приложения и таксономично изследване. Микоризните гъби обикновено се размножават, като се използват "саксийни култури", където инокулираното растение се отглежда в песъчлива почва, с ниски съдържание на фосфор. Тези гъби също могат да се отглеждат с помощта на аеропоника или коренно-органни култури (Jarstfer and Sylvia 1993). Най-често се използват спори, изолирани от почва (Jarstfer and Sylvia, 1993; Beveret al., 1996; Brundrett et al., 1996). Почвените проби често съдържат спори и на други видове (An et al., 1990; Watson and Millner, 1996; Koske et al., 1997; Brundrett et al., 1999). По този начин почвените гъбни изолати представляват смес от гъби, динамично променяща се във времето. Производството на живи култури от АМ гъби е скъпо, трудоемко и отнема много време, което в известна степен ограничава изследванията и

Glomus spp. must be grown in association with living plants to provide material for scientific purposes, practical applications, and taxonomic research. Mycorrhizal fungi are usually propagated using “pot cultures” where the inoculated plant is grown in sandy soil with a low level phosphorus content. These fungi can also be grown using aeroponics or root-organ cultures (Jarstfer and Sylvia, 1993). Spores isolated from soil are most commonly used (Jarstfer and Sylvia, 1993; Bever et al., 1996; Brundrett et al., 1996). Soil samples often contain spores of other species (An et al., 1990; Watson and Millner, 1996; Koske et al., 1997; Brundrett et al., 1999). Thus, soil fungal isolates are a mixture of fungi, dynamically changing over time. Production of living cultures of AM fungi is difficult and time consuming, and consequently, is the main factor limiting research activities and practical applications with these fungi (Dighton et практическите приложения на тези гъби (Dighton et al., 2005). Микоризните гъби се разпространяват обикновено концентрирано на повърхностните слоеве на почвата, но могат да се появят и на по-големи дълбочини (до 4 m) в безводни екосистеми (Virginia et al., 1986; Zajicek et al., 1986). Гъбата трябва да бъде активна, когато се появява растежна дейност на на корена, тъй като корените имат ограничен период на възприемчивост към колонизиране (Hepper, 1985; Brundrett and Kendrick 1990; Dighton et al., 2005).

Жизнен цикъл и механизъм на симбиоза с растителните корени

Счита се, че видовете *Glomus* се размножават основно по безполов начин, въпреки, ча са открити доказателства за наличие на гени свързани с мейозата (Halary et al., 2011; Halary et al., 2013). Спорите се произвеждат на върховете на хифите, както в корена на гостоприемника в почвата, така и извън него. Предполага се, че са хламидоспори. Тези спори покълват и първичната хифа, която се обазува, расте през почвата, докато не влезе в контакт с корените (Фигура 1 и 2).

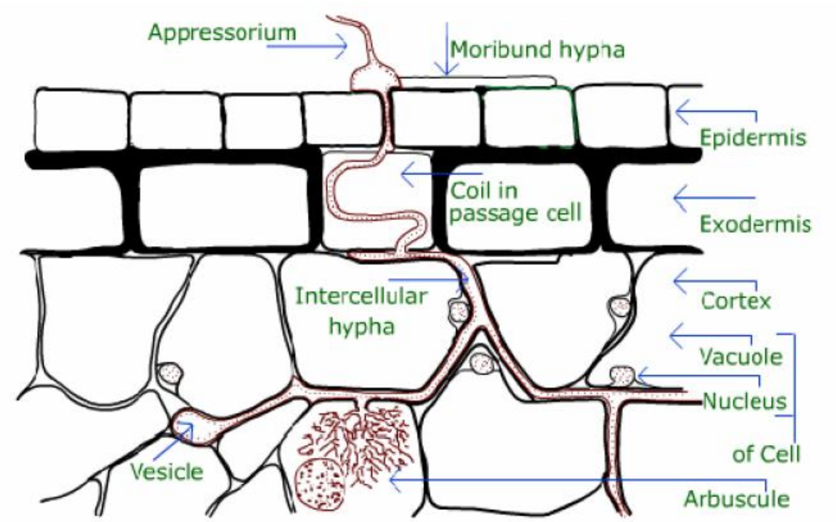
al., 2005). Mycorrhizal fungi spread usually concentrated on the surface layers of the soil but may occur at greater depths (up to 4 m) in arid ecosystems (Virginia et al., 1986; Zajicek et al., 1986).

Fungi must be active when root growth activity occurs, since roots have a limited period of susceptibility to colonization (Brundrett and Kendrick, 1990; Hepper, 1985; Dighton et al., 2005).

Life cycle and mechanism of symbiosis with plant roots

Glomus species were considered to be propagated mainly asexual, although evidence of the presence of genes associated with meiosis (Halary et al., 2011; Halary et al., 2013).

Spores are produced at the tips of hyphae either within the host root or outside the root in the soil. Thought to be chlamydospores. These spores germinate and the germination tube that is produced grows through the soil until it encounters the roots (Figure 1 and 2).

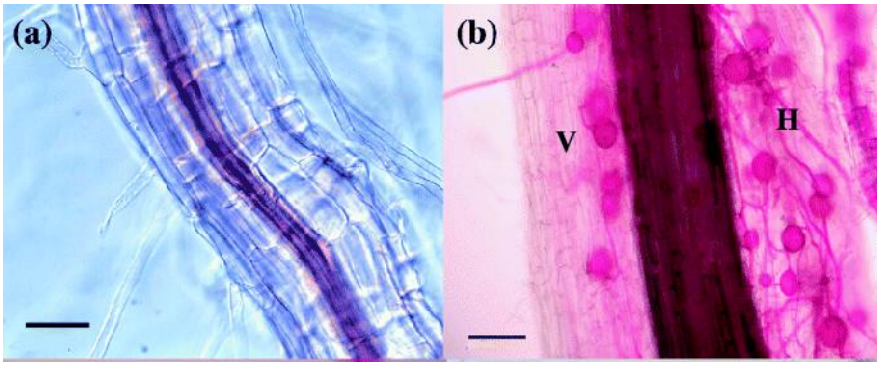


Фиг. 2. Схема на типична арбускуларна микориза, показваща клетките на корена и проникването на гъбите и техните структури.
Fig. 2. Diagram of a typical colony of an arbuscular mycorrhiza showing the root and penetration by the fungus and their structures (http://bugs.bio.usyd.edu.au)

На повърхността на корена на гостоприемника, АМ гъби формират специфичен апресорий (*appressorium*) – хифоподиум (*hyphopodium*). Гъбни хифи, възникващи от него, проникват в корена през епидермалните клетки (epidermis) към сърцевината (*cortex*). В кортекса хифите навлизат в апопластите и растат странично по оста на корена и проникват във вътрешните коренови клетки като образуват разклонени структури от хифи-арбускули (*arbuscule*). които служат като места за обмен на хранителни вещества с растението. Арбукулите се образуват вътре в растителните клетки, но са заобиколени от нагънатa клетъчна мембрана периарбускулна мембрана (PAM), така, че остават в апопластите, без да навлизат в симпластите. Някои видове *Glomus* също образуват везикули (*vesicle*) – органи за съхранение в апо-пластите на кореновите клетки (Фигура 3).

On the host root surface, AM fungi form a specific appressorium – hyphopodium. Fungal hyphae that occur from it penetrate into the root through the epidermis to the cortex. In the cortex, the hyphae enter into apoplasts and grow laterally along the root axis and penetrate the inner root cells to form branched arbuscule structures, wich serve as places for the exchange of nutrients with the plant.

Arbuscules are formed inside the plant cells but they are surrounded by the folded cell membrane periarbuscular membrane (PAM) and remain in the apoplasts, without penetrating into the symplasts. Some species of *Glomus* also form vesicle – organs for storage of the root cells in the apoplasts (Figure 3).



Фиг. 3. Корени от *Ammophila arenaria*, оцветени с кисел фуксин за откриване на инфекции от арбускуларни микоризни гъби (АМГ). (a) Неинфектиран корен; (b) АМГ колонизация (V, везикули; H, хифи); Бар, 100 µm (de la Peña et al., 2006)

Fig. 3. Ammophila arenaria roots stained with acid fuchsin to detect infection by arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and nematodes. (a) Uninfected root; (b) AMF colonization (V, vesicles; H, hyphae); Bar, 100 µm (de la Peña et al., 2006)

Мицелът, който се образува в корена, интрарадиалният мицел (IRM) се различава морфологично и функционално от екстрарадиалния мицел (ERM), мицел, който се развива в почвата. ERM абсорбира хранителни вещества от почвата и ги предава на корена на гостоприемника. IRM, от друга страна, освобождава хранителните вещества в междинния апо-

The mycelium that is formed within the root, the intraradical mycelium (IRM) differs morphologically and functionally from the extraradical mycelium (ERM), the mycelium that grows into the soil. The ERM absorbs nutrients from the soil and transfers these nutrients to the host root. The IRM on the other hand releases nutrients into the interfacial apoplast and пласт и приема въглероден източник (захари) от растението. Гъбата използва тези въглеродни ресурси за поддържане и разширяване на ERM, за клетъчен метаболизъм (например процеси на поглъщане, асимилация на азот) и за развитието на спори, които са в състояние да инициират колонизация на други корени (Фигура 2) (Bücking et al., 2012).

Повърхността на спорите на *Glomus spp*. може да бъде гладка (при повечето видове) или различно орнаментирана (например *G. multiforum*, *G. pustulatum*, (Koske et al., 1986; Blaszkowski, 1994; Blaszkowski and Tadych, 1997). Някои видове произвеждат спори с обвивка, съставена от преплетени (*G. motoroni*, *G. fuegianum*), или дихомно разклонени (G. corymbiforme,) хифи (Bentivenga and Hetrick, 1991; Blaszkowski, 1995; Blaszkowski et al., 1998). Повечето видове от рода Glomus произвеждат отделни спори в почвата. Други образуват повече или по-малко компактни агрегати от спори (например *G. minimum*, *G. agregatum*), (Koske, 1985; Blaszkowski, 1991; Blaszkowski et al., 2000), или спорокарпи (например *G. remimioides, G. fuegianum, G. mosseae*), (Almeida and Schenck, 1990; Gerdemann and Trappe, 1994; Blaszkowski et al., 1998), състоящи се от спори и перидиум. Образуването на перидиум може да предшества образуването на спорите или да се разшири заедно с развиващите се спори, напр. в *G. mosseae* и *G. coronatum* (Giovannetti et al., 1991).

Биоразнообразие и взаимодействие в растителната агроекология

АМГ могат да осигурят много предимства за техните растителни гостоприемници, като по-добро усвояване на хранителни вещества, устойчивост на суша и устойчивост на болести. Симбиозата обаче не е взаимна при всички обстоятелства и често може да бъде паразитна, с вреден ефект върху растежа на растенията. Рядко някои растителни видове могат да паразитизират върху гъбите (Bidartondo et al., 2002) Микоризните гъби повлияват кореновия растеж, кореновите ексудати, абсорбцията на хранителни

exchanges them against carbon source (sugars) from the plant. The fungus uses these carbon resources to maintain and expand ERM, for cell metabolism (e. g. uptake processes, nitrogen assimilation), and for the development of spores capable of initiating colonization of other roots (Figure 2) (Bücking et al., 2012).

The surface of spores of *Glomus spp*. may be smooth (in most species) or differently ornamented (e. g., *G. multiforum, G. pustulatum*. (Koske et al., 1986; Blaszkowski, 1994; Blaszkowski and Tadych, 1997) Some species produce spores enveloped in a hyphal mantle consisting of interwoven (e. g., Gl. mortonii, Gl. Fuegianum) or dichotomously branched (*G. corymbiforme*) hyphae (Bentivenga and Hetrick, 1991; Blaszkowski, 1995; Blaszkowski et al., 1998). Most species of the genus Glomus produce spores singly in the soil. Other taxa form more or less compact spore aggregates (e. g., *G. minutum*, *G. aggregatum* (Koske, 1985; Blaszkowski, 1991; Blaszkowski et al., 2000) or sporocarps (e. g., *G. coremioides, G. fuegianum, G. mosseae*) (Almeida and Schenck, 1990; Gerdemann and Trappe, 1994; Blaszkowski et al., 1998) consisting of spores and a peridium. The formation of the peridium may precede the spore origination or the peridium expands together with the developing spores, as e. g. in *G. mosseae* and *G. coronatu*m (Giovannetti et al., 1991).

Biodiversity and interaction in plant agroecology

The arbuscular mycorrhizal fungi could provide many benefits for their plant hosts, such as better nutrient absorption, drought tolerance and disease resistance. However, the symbiosis is not mutualistic in all circumstances and may often be parasitic, with a detrimental effect on plant growth. Rarely, some plant species may parasitize on the fungi (Bidartondo et al., 2002). The mycorrhizal fungi affect root growth, root exudates, nutrient вещества и повлияването на гостоприемника към стресови условия на околната среда като гъбни и нематодни патогени. Все още няма доказателства АМГ да взаимодействат директно с патогените чрез антагонизъм, антибиоза или хищничество. Те по-скоро въздействат индиректно на взаимодействието растение-патоген. Например, установено е, че нематодите поразяват най-често растения с дефицит на минерали като B, N, Fe, Mg, Zn, P. Доказано е, че микоризата подобрява водния транспорт в растенията и намалява уязвимостта към болести, причинени от гъби и нематоди инфектиращи корените. Хистохимичните анализи на микоризирани корени от банан показват повишено натрупване на общ фосфор, микроелементи, аминокиселини, феноли, протеини, неразтворими въглехидрати и нуклеинови киселини в сравнение с немикоризирани корени (Arya and Perelló, 2010; Ravichandra, 2014). Микоризните отношения, установени между корените на растенията и почвените гъби представляват жизненоважен елемент в растителните екосистеми. Все повече експериментални данни предполагат хипотезата, че бактериите, независимо дали са слабо или тясно свързани с микоризните гъби, представляват трети компонент на микоризата. Проучването на микробното биоразнообразие показва, че бактериалните съобщества се повлияват от микоризните гъби. Взаимодействията между АМ гъби и бактериите предполагат както благотворен ефект на гъбите върху развитието на бактериите, така и обратното (De Boer et al., 2005). Интересен пример е *Paenibacillus validus*, който самостоятелно подкрепя растежа и спорулирането на *Glomus intraradices*, независимо от наличието на растението (Hildebrandt et al., 2002; Bonfante and Anca, 2009).

Някои проучвания показват, че обикновено при микоризните мрежи в растителните съобщества има няколко общи гъби (например *Glomus intraradices* и/или *Glomus mosseae*), които се свързват с почти всички растения, присъстващи в определена екосистема, докато други са по-специфични във

absorption, and the host's response to stressful environmental conditions such as fungal and nematode pathogens. There is still no evidence that AMF interact directly with the pathogens through antagonism, antibiotic or predation. Rather, they rely indirectly on plant-pathogen interactions. For example, it has been found that the nematodes most commonly attack plants with deficite in minerals such as B, N, Fe, Mg, Zn, P. Mycorrhiza has been shown to improve water transport in plants and reduce susceptibility to root diseases caused by fungi and nematodes. The histochemical analyzes of banana roots inoculated with mycorrhiza had been shown increased accumulation of total phosphorus, microelements, amino acids, phenols, proteins, insoluble carbohydrates and nucleic acids as compared to non-mycorrhizal roots (Arya and Perelló, 2010; Ravichandra, 2014).

The mycorrhizal relationships established between plant roots and soil fungi are a vital element in plant ecosystems. More and more experimental data suggest the hypothesis that bacteria, whether loosely or tightly associated with mycorrhizal fungi, represent the third component of the mycorrhizas. The study of microbial biodiversity suggests that mycorrhizal fungi influence the bacterial communities. Interactions between AM fungi and the bacteria imply both a beneficial effect of the fungi on bacterial growth and vice versa (De Boer et al., 2005). An interesting example is *Paenibacillus validus*, which supports the growth and sporulation of *Glomus intraradices* independently of the presence of the plant (Hildebrandt et al., 2002; Bonfante and Anca, 2009).

Some studies have shown that commonly in the mycorrhizal networks in plant communities there are several common fungi (e.g., *Glomus intraradices* and/or *Glomus mosseae*) which is associated with almost all plants present in a particular ecosystem, while others взаимодействието с растителните видове, но взаимодействат с основните видове гъби (Öpik et al., 2003; 2006; Verbruggen et al., 2012; Heijden, 2015).

Използването на покривни култури (*cover crops*) в основните насаждения е широкоразпространена практика с положителен ефект върху свойствата на почвата, главно по отношение на съдържание на минерали и органични вещества, воден потенциал, и микробиологични характеристики (Guerra and Steenwerth, 2012; Tsvetkov et al., 2014). Установено е, че покривните култури в лозови насаждения увеличават популациите на локалните АМГ в лозовите корени и в почвата около тях (Baumgartner et al., 2005; Cheng and Baumgartner, 2005*).* Пространственото припокриване на корените на лозите и покривните култури от друга страна води до положителен ефект върху взаимодействията между растенията и микоризните гъби, тъй като се формират общи микоризни мрежи чрез т.нар. „АМГ връзки“ (Leake et al., 2004). Публикувани са научни доказателства за директен пренос на хранителни вещества от покривни култури към лозови растения (Cheng and Baumgartner, 2004). Някои видове покривни култури, могат да бъдат по-ефективни от други по отношение трансфера на хранителни вещества към растенията от АМ гъби. Вероятно това се дължи на акумулирана симбиоза на различни видове АМГ и/или на формираната по-голяма биомаса на корените. Например, азотният трансфер е значително по-голям от тревата *Bromus hordeaceu L. sp. molliformis* към лоза, в сравнение с преноса от бобовото растение, *Medicago polymorpha* L. към лоза.

Приложения и ползи от арбускуларните микоризни гъби *Glomus* spp. в лозарството

Повечето от микоризиращите гъби, използвани в лозарството, са от рода Glomus (Menge et al., 1983; Nappi et al., 1985; Schubert et al., 1988). До момента са докладвани много проучвания, които доказват директни практически ползи от микоризирането на лозови растения с *Glomus spp*. (Таблица 1)

are more specific within plant species interaction, but it is interactre with the fungi common species (Öpik et al., 2003; 2006, Verbruggen et al., 2012; Heijden, 2015).

The use of cover crops in the basic plantations is a widespread practice with a positive effect on soil properties, mainly in terms of mineral and organic content, water potential and microbiological characteristics (Guerra and Steenwerth, 2012; Tsvetkov et al., 2014).

Cover crops in vineyards have been found to increase populations of local AMF in grapevine roots and soil around them (Baumgartner et al., 2005; Cheng and Baumgartner, 2005). Overlap of grapevine and cover crop roots affects positively interactions between the plants and the mycorrhizal fungi, as it’s formed general microbial networks by the so-called "AMF connections" (Leake et al., 2004).

Scientific evidence has been published about the direct transfer of nutrients from cover crops to grapevine plants (Cheng and Baumgartner, 2004). Some species of cover crops could be more effective than others in terms of the nutrients transfer of from the AM fungi to the plants. Probably, it is due to the accumulated symbiosis of different species of AMF and/or to the formation of the larger roots biomass. For example, the nitrogen transfer is significantly larger from the grass *Bromus hordeaceu* L. sp. *molliformis* to the grapevine as compared to the transfer from the legume *Medicago polymorpha* L. to the grapevine.

Applications and benefits of arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus spp*. in viticulture

Most of AM fungi used in viticulture are from genus *Glomus spp*. (Menge et al., 1983; Nappi et al., 1985; Schubert et al., 1988). Up to now, many studies have been reported to prove the direct practical benefits of the mycorrhizations of the grapevine plants with *Glomus spp*. (Table 1).

Таблица1 Предимства на АМГ *Glomus* spp. за лозарството
Table 1. Benefits of AMF *Glomus* spp. for the viticulture

Установени ползи от АМГ *Glomus* spp. за лозарството/ Benefits of AMF *Glomus* spp. for the viticulture	*Glomus spp.*	Източник/ Source
Подобрени морфологични параметри (брой листа, дължина на стъблата и дължина на корена)/ Improved morphological parameters (number of leaves, shoot and root length)	*Glomus fasciculatum, G. mosseae, G. intraradices*	Borde et al., 2009; Belew et al., 2010; Ozdemir et al., 2010
Подобрен прием на азот от органични и неорганични източници/ Enhanced nitrogen uptake from organic and inorganic sources	*Glomus spp.*	Cheng and Baumgartner, 2004; Patrick et al., 2004
Повишаване на толерантността към засоляване на почвите/ Increasing the tolerance to the salt stress	*Glomus spp.*	Belew et al., 2010
Подобрен прием на трудно усвояеми минерали като фосфор (P), желязо (Fe) и мед (Cu) и Zn/ Improved uptake of difficult assimilable minerals such as P, Fe, Cu and Zn.	*Glomus spp. ,G. fasciculatum, G. mosseae , G. intraradices*	Ortas and Rowell, 2004; Borde et al., 2009; Ozdemir et al., 2010
Подобряване на фотосинтезата и повишаване на хлорофилното съдържание в листа/ Improvement of the photosynthesis and increasing of chlorophyll content in the leaves	*Glomus fasciculatum , G. iranicum*	Borde et al., 2009; Nicolas et al., 2015
По-добро развитие и аклиматизация на лозови резници и микроразмножени растения/ Better development and acclimatization of grapevine cuttings and micro-propagated plants	*Glomus spp, G. mossae, G.innaradices, G.agregatum, G.etunicatum*	Kara et al., 2011; Wu, 2017
Подобряване на толерантността към засушаване на почвата, устичната проводимост, нивата на транспирация / Improving the tolerance to soil drought, stomatal conduction, transpiration levels	*G. etunicatum , G. macrocarpum, G. clarum*	Sylvia and Schenck, 1983; van Rooyen et al., 2004;
Намаляване на симптомите на увреждане, причинени от патогенни гъби от родовете *Rhizoctonia, Fusarium, Verticillium, Phytophthora, Pythium u Aphanomyces* / Reducing the symptoms of damage caused by pathogenic fungi of the genera *Rhizoctonia, Fusarium, Verticillium, Phytophthora, Pythium and Aphanomyces*	*Glomus spp.*	Whipps, 2004; Pozo et al., 2009
Намаляването на вредните ефекти, причинени от паразитни нематоди, като *Pratylenchus* и *Meloidogyne*./ Reducing the harmful effects caused by parasitic nematodes such as *Pratylenchus* and *Meloidogyne.*	*Glomus spp., G. versiforme*	de la Peña et al., 2006; Li et al., 2010
Повишаване на устойчивостта към стъблени болести по лозата, причинени от гъби *Cylindrocarpon macrodidymum* и *Ilyonectria spp.*/ Increasing the resistance to grapevine trunk diseases caused by *Cylindrocarpon macrodidymum and Ilyonectria spp.*	*G. intraradices*	Petit and Gubler, 2006.
Повишаване на толерантостта към тежки метали/ Increasing the tolerance to heavy metals	*Glomus geosporum, G. mosseae, G. claroideum*	Sambandan et al. 1992; Weissenhorn et al., 1993

Ефект върху динамиката на растеж

Подобрения растеж на лозовите растения вследствие на микориза е установен от много автори (Schubert et al., 1988; Biricolti et al., 1997; Linderman and Davis, 2001). Borde et al. (2009) съобщават, че инокулирани с *Glomus fasciculatum* лозови растения повишават

Effect on growth dynamics

Many authors (Schubert et al., 1988, Biricolti et al., 1997, Linderman and Davis, 2001) have reported the improved growth of the grapevine plants due to mycorrhiza. Borde et al., (2009) reported that inoculated with *Glomus fasciculatum* grapevine plants significantly increased their growth rates в значителна степен растежните си показатели (отчетени съответно 60 и 120 дни след инокулация) спрямо неинокулирани контролни растения по отношение на брой листа (50,84% и 75,29%), дължина на стъблата (22.91% и 34.88%) и дължина на корена (10.99% и 19.67%). Отделните видове *Glomus* могат да повлияват различно върху органите на лозовите растения. Резултати, докладвани от Ozdemir et al. (2010), показват, че *G. mosseae* имат по-голям ефект върху параметрите на растежа на стъблото (увеличават сухото тегло), докато *G. intraradices* влияе по-скоро върху параметрите на растежа на корена. При оранжерийни условия микоризните видове силно подпомагат растежа на лозови семеначета (Фигура 4). Тази тенденция може да се обясни със стимулиращите ефекти на АМ гъби върху кореновия растеж, дължащи се на подобреното всмукване на хранителни вещества от растението гостоприемник (Wu, 2017). В допълнение, различните видове микориза имат различен растеж под различни субстрати. Семеначета отглеждани в смес от пясък, почва и органично вещество в обем съотношение 6: 3: 1, натрупват по-голямо сухо тегло, в сравнение с тези, отглеждани в смес от почва, пясък и торф в обемно съотношение 3: 1: 1.

(evaluated at 60 and 120 days after inoculation) relative to uninoculated control plants in terms of leaf number (50.84% and 75.29%), shoot length (22.91% and 34.88%) and root length (10.99% and 19.67%).

Different *Glomus* species could influence differently on the grapevine organs. Results reported by Ozdemir et al. (2010) show that *G. mosseae* have a greater effect on stem growth parameters (increase in dry weight), whereas *G. intraradices* has an effect on root growth parameters. In greenhouse conditions, the mycorrhizal species strongly support the growth of grapevine seedlings (Figure 4).

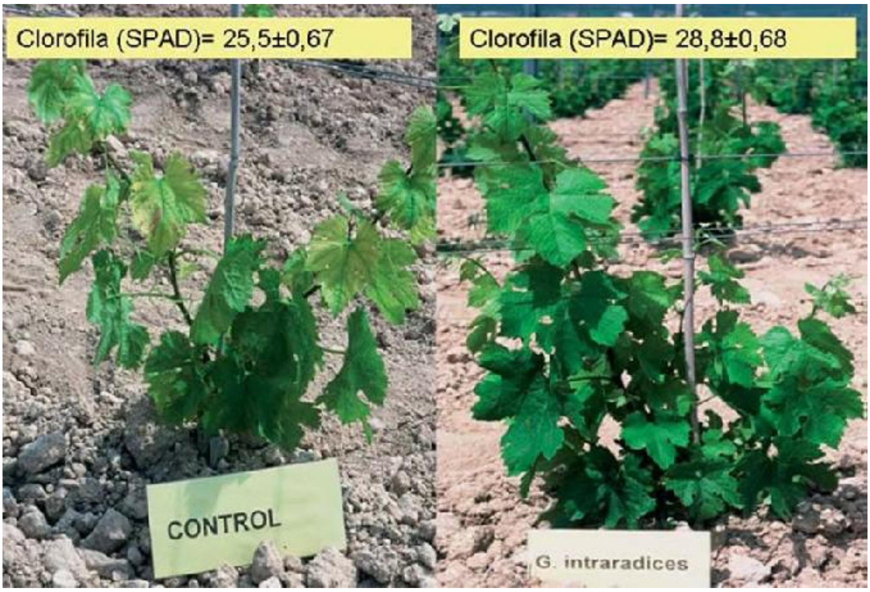
This trend could be explained by the stimulating effects of AMF on root growth due to improved uptake of nutrients from the host plant (Wu, 2017). In addition, different types of mycorrhizae had different growth under different substrates. Seedlings, growing in a mixture of sand, soil and organic matter in ratio of 6: 3: 1 by volume, accumulate a higher dry weight than those growing in a mixture of soil, sand and peat at ratio of 3: 1: 1 by volume.

Фиг. 4. Ефект на различни видове Glomus spp. върху микроразмножени лозови растения (Wu et al., 2017).
Fig. 4. Effects of different mycorrhizae species on micropropagated grapevines

Kara et al. (2011) също съобщават за положителни ефекти от приложението на *Glomus* spp. при вкореняване и развитие на лозови зрели резници. Авторите са използвали два търговски АМ препарата като Mycosym® (*G. intraradices*) и MycoApply® (*G. mossae, G. intraradices, G.agregatum* и *G.etunicatum*), тествани върху млади

Kara et al. (2011) also reported positive effects of *Glomus* spp. application in the rooting stage and development of grapevines mature cuttings. The authors used two commercial AM preparations, such as Mycosym® (*G. intraradices*) and MycoApply® (*G. mossae, G. intraradices, G.agregatum* and *G.etunicatum*), tested растения от различни сортове грозде и подложка 41 В в оранжерийни условия. Отчетено е, че дневната скорост на растеж на микоризирани растения с *G. inaradices* е 60% по-висока от неинокулираните контроли. Във втория етап на експериментите при полеви условия са проследени вегетативни растежни параметри като дължина на леторастите и относително съдържание на хлорофил в листата, където отново микоризираните растения изпреварват значително контролите по отношение на изследваните параметри (Фигура 5).

on young plants of different varieties of grapevines and the rootstock 41B in greenhouse conditions. The daily growth rate of the mycorrhizated with *G. intraradices* plants was reported to be 60% higher than uninoculated controls. In the second stage of the experiments in field conditions, vegetative growth parameters were observed such as shoots length and relative chlorophyll content in the leaves where again the mycorrhizated plants significantly exceed the controls with respect to the tested parameters (Figure 5).



Фиг. 5. Разлики в растежа и хлорофилното съдържание между неиноклулирани лози от сорт Merlot, присаден върху SO4 и микоризирани такива с *Glomus intraradices*. (Nieto et al., 2012).

Fig. 5. Differences in growth and chlorophyll content between non-inoculated varieties of Merlot varieties, grafted on SO4 and mycorrhized ones with *Glomus intraradices*.

Проучвания върху ефекта на микоризната инокулация при неспецифични проблеми на присаждане показват, че тя значително подобрява афинитета и динамиката на растеж на присадените растения (Nieto et al., 2012).

Подобряване на усвояването на хранителни елементи

Много автори докладват за поло-

Studies on the effect of mycorrhizal inoculation on non-specific grafting problems indicate that it significantly improved the affinity and growth dynamics of grafted plants (Nieto et al., 2012).

Improving the absorption of nutrient elements

Many authors report a positive

жително влияние на АМГ *Glomus* spp. върху приемането на хранителни вещества и респективно – върху добива и качеството на гроздето (Bavaresco and Fogher, 1996; Schreiner, 2003; Aguin et al., 2004;, Karagiannidis et al., 2007; Almaliotis et al., 2008).

Изследване на лозови подложки, инокулирани с различни видове *Glomus*, показва, че *G. intraradices* повишава акумулирането на P и Zn в листата, докато при микоризиране с *G. Mossae* – концентрацията на същите елементи се оказва по-висока в стъблата (Ozdemir et al., 2010).

Двугодишно проучване на плододаващи лозя от сорт Кримсон в условия на капково напояване и инокулация с *G. iranicum*, показва, че още през първата година е постигната оптимална колонизацията на корените на експерименталните растения. Отчетени са повишен добив, подобрена ефективност на използване на водата, фотосинтезата, натрупване на на скорбяла и приемане на хранителни вещества, по-специално P, K и Ca. През втората година, положителния ефект от приложените микоризни гъби продължава, но с тенденция към отслабване. Авторите препоръчват периодично на колонизацията на корена проследяване и реинокулиране за устойчиви и ефикасни резултати в дългосрочен план (Nicolas et al., 2015). Установена силна обратна корелация между колонизирането на корена и почвеният фосфор. Лозя с висока микоризна колонизация показват по-голяма концентрация на Mn в листа и листни дръжки, Zn – в листни дръжки и Fe – в листа (Karagiannidis and Nikolaou, 1999).

Арбускуларно микоризните гъби от р. *Glomus* увеличават достъпността на определени основни хранителни елементи от растението-гостоприемник като фосфор (P), желязо (Fe) и мед (Cu), за които се счита, че имат бавна подвижност в почвата (Ortas and Varma, 2007; Schnepf et al., 2008; Borde et al., 2009). Основното предимство за храненето на микоризираните растенията е транспорта на слабоподвижни минерални йони чрез хифите. (Smith and

effect of AMF *Glomus* spp. on the nutrients uptake and respectively on the yield and grape quality (Bavaresco and Fogher, 1996; Schreiner, 2003; Aguin et al., 2004; Karagiannidis et al., 2007; Almaliotis et al., 2008).

A study of grapevine rootstocks, inoculated with different *Glomus* species, showed that *G. intraradices* increase the accumulation of P and Zn mostly in the leaves, while in case of mycorrhization with *G. mossae* - the concentration of the same elements was found to be higher in the stems (Ozdemir et al., 2010).

Two-year study of the fruit-bearing Crimson grapevines varieties vineyards under both drip irrigation conditions and inoculation with *G. iranicum* showed that as early as the first year, optimal colonization of the roots of experimental plants has been achieved. Increased yield, improved water utilization efficiency, photosynthesis, starch accumulation and nutrient uptake, especially P, K and Ca, have been reported. In the second year, the positive effect of applied mycorrhizal fungi continued, but with a weakening tendency.

The authors recommend regular monitoring of root colonization and re-inoculation for long-term sustained and efficient outcomes (Nicolas et al., 2015).

A strong reverse correlation between root colonization and soil phosphorus has been established. Vineyards with high mycorrhizal colonization showed a higher concentration of Mn in leaves and leaf petioles, Zn- in leaf petioles and Fe- in leaves (Karagiannidis and Nikolaou 1999).

Arbuscular mycorrhizal fungi from the genus *Glomus* increased the accessibility of certain essential nutrient elements from the host plant such as phosphorus (P), iron (Fe) and copper (Cu), which are considered to have slow mobility in the soil (Ortas and Varma, 2007; Schnepf et al., 2008; Borde et al., 2009). The main advantage for the feeding of mycorrhizated plants is the transport of slow-moving mineral ions through the hyphae. (Smith and Gianinazzi-Pearson, 1988). Fungal

Gianinazzi-Pearson, 1988). Гъбните хифи поемат и транспортират N към гостоприемниците от неорганични (Johansen et al., 1992; Hodge et al., 1998; Mäder et al., 2000) и органични азотни източници (Hawkins et al., 2000; Aristizabal et al., 2004), с което в значителна степен повишават приема на азот от лозовите растения (Cheng and Baumgartner, 2004; Patrick et al., 2004).

Повишаване на толерантността към воден дефицит

Толерантността към воден дефицит е едно от многото предимства на взаимодействието на лозовите растения с *Glomus* (Nikolaou et al., 2003; Schreiner, 2003; Schreiner and Linderman, 2005; Schreiner, 2007). Три вида *Glomus – G. macrocarpum, G. clarum и G. etunicatum*, проявяват значителна толерантност към засушаване на почвата (Sylvia and Schenck, 1983). В много случаи, спорите на различните видове проявяват различна инфекциозна способност при засушаване, като например *Glomus mosseae* и *G. deserticola* показват по-добра инфекциозност от G. fasciculatum (Wu et al., 2013). Инокулирането на плододаващи лозови растения с *Glomus iranicum* намалява значително последиците от водния стрес, подобрява фотосинтезата и добива, и ускорява узряването на плодовете при десертния сорт "Crimson“(Nicolás et al., 2015; Lisek et al., 2016).

Механизмите на толерантност към засушаване остават все още недостатъчно проучени. Valentine et al. (2006) провеждат експерименти с едногодишни, инокулирани с АМ гъби оранжерийно отглеждани лозови растения, подложени на 4 седмичен период на засушаване. Въпреки, че стресът от суша води до спад в колонизацията на АМ, са отчетени по-високи нива на пролин и биомаса на микоризираните растенията, спрямо контролите в периода на засушаване. Фотосинтетичният отговор на микоризираните растения по време на засушаване е свързан с увеличаване на листната маса, подобрен електронен транспорт и по-висока активност на ензима RuBisCO

hyphae take up and transport N to hosts from inorganic N sources (Johansen et al., 1992; Hodge et al., 1998; Mäder et al., 2000) and organic nitrogen sources (Hawkins et al., 2000; Aristizabal et al., 2004), which significantly increasing the uptake of nitrogen from the grapevine plants (Cheng and Baumgartner, 2004; Patrick et al., 2004).

Increasing tolerance to water deficit

The tolerance to water deficit is one of the many advantages of the interaction of grapevine plants with *Glomus* (Nikolaou et al., 2003; Schreiner, 2003; Schreiner and Linderman, 2005; Schreiner, 2007). Three species of *Glomus- G. macrocarpum, G. clarum* and *G. etunicatum*, showed significant tolerance to soil drought (Sylvia and Schenck 1983). In many cases, spores of different species showing different infectivity under drought conditions, such as *Glomus mosseae* and *G. deserticola* which showed better infectivity than *G. fasciculatum* (Wu et al., 2013). The inoculation of fruit-bearing grapevine plants with *Glomus iranicum* greatly reduces the effects of water stress, improves photosynthesis and yield, and accelerates ripening of the fruit in dessert variety "Crimson“ (Nicolás et al., 2015; Lisek et al., 2016).

The mechanisms of tolerance to drought remain under-explored. Valentine et al. (2006) performed experiments with one-year old, inoculated with AMF grapevine plants, cultivated under greenhouse conditions, exposed to a 4-week drought period. Although, drought stress has led to a decline of the AM colonization, the proline levels and biomass of the mycorrhizated plants were observed higher than the controls during the drought period. The photosynthetic response of the mycorrhizated plants during droughts is linked with increased leaf mass, improved electron transport, and higher activity of the enzyme RuBisCO

(Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase), който е свързан с първата стъпка от въглерод-фиксацията. Тези резултати демонстрират, че микоризираните лозови растения успяват да използват водата по-ефективно по време на водния дефицит. В допълнение, Van Rooyen et al. (2004), установяват, че устичната проводимост, нивата на транспирация и воден потенциал на ксилема на микоризирани с *G. etunicatum* млади лозови растения се увеличават в условия на засушаване.

Повишаване на толерантността към солеви стрес и тежки метали

Belew et al. (2010), установяват подобряване на динамиката растеж и толерантността към солеви стрес при микоризирани с АМГ *G. fasciculatum* 5 лозови подложки в сравнение с контролните растения. Редица автори докладват, че инокулиране с АМГ от р. *Glomus* като *Glomus geosporum* (Sambandan et al., 1992), *Glomus mosseae* (Weissenhorn et al., 1993; Turnau et al., 2001), *Scutellospora dipurpurascens* (Del Val et al., 1999; Wu, 2017) може да повиши значително толерантността на плододаващи лозови растения към почви, замърсени с тежки метали.

Повишаване на толерантността към биотичен стрес

Glomus spp. повишава устойчивостта на растенията към абиотичен и биотичен стрес (Sylvia and Williams, 1992; Hooker and Black, 1995; Pozo et al., 2009). Повечето проучвания върху защитата от заболявания, причинени от почвени фитопатогенни гъби, показват намаляване на честотата на симптомите на увреждане, причинени от родовете *Rhizoctonia, Fusarium, Verticillium, Phytophthora, Pythium и Aphanomyces* при микоризирани растения (Whipps, 2004; Pozo et al., 2009). Petit and Gubler (2006) изследват влиянието на *G. intraradices* върху стъблено гниене, причинена от гъбата *Cylindrocarpon macrodidymum* върху *Vitis rupestris* cv. St. George при контролирани условия. Осем месеца след инокулирането с патогена,

(Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase) that is associated with the first stage of carbon - fixation. These results demonstrated that the mycorrhizated grapevine plants manage to use water more efficiently during the water deficit. In addition, Van Rooyen et al. (2004), found that the stomatal conductance, transpiration levels and water potential of the xylem of *G. etunicatum* mycorrhized young grapevine plants are increasing during drought conditions.

Increasing the tolerance to salt stress and heavy metals

Belew et al. (2010), reported improvements of growth dynamics and salt stress tolerance in 5 grape rootstocks inoculated with AMF *G. fasciculatum* as compared to the control plants. A number of authors reported that inoculation with AMF of genus *Glomus spp*. such as *Glomus geosporum* (Sambandan et al., 1992), *Glomus mosseae* (Weissenhorn et al., 1993; Turnau et al., 2001), *Scutellospora dipurpurascens* (Del Val et al., 1999; Wu, 2017) can significantly increase the tolerance of fertile grapevine plants to soils contaminated with heavy metals.

Increasing the tolerance to biotic stress

Glomus spp. enhances the plant resistance to abiotic and biotic stresses (Sylvia and Williams, 1992; Hooker and Black, 1995; Pozo et al., 2009). The most studies on the protection against diseases caused by soil phytopathogenic fungi showed a reduction of the incidence of damage symptoms, caused by the genera *Rhizoctonia, Fusarium, Verticillium, Phytophthora, Pythium* and *Aphanomyces* in the mycorrhizated plants (Whipps, 2004; Pozo et al., 2009) . Petit and Gubler (2006) investigated on the effect of *G. intraradices* over grape black foot disease caused by the fungus *Cylindrocarpon macrodidymum* on *Vitis rupestris* cv. St. George under controlled conditions. Eight months after the микоризираните растения развиват значително по-малко листни и коренови симптоми, в сравнение с немикоризираните. Резултатите от това изследване предполагат, че приложението на *G. intraradices* преди засаждане могат да помогнат за предотвратяване на болестта стъблено гинене в разсадниците и в лозовите насаждения. Установено е, че лозовите насаждения, инокулирани с *Glomus intraradices* са по-малко податливи към черно стъблено гниене, причинено от *Ilyonectria* spp. (Jones et al., 2014). Често срещано при микоризираните растения е намаляването на вредните ефекти, причинени от паразитни нематоди, като *Pratylenchus* и *Meloidogyne* (de la Peña et al., 2006). Li et al. (2010), докладват, че лозови растения инокулирани с *G. versiforme* на значително повишават толерантността си към ендопаразитните галови фитонематоди от вида *Meloidogyne incognita* (Lisek et al., 2016).

Други предимства на микоризните гъби *Glomus* spp. в лозаро-винарския сектор

Понастоящем, в лозаро-винарския сектор е широко разпространено използването на химически пестициди, които потискат растителните патогени, а растежа на растенията се стимулира от синтетични торове. Тези процедури водят до намаляване на микроорганизмовото биоразнообразие в почвата и се понижава цялостното качество на растенията. Докато толерантността на различните патогени към пестицидите расте, "обедняването" на почвите води до спад в добива и качеството. Една от основните причини е свързана с намаляването на плътността и/или изчезването на естествените почвени микоризни гъби. Те от своя страна са свързани с други полезни почвени микроорганизми, които са известни с повишаване на абсорбиращата повърхност на кореновата система, предизвиквайки подобрение на храненето и растежа на растението като цяло, както и с повишаване на толерантността на растенията спрямо патогени (Schreiner and Bethlenfalvay, 1995). Необходими са нововъведения в

inoculation with the pathogen, mycorrhizated plants developed significantly less leaf and root symptoms than non-mycorrhizated plants. Results from this study suggest that pre-planting applications of *G. intraradices* may help preventing black foot disease in the nursery and in the vineyard. It was found that vineyards inoculated with *Glomus intraradices* were less susceptible to grapevine trunk diseases caused by *Ilyonectria* spp. (Jones et al., 2014).

Reducing of harmful effects caused by parasitic nematodes such as *Pratylenchus* and *Meloidogyne* (de la Peña et al., 2006) is common in mycorrhizated plants.

Li et al. (2010), reported, that grapevines inoculated with *G. versiforme* significantly increased their tolerance to endoparasite root-knot phytonematodes *Meloidogyne incognita* (Lisek et al., 2016).

Other benefits of mycorrhizal fungi Glomus spp. in the wine sector

Currently, the use of chemical pesticides that inhibit plant pathogens is widespread in the wine sector, and the growth of plants is stimulated by synthetic fertilizers. These procedures reduce the microorganism biodiversity in the soil and reduce the overall quality of the plants.

While the tolerance of different pathogens to pesticides is growing, soil degradation leads to a decline in yield and quality. One of the main reasons is to reduce the density and/or disappearance of natural soil mycorrhizal fungi.

They are in turn associated with other useful soil microorganisms known to increase the absorption surface of the root system, causing improved nutrition and growth of the plant as a whole, as well as increasing the tolerance of plants to pathogens (Schreiner and Bethlenfalvay, 1995).

Innovations in plant production are

процеса на растениевъдното производство за да се създадат растения, които са по-толерантни към често срещаните патогени и са по-ефикасни в използването на естествените почвени ресурси (минерални елементи, вида и др.) във всички фази на култивирането от разсад до самото лозе (Tsvetkov et al., 2014). Миналото десетилетие са проведени многобройни проучвания касаещи въздействието и ефектите на органичната спрямо конвенционалната система на почвени микробни динамики (Mäder et al., 2000a; Ryan and Graham, 2002; Purin et al. 2006; Freitas et al., 2011). Резултатите показват, че микоризните гъби допринасят значително за оптималния хранителен статус на младите растения както в разсадникова фаза, така и в лозовите насаждения. Друг важен резултат е биозащитния ефект на арбускуларно-микоризните гъби от от р. *Glomus* срещу почвени гъбни патогени (Vierheiling et al., 2008). Нещо повече, почвените гъбни патогени се смятат за една от основните причини за «изтощаване» на почвата в лозовите масиви и допълнителната микоризна инокулация на лозовите растения е препоръчителна като биотехнологична алтернатива на конвенционалната система за справяне с този проблем (Nogales et al., 2008).

needed to create plants that are more tolerant to common pathogens and are more efficient in using natural soil resources (mineral elements, water, etc.) in all phases from planting material up to the vineyard (Tsvetkov et al., 2014).

In the past decade, numerous studies have been carried out on the impact and effects of the organic against the conventional soil microbial dynamics system (Mäder et al., 2000a; Ryan and Graham, 2002; Purin et al., 2006; Freitas et al., 2011). The results show that mycorrhizal fungi contribute significantly to the optimum nutritional status of young plants both in the nursery phase and in the vineyard. Another important result is the bio-protective effect of the genus *Glomus* against soil fungal pathogens (Vierheiling et al., 2008).

Moreover, soil fungal pathogens are considered to be one of the main causes of soil depletion in vineyards, and the additional mycorrhizal inoculation of vines is recommended as a biotechnological alternative to the conventional system to deal with this problem (Nogales et al., 2008).

ИЗВОДИ

За да се понижат негативните ефекти върху околната среда и да се повиши плодородието на почвите, аграрните политики на Европейско и световно ниво предвиждат да ограничат използването на химични субстанции както за наторяване така и за растителна защита. При контролирана микоризация е възможно значително да се подобри динамиката на растеж на лозите при оранжерийни и полеви условия. Ранното инокулиране на лозови растения в производствена фаза може да допринесе впоследствие за оптималното развитие на тези растения в лозовото насаждение, особено в случаите на недостиг на естествени арбускуларни микоризни гъби и/или когато се установят определени биотични и абиотични стресови условия. Това води

CONCLUSIONS

In order to reduce the negative effects on the environment, and to increase soil fertility, agrarian policies at European and world level envisage limiting the use of chemical substances for both fertilization and plant protection. In controlled mycorrhization, it is possible significantly improve the growth dynamics of grapevines in greenhouse and field conditions. Early inoculation of grapevines in the production phase can subsequently contribute to the optimal development of these plants in the vineyard, especially in the case of deficiency of natural arbuscular mycorrhizal fungi and / or when certain biotic and abiotic stress conditions are established.

до по-малко вложения в химични препарати и при при това качеството и дългосрочните резултати преобладават над интензификацията на производството. Микоризирането трябва да се разглежда като основен фактор за почвеното плодородие и за подобряване на производителността и здравния статус на лозовите растения. Тези ефекти водят до опазване на околната среда, тъй като намаляват входящите количества химически вложения като торове и/или фитосанитарни продукти.

Бъдещ прогрес в познанието за взаимодействията почва - лоза – АМГ *Glomus spp*., идентифицирането на маркерите, свързани с индуцираната резистентност, както и генерирането на предсказващи модели за резултат от тези взаимодействия, ще имат важни практически последици за биологичния контрол и интегрираното управление на лозовите разсадникови и производствени насаждения.

This leads to less chemical inputs, and the quality and long-term results prevail over the intensification of production. The mycorrhization must be seen as a major factor in soil fertility and in improving the yield and health status of the grapevines. These effects lead to environmental protection as they reduce the inputs of chemical inputs such as fertilizers and / or phytosanitary products.

Future progress in the knowledge of the interactions soil - grapevine – AMF *Glomus* spp., the identification of markers associated with induced resistance, as well as the generation of predictive models for the result of these interactions will have important practical implications for biological control and integrated management of grapevine nurseries and production plantations.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Aguin, O., J. Mansilla, A. Vilarino, M. Sainz**, 2004. Effects of mycorrhizal inoculation on root morphology and nursery production of three grapevine rootstocks. *Am. J. Enol.Vitic,* 55, 108-111.
2. **Akiyama, K. and H. Hayashi**, 2006. Strigolactones: chemical signals for fungal symbionts and parasitic weeds in plant roots*. Annals of botany*, 97(6), 925-931.
3. **Allen M., W. Swenson, J. Querejeta, L. Egerton-Warburton, K. Treseder**, 2003. Ecology of mycorrhizae: a conceptual framework for complex interactions among plants and fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 41(1), 271-303.
4. **Almaliotis, D., N. Karagiannidis, C. Chatzissavvidis, T. Sotiropoulos, S. Bladenopoulou**, 2008. Mycorrhizal colonization of table grapevines (cv. 'Victoria') and its relationship with certain soil parameters and plant nutrition. *Agrochimica,* 52, 129-136.
5. **Almeida R. and N. Schenck**, 1990. A revision of the genus *Sclerocystis* (*Glomaceae, Glomales*). *Mycologia,* 82, 703-714.
6. **An Z., J. Hendrix, D. Hershman and G. Henson**, 1990. Evaluation of the 'Most Probable Number' (MPN) and wet-sieving methods for determining soil-borne populations of endogonaceous mycorrhizal fungi. *Mycologia*, 82, 576-581.
7. **Aristizabal, C., E. Rivera and D. Janos**, 2004. Arbuscular mycorrhizal fungi colonize decomposing leaves of *Myrica parvifolia*, *M. pubescens and Paepalanthus sp. Mycorrhiza*, 14, 221-228.
8. **Arya, A., and A. E. Perelló Eds.** 2010. Management of fungal plant pathogens. CABI, pp. 176.
9. **Balestrini, R., F. Magurno, C. Walker, E. Lumini, V. Bianciotto**, (2010). Cohorts of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in *Vitis vinifera*, a typical Mediterranean fruit crop. Environmental *microbiology reports*, 2(4), 594-604.
10. **Baumgartner, K., R. Smith and L. Bettiga**, 2005. Weed control and cover crop management affect mycorrhizal colonization of grapevine roots and arbuscular

mycorrhizal fungal spore populations in a California vineyard. *Mycorrhiza*, 15, 111-119.
11. **Bavaresco, L. and C. Fogher**, 1992. Effect of root infection with Pseudomonas fluorescens and Glomus mosseae in improving Fe efficiency of grapevine ungrafted rootstocks. *Vitis*, 31, 163-168.
12. **Belew, D., T. Astatki, M. Mokashi, Y. Getachew and C. Patil**, 2010. Effects of Salinity and Mycorrhizal Inoculation (*Glomus fasciculatum*) on Growth Responses of Grape Rootstocks (*Vitis spp.*). *S. Afr. J. EnoL Vitic*., 31(2), 82-88.
13. **Bentivenga P. and B**. **Hetrick**, 1991. Glomus mortonii sp. nov., a previously undescribed species in the Glomaceae isolated from the tallgrass prairie in Kansas. *Mycotaxon,* 42, 9-5.
14. **Bever J., J. Morton, J. Antonovics and P. Schultz**, 1996. Host-dependent sporulation and species diversity of mycorrhizal fungi in a mown grassland. *J. Ecol.,* 75, 1965-1977.
15. **Bidartondo M., D. Redecker, I. Hijri, A. Wiemken, T.Bruns, L. Dominguez, A. Sersic, J. Leake and D. Read**, 2002. Epiparasitic plants specialized on arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*, 419 (6905), 389–392.
16. **Biricolti S., F. Ferrini, E. Rinaldelli, I. Tamantini, and N**. **Vignozzi**, 1997. VAM fungi and soil lime content influence rootstock growth and nutrient content. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48(1), 93-99.
17. **Blaszkowski J.**, 1991. Polish Endogonaceae. IX. *Glomus aggregatum* with spores forming an evanescent outermost wall. *Crypt. Bot.* 2/3, 130-135.
18. **Blaszkowski J.**, 1994. Polish Glomales 11. *Glomus pustulatum*. *Mycorrhiza,* 4, 201-207.
19. **Blaszkowski J.**, 1995. *Glomus corymbiforme*, a new species in *Glomales* from Poland. *Mycologia*, 87, 732-737.
20. **Blaszkowski J.**, 1997. *Glomus gibbosum*, a new species from Poland. *Mycologia,* 89, 339-345.
21. **Blaszkowski J., T. Madej and M.Tadych**, 1998. *Entrophospora baltica sp*. nov. and *Glomus fuegianum*, two species in the Glomales from Poland. *Mycotaxon,* 68, 165-184.
22. **Blaszkowski J. and M. Tadych**, 1997. Glomus multiforum and G. verruculosum, two new species from Poland. *Mycologia,* 89, 804-811.
23. **Blaszkowski J., M.Tadych and M. Madej**, 2000. *Glomus minutum*, a new species in *Glomales (Zygomycetes*) from Poland. *Mycotaxon*, 76, 187-195.
24. **Bonfante, P. and A.Genre**, 2010. Mechanisms Underlying Beneficial Plant-Fungus Interactions in Mycorrhizal Symbiosis. *Nature Communications*, 1, 48.
25. **Bonfante, P., and I. Anca**, 2009. Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: a network of interactions. *Annual review of microbiology*, 63, 363-383.
26. **Borde, M., H. Kedar and P. Jite**, 2009. Growth performance of *Vitis vinifera* inoculated with *Glomus fasciculatum*. *Mycorrhiza News*, 21(2), 12-15.
27. **Brundrett M, N. Bougher, B. Dell, T. Grove, N. Malajczuk**, 1996. 'Working with mycorrhizas in forestry and agriculture.' *Australian Centre for International Agricultural Research: Canberra.*
28. **Brundrett M, L. Abbott and D. Jasper**, 1999. Glomalean mycorrhizal fungi from tropical Australia. I. Comparison of the effectiveness and specificity of different isolation procedures. *Mycorrhiza, 8*, 305-314.
29. **Brundrett M and W. Kendrick**, 1990. The roots and mycorrhizas of herbaceous woodland plants. I. Quantitative aspects of morphology. *New Phytologist*, 114, 457-468.
30. **Bücking H., J.Abubaker, M. Govindarajulu, M. Tala, P. Pfeffer, G. Nagahashi, and Y. Shachar Hill**, 2008. Root exudates stimulate the uptake and metabolism of organic carbon in germinating spores of Glomus intraradices. *New*

Phytologist, 180(3), 684-695.
31. **Bücking, H., E. Liepold and P. Ambilwade**, 2012. The role of the mycorrhizal symbiosis in nutrient uptake of plants and the regulatory mechanisms underlying these transport processes. *INTECH Open Access Publisher In*
32. **Cheng, X. and K. Baumgartner**, 2005. Overlap of grapevine and cover crop roots enhances interactions among grapevines, cover crops, and arbuscular mycorrhizal fungi. In Soil Environment and Vine Mineral Nutrition: Symposium Proceedings and Related Papers. San Diego*, CA: American Society of Enology and Viticulture,.* 171-174.
33. **Cheng, X., and K.Baumgartner**, 2004. Survey of arbuscular mycorrhizal fungal community in Northern California vine- yards and mycorrhizal colonization potential of grapevine nursery stock. *Hort Sci*, 39, 1702-1706.
34. **De Boer W., L. Folman, R. Summerbell, L. Boddy**, 2005. Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiol*. Rev., 29, 795-811.
35. **de la Peña, E., S. Rodriguez-Echeverria, W. van der Putten, H. Freitas, M. Moens**, 2006. Mechanism of control of root-feeding nematodes by mycorrhizal fungi in the dune grass Ammophila arenaria. *New Phytol*, 169, 829-840.
36. **Deal, R., C. Boothroyd and W. Mai**, 1971. Replanting of vineyards and its relationship to vesicular-arbuscular mycorrhiza. *Phytopathology*, 62, 172-175.
37. **Del Val C, J. Barea and C. Azcon-Aguilar**, 1999. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungus populations in heavy metal contaminated soils. *Appl Environ Microbiol,* 99, 718-723.
38. **Dighton, J., Jr. White, J. White, P. Oudemans (Eds.)**, 2005. The fungal community: its organization and role in the ecosystem. CRC Press.
39. **Freitas, N., A. Yano-Melo, F. da Silva, N. de Melo, L. Maia**, 2011. Soil biochemistry and microbial activity in vineyards under conventional and organic management at Northeast Brazil. *Sci. Agric.*, 68 (2), 223-229.
40. **Garcia-Garrido J. and J. Ocampo**, 2002. Regulation ofthe plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *J. Exp. Bot.*, 53 (373), 1377-1386.
41. **Gerdemann J. W. and J. Trappe**, 1974. The Endogonaceae in the Pacific Northwest. *Myc. Memoir,* 5, 1-76.
42. **Giovannetti M., L. Avio and L. Salutini**, 1991. Morphological, cytochemical, and ontogenetic characteristics of a new species of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. Canad. *J. Bot.*, 69, 161-167.
43. **Guerra, B. and K. Steenwerth**, 2012. Influence of floor management technique on grapevine growth, disease pressure, and juice and wine composition: a review. *Am. J. Enol. Viticult.*, 63, 149-164.
44. **Halary S., L. Daubois, Y. Terrat, S. Ellenberger, J. Wöstemeyer and M. Hijri**, 2013. Mating type gene homologues and putative sex pheromone-sensing pathway in arbuscular mycorrhizal fungi, a presumably asexual plant root symbiont. *Plos ONE*. 8 (11), e80729
45. **Halary S., S. Malik, L. Lildhar, C. Slamovits, M. Hijri, N. Corradi**, 2011. Conserved meiotic machinery in Glomus spp., a putatively ancient asexual fungal lineage. *Genome Biol Evol. 3*, 950-84
46. **Hawkins, H., A. Johansen and E. George**, 2000. Uptake and transport of organic and inorganic nitrogen by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*, 226: 275-285.
47. **Heijden, M. G., F. Martin, M. Selosse, I. Sanders**, 2015. Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytologist*, 205(4), 1406-1423.
48. **Hepper C.**, 1985. Influence of age of roots on the pattern of vesicular-

arbuscular mycorrhizal infection in leek and clover. *New Phytologist* 101, 685-693.
49. **Hildebrandt U., K. Janetta and H. Bothe**, 2002. Towards growth of arbuscular mycorrhizal fungi independent of a plant host. Appl. *Environ. Microbiol.* 68, 1919-24.
50. **Hodge, A., C. Campbell and A. Fitter**, 2001. An arbuscular mycorrhizal fungus accelerates decomposition and acquires nitrogen directly from organic material. *Nature*, 413, 297-299.
51. **Hooker, J. and K. Black**, 1995. Arbuscular mycorrhizal fungi as components of sustainable soil-plant systems. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 15, 201-212.
52. http://bugs.bio.usyd.edu.au/learning/resources/Mycology/Plant_Interactions/Mycorrhizas/Arbuscular/plantsSoil.shtml
53. **Jarstfer A. and D. Sylvia**, 1993. Inoculum production and inoculation strategies for vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. In: 'Soil microbial ecology: applications in agricultural and environmental management.' (Ed. FB Metting Jr.), 349-377.
54. **Johansen, A., I. Jakobsen and E. Jensen**, 1992. Hyphal transport of 15N-labeled nitrogen by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus and its effect on depletion of inorganic soil-N. *New Phytologist*, 122: 281-288.,
55. **Jones, E., S. Hammond, C. Blond, D. Brown and H. Ridgway**, 2014. Interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and rootstock cultivar on the susceptibility to infection by *Ilyonectria species*. *Phytopathologia Mediterranea*, 53(3), 582-583.
56. **Kara, Z., A. Sabir and S. Duman**, 2011. Effects of Mycorrhizal Applications on Vegetative Development of Grape Cuttings. *Bulletin UASVM Horticulture*, 68 (2), 269-270.
57. **Karagiannidis, N., and N. Nikolaou**, 1999. Arbuscular mycorrhizal root infection as an important factor of grapevine nutrition status. Multivariate analysis application for evaluation and characterization of the soil and leaf parameters [*Vitis vinifera* L.-Greece]. *Agrochimica* (It).
58. **Karagiannidis, N., N. Nikolaou, I. Ipsilantis and E. Zioziou**, 2007. Effects of different N fertilizers on the activity of Glomus mosseae and on grapevine nutrition and berry composition. *Mycorrhiza*, 18, 43-50.
59. **Karagiannidis, N., D. Velemis, and N. Stavropoulos**, 1997. Root colonization and spore population by VA571 mycorrhizal fungi in four grapevine rootstocks. *Vitis*, 36, 57-60.
60. **Kirk P., P. Cannon, D. Minter and J. Stalpers**, 2008. Dictionary of the Fungi (10th ed.). Wallingford, UK: *CABI*, 287.
61. **Koske R.**, 1985. *Glomus aggregatum* emended: A distinct taxon in the *Glomus fasciculatum* complex. *Mycologia,* 77, 619-630.
62. **Koske R., C. Friese, C. Walker and Y. Dalpé**, 1986. Glomus pustulatum: A new species in the Endogonaceae. *Mycotaxon*, 26, 143-149.
63. **Leake, J., D. Johnson, D. Donnelly, G. Muckle, L. Boddy, D. Read**, 2004. Networks of power and influence: the role of mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agroecosystem functioning. *Canadian Journal of Botany*, 82: 1016-1045.
64. **Li, H., G. Yang, H. Shu, Y. Yang, B. Ye, I. Nishida, C. Zheng**, 2010. Colonization by the Arbuscular Mycorrhizal Fungus Glomus versiforme induces a Defense Response against the Root-knot Nematode Meloidogyne incognita in the Grapevine (*Vitis amurensis* Rupr.), Which Includes Transcriptional Activation of the Class III Chitinase Gene VCH3. *Plant Cell Physiol*., 47 (1), 154-163.
65. **Linderman, R., and E. Davis**, 2001. Comparative response of selected grapevine rootstocks and cultivars to inoculation with different mycorrhizal fungi. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52(1), 8-11.

66. **Lisek J., L. Sas-Paszt, E. Derkowska, T. Mrowicki, M. Przybył, M. Frąc**, 2016. Growth, Yielding and Healthiness of Grapevine Cultivars 'Solaris' and 'Regent'in Response to Fertilizers and Biostimulants. *Journal of Horticultural Research*, 24(2), 49-60.
67. **Mäder P., H. Vierheilig, R. Streitwolf-Engel, T. Boller, B. Frey, P. Christie, A. Wiemken**, 2000. Transport of 15N from a soil compartment separated by a polytetrafluoroethylene membrane to plant roots via the hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 146, 155-161
68. **Menge, J., D. Raski, L. Lider, E. Johnson, N. Jones, J. Kissler, C. Hemstreet**, 1983. Interactions between mycorrhizal fungi, soil fumigation, and growth of grapes in California. *Am. J. Enol. Vitic.,* 34, 117-121
69. **Nappi P., R. Jodice, A. Luzzati, L. Corino**, 1985. Grapevine root system and VA mycorrhizae in some soils of Piedmont (Italy). *Plant Soil,* 85, 205-210.
70. **Nicolás E., J. Maestre-Valero, J. Alarcón, F. Pedrero, J. Vincente-Sánchez, A. Bernabé, J. Gómez-Montiel, J. A. Hernández, F. Fernández**, 2015. Effectiveness and persistence of arbuscular mycorrhizal fungi on the physiology, nutrient uptake and yield of Crimson seedless grapevine. *The Journal of Agricultural Science* 153(6), 1084-1096.
71. **Nieto A., F. Figueres, and M. Pinós**, 2012. Contribution of arbuscular mycorrhizae to grapevine cultivation. *Tierras de Castilla y León: Agricultura*, (193), 110-114 (esp).
72. **Nikolaou, N., K. Angelopoulos and N. Karagiannidis**, 2003. Effects of drought stress on mycorrhizal and non-mycorrhizal 'Cabernet Sauvignon' grapevine, grafted onto various rootstocks. *Experimental Agric.*, 39, 241-252.
73. **Nogales, A., A. Camrubí, V. Estaún, C. Calvet**, 2008. Mycorrhizal inoculation of grapevines in replant soils: improved field application and plant performance. *http://www.recercat.net/bitstream/handle/2072/13365/Nogaleset*, 1-5.
74. **Oehl, F., E. Sieverding, K. Ineichen, P. Mäder, A. Wiemken, T. Boller**, 2009. Distinct sporulation dynamics of arbuscular mycorrhizal fungal communities from different agroecosystems in long-term microcosms. *Agric. Ecosys. Environ.*, 134, 257-268).
75. **Oehl, F., E. Sieverding, K. Ineichen, E.-A. Ris, T.Boller, A. Wiemken**, 2005. Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi at different soil depths in extensively and intensively managed agroecosystems. *New Phytologist,* 165, 273-283.
76. **Öpik M., M. Moora, J. Liira, U. Koljalg, M. Zobel, R. Sen**, 2003. Divergent arbuscular mycorrhizal fungal communities colonize roots of *Pulsatilla spp*. in boreal Scots pine forest and grassland soils. *New Phytologist,* 160, 581-593.
77. **Öpik M, M. Moora, J. Liira, M. Zobel**, 2006. Composition of root-colonizing arbuscular mycorrhizal fungal communities in different ecosystems around the globe. *Journal of Ecology,* 94: 778-790.
78. **Ortas, I. and A. Varma**, 2007. Field trials of bioinoculants. Chapter 26. In: Oelmuller, R. and A. Varma (eds.), Modern tools and techniques, Springer-Verlag, Germany, 11: 397-413.
79. **Ozdemir, G., C. Akpinar, A. Sabir, H. Bilir, S. Tangolar, I. Ortas**, 2010. Effect of Inoculation with Mycorrhizal Fungi on Growth and Nutrient Uptake of Grapevine Genotypes (*Vitis spp*.). *Europ. J. Hort. Sci.*, 75 (3), 103-110.
80. **Patrick, A., R. Smith, K. Keck, A. Berry**, 2004. Grapevine uptake of 15N-labeled nitrogen derived from a winter-annual leguminous cover-crop mix. *American Journal of Enology and Viticulture*, 55, 187-190.
81. **Petit, E. and W. Gubler**, 2006. Influence of Glomus intraradices on black foot disease causedby Cylindrocarpon macrodidymum on Vitis rupestris under controlled conditions. *Plant Diseases*, 90, 1481-1484.

82. **Pozo, M., A. Verhage, J. Garcia-Andrade, M. Garcia, C. Azcon-Aguilar**, 2009. Priming plant defence against pathogens by arbuscular mycorrhizal fungi. In: Mycorrhizas-Functional Processes and Ecological Impact, Springer Berlin Heidelberg, 123-135.
83. **Purin, S., O. Klauberg-Filho and S. Sturmer**, 2006. Mycorrhizae activity and diversity in conventional and organic apple orchards from Brazil. *Soil Biol.and Biochem.*, 38(7), 1831-1839.
84. **Ravichandra, N. G.**, 2014. Horticultural nematology. *New Dehli: Springer* 3(25), 232.
85. **Ryan, M. and J. Graham**, 2002. Is there a role for arbuscular mycorrhizal fungi in production agriculture? *Plant and Soil*, 244, 263-271.
86. **Sambandan K, K. Kannan and N. Raman**, 1992. Distribution of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in heavy metal polluted soils of Tamil Nadu, India. *J Environ Biol* 13,159-167.
87. **Schnepf, A., T. Roose and P. Schweiger**, 2008. Impact of growth and uptake patterns of arbuscular mycorrhizal fungi on plant phosphorus uptake – a modelling study. *Plant Soil*, 312: 85-99.
88. **Schreiner, R. and G. Bethlenfalvay**, 1995. Mycorrhizal interactions in sustainable agriculture. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 15, 271-285.
89. **Schreiner R.,** 2007. Effects of native and nonnative arbuscular mycorrhizal fungi on growth and nutrient uptake of ‘Pinot noir’ (*Vitis vinifera* L.) in two soils with contrasting levels of phosphorus. *Applied soil ecology*, 36(2), 205-215.
90. **Schreiner, R., and R. Linderman,** 2005. Mycorrhizal colonization in dryland vineyards of the Willamette Valley, Oregon. *Small Fruits Review*, 4(3), 41-55.
91. **Schreiner, R.**, 2003. Mycorrhizal colonization of grapevine rootstocks under field conditions. *Am. J. Enol. Vitic.,* 54, 143-149.
92. **Schubert, A., S. Cammarata and I. Eynard**, 1988. Growth and root colonization of grapevines inoculated with different Mycorrhizal endophytes. *HortScience*, 23, 302-303.
93. **Smith S. and D. Read**, 2008. Mycorrhizal symbiosis, 3rd edn. *Academic Press*, London
94. **Smith, S. and V. Gianinazzi-Pearson**, 1988. Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 39, 211-244.
95. **Stockinger, H., C. Walker and A. Schüßler**, 2009. ‘*Glomus intraradices* DAOM197198’, a model fungus in arbuscular mycorrhiza research, is not *Glomus intraradices*. *New Phytol,* 183, 1176-1187.
96. **Sylvia D., J. Fuhrmann, P. Hartel, D. A. Zuberer**, 2005. Principles and applications of soil microbiology. *Upper Saddle River, NJ, Pearson*, 417-420.
97. **Sylvia D. and N. Schenck,** 1983. Germination of chlamydospores of three Glomus species as affected by soil matric potential and fungal contamination. *Mycologia,* 75, 30-35
98. **Sylvia, D. and S. Williams**, 1992. Vesicular-arbuscular mycorrhizae and environmental stress. In: Mycorrhizae in Sustainable Agriculture. G. J. Bethlenfalvay and L.R.G. (Eds.), American Society of Agronomy and Soil Science Society of America, Madison, WI, 101-124.
99. **Tamasloukht, M., N. Séjalon-Delmas, A. Kluever, A. Jauneau, C. Roux, G. Bécard, P. Franken**, 2003. Root Factors Induce Mitochondrial-Related Gene Expression and Fungal Respiration during the Developmental Switch from Asymbiosis to Presymbiosis in the Arbuscular Mycorrhizal Fungus. *Gigaspora rosea*. *Plant*

physiology, 131(3), 1468-1478.
100. **Tsvetkov, I., T. Dzhambazova, V. Kondakova, R. Batchvarova**, 2014. Mycorrhizal fungi Glomus spp. and Trichoderma spp. in viticulture (review). *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 20(4), 849-855.
101. **Tulasne, L. and C. Tulasne**, 1844. Fungi nonnulli hypogaei, novi v. minus cogniti. *Giornale Botanico Italiano*. 2(7-8), 55-63.
102. **Turnau, K., P. Ryszka, V. Gianinazzi-Pearson, D. Van Tuinen**, 2001. Identification of arbuscular mycorrhizal fungi in soils and roots of plants colonizing zinc wastes in southern Poland. *Mycorrhiza*, 10(4), 169-174.
103. **Valentine, A., P. Mortimer, M. Lintnaar, R. Borgo**, 2006. Drought responses of arbuscular mycorrhizal grapevines. *Symbiosis*, 41(3), 127-133.
104. **van Rooyen, M., A. Valentine and E. Archer**, 2004. Arbuscular Mycorrhizal Colonisation Modifies the Water Relations of Young Transplanted Grapevines (Vitis). *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, 25 (2), 37-42.
105. **Verbruggen E, M. van der Heijden, J. Weedon, G. Kowalchuk, A, W. Roling**, 2012. Community assembly, species richness and nestedness of arbuscular mycorrhizal fungi in agricultural soils. *Molecular Ecology,* 21, 2341-2353.
106. **Vierheilig, H., S. Steinkellner, T. Khaosaad, J. M. Garcia-Garrido**, 2008. The biocontrol effect of mycorrhization on soilborne fungal pathogens and the autoregulation of the AM symbiosis: one mechanism, two effects? In: *Mycorrhiza*, A. Varma (ed.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 307-320.
107. **Virginia R., M. Jenkins and W. Jarrell**, 1986. Depth of root symbiont occurrence in soil. *Biology and Fertility of Soils,* 2, 127-130.
108. **Vivier, M., and I. Pretorius**, 2002. Genetically tailored grapevines for the wine industry. *Trends Biotechnol,* 20, 472-478.
109. **Watson D. and P. Millner**, 1996. Assessment of Glomalean species biodiversity as influenced by trapping methods. In: 'Programs and abstracts of the first international conference on mycorrhizae.' (Eds TM Szaro and TD Bruns), 125.
110. **Weissenhorn, I., C. Leyval and J. Berthelin**, 1993. Cd-tolerant arbuscular mycorrhizal (AM) fungi from heavy-metal polluted soils. *Plant and Soil*, 157(2), 247-256.
111. **Whipps, J. M.**, 2004. Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. *Can. J. Bot*, 82: 1198-1227.
112. **Wu, Q. S. (Ed.)**, 2017. Arbuscular Mycorrhizas and Stress Tolerance of Plants. *Springer*.
113. **Yang Y, Y. Song, H. Scheller, A. Ghosh, Y. Ban, H. Chen, M. Tang**, 2015. Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Robinia pseudoacacia* in uncontaminated and heavy metal contaminated soils*. Soil Biol Biochem,* 86, 146-158,
114. **Zajicek J., B. Hetrick and K. Owensby**, 1986. The influence of soil depth on mycorrhizal colonization of forbs in the tallgrass prairie. *Mycologia,* 78, 316-320.
115. **Zhang Y., C. Zhong, Y. Chen, Z. Chen, Q. Jiang, C. Wu and K. Pinyopusarerk**, 2010. Improving drought tolerance of *Casuarina equisetifolia* seedlings by arbuscular mycorrhizas under glasshouse conditions. *New Forest,* 40(3), 261-271.

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2017, 20 (1), 251-258 ISSN 1311-0489 (Print)
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan ISSN 2367-8364 (Online)

Усвояване на минерални елементи и натрупване на сухо вещество при микоризирани разсадникови растения Гизела 6/Ван

Иван Цветков[1]*, Евлоги Марков[2], Теодора Джамбазова[1], Диян Георгиев[3]

[1]Агробиоинститут, бул. Драган Цанков 8, 1164 София, България
[2]Институт по почвознание, агротехнологии и защита на растенията “Н. Пушкаров“, ул. Шосе Банкя 7, 1331 София, България
[3]Институт по планинско животновъдство и земеделие, ул. “Васил Левски” 281, 5600 Троян, България
**E-mail: ivantsvetkov@abi.bg*

Mineral elements uptake and dry matter accumulation in mycorrhizated nursery plants Gisela 6/Van

Ivan Tsvetkov[1]*, Evlogi Markov[2], Teodora Dzhambazova[1], Diyan Georgiev[3]

[1]Agrobioinstitute, 8 Dragan Tsankov Blvd., 1164 Sofia, Bulgaria
[2]Institute of Soil Science, Agrotechnologies and Plant Protection “N. Pushkarov“, 7 Shausee Bankya Str., 1331 Sofia, Bulgaria
[3]Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, 281 Vasil Levski Str., 5600 Troyan, Bulgaria

РЕЗЮМЕ

Целта на изследването е да се проучи влиянието на различни микоризни гъби върху усвояването на минерали и натрупването на сухо вещество при разсадникови овощни растения Гизела 6/Ван. Натрупването на сухо вещество е анализирано два пъти през вегетационния период (през май и октомври). Паралелно са проведени анализи по отношение усвояването и разпределението на шест основни макро и микроелементи (N, P, K, Ca, Mg, Fe) от експерименталните растения. Получените резултати показват, че по отношение на свежо тегло Glomus варианта изпреварва контрола 1 с 14,47% и контрола 2 с 22,60%. По

SUMMARY

The aim of the study is to investigate the influence of different mycorrhizal fungi on the absorption of minerals and accumulation of dry matter in nursery fruit plants Gisela 6 / Van. The accumulation of dry matter was analyzed twice during the vegetation period (May and October). Parallel analyzes were conducted regarding the mineral uptake and distribution of six major macro- and microelements (N, P, K, Ca, Mg, Fe) from the experimental plants. Obtained results shows that concerning fresh weight *Glomus* variant overrun Control 1 with 14,47% and Control 2 with 22,60%.

In case of the dry weight the same

отношение на сухото тегло, същите проценти са дори повече – съответно 21,93% и 27,13%. Бихме могли да отбележим също, че вариантите включващи микоризните гъби *Glomus* и *Trichoderma* показват по-добра способност за натрупване на свежа и суха биомаса в присадниковата част на растението, което е от много важно значение за доброто развитие на присадения сорт. Двата варианта демонстрират също и най-добри показатели по отношение усвояване на минерални елементи: вариантът *Glomus* – при акумулирането на N и Fe, а варианта Trichoderma – при акумулирането на Mg. По отношение на усвояването на минералните елементи K и Ca, всички експериментални растения показват сходни стойности, в рамките на стандартното отклонение.

Ключови думи: *Glomus intraradices*, *Trichoderma harzianum* T22, овощен разсадник, усвояване на минерални елементи при растенията, натрупване на сухо вещество

percentages are even more – 21,93% and 27,13% respectively.

We could noticed also that the variants, including mycorrhizal fungi *Glomus* and *Trichoderma* demonstrated more fresh and dry biomass accumulation ability in scion parts of the plant which is very important for good development of the grafted variety.

Both two variants shows also best mineral uptake rates: the variant *Glomus* – in N and Fe accumulations, *Trichoderma* – in Mg ones.

Concerning K and Ca mineral elements uptake all experimental plants showed very close accumulation rates, in framework of standard deviation.

Key words: *Glomus intraradices*, *Trichoderma harzianum* T22, fruit nursery, mineral elements uptake in plants, dry matter accumulation

УВОД

Микоризите са симбиотични асоциации между почвените гъби и корените на растенията. Те насърчават усвояването на вода и хранителни вещества чрез обширна мрежа от хифи, което позволява на растенията да усвояват по-големи обеми от почвата (Pigna et al., 2014). Те също стимулират механизмите на защита на растенията срещу биотични и абиотични стресови фактори (Carrillo et al., 2016). Използването на полезни биологични взаимодействия, като микоризиращата активност, предлага естествен начин за подобряване на храненето на растенията и успешното създаване на култури. (Castillo et al., 2008). Повишените темпове на растеж в микоризираните растения най-често се дължат на повишено усвояване на хранителни вещества. Или микоризните гъби изглежда, че повишават натрупването на хранителни вещества, особено за елементи, които са неподвижни в почвите, защото неорганичните йони дифундират бавно (като P, Cu, Zn и Ca)

INTRODUCTION

Mycorrhizae are symbiotic associations between soil fungi and the roots of the plants. They promoting the absorption of water and nutrients through an extensive network of hyphae which allowing plants to explore larger volumes of soil (Pigna et al., 2014). They also stimulate the plant’s defense mechanisms against biotic and abiotic stresses (Carrillo et al., 2016). The use of beneficial biological interactions such as the mycorrhizal activity offers a natural way of improving plant nutrition and the successful establishment of crops. (Castillo et al., 2008). Increased growth rates in mycorrhizal plants have most often been attributed to increased nutrient uptake. Either mycorrhizal fungi appear to increase nutrient acquisition, especially for elements that are immobile in soils, because inorganic ions diffuse slowly (such as P, Cu, Zn, and Ca) or when (like both N and P) they are present in complex или когато (като N и P) присъстват в комплексни органични форми (Mondragon-Valero et al., 2017). Днес микоризните гъби са широко използвани в селското стопанство, градинарството и горското стопанство, както и за рекултивация на околната среда, за увеличаване на добива и здравето на растенията и за ограничаване на приложението на агрохимикали (Smith and Smith, 2011; Beltrano et al., 2013; Jiang et al., 2013). Микоризната симбиоза се счита за важен метод за подпомагане на отглеждането на полски култури, дори при висока соленост или в райони склонни към недостиг на вода или хранителни вещества (Malik et al., 2017; Saxena et al., 2017). Докато неестествената инфекция е ефективна в разсадниците, някои проблеми все още не са решени, като например трудността да се произведе голямо количество комерсиален свободен от патогени продукт, оскъдното познаване на взаимодействията между гостоприемника и гъбите, вероятната конкуренция с почвени гъби, невъзможността да се стерилизира разсадниковата почва (Bavaresco et al., 2011; Viera et al., 2017).

Целта на изследването е да се изследва влиянието на различни микоризни гъби върху усвояването на минерали и натрупването на сухо вещество в разсадникови овощни растения Gisela 6 / Van.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

In vitro получени и микоризирани (Таблица 1) подложки Gisela 6 са произведени от SME Fitotechniki-Greece в рамките на проект на ЕК FP7 SITINPLANT. Те са засадени в българското експериментално поле на проекта (област Сливен). Подложките са присадени 5 месеца след засаждане със сертифицирани пъпки от черешов сорт "Ван" чрез Т-пъпково присаждане (10 cm от нивото на почвата, с еднопъпкови присадки) (Hartman et al., 1997)(Фигура 1).

organic forms (Mondragon-Valero et al., 2017). Nowadays, mycorrhizal fungi have been widely used in agriculture, horticulture, and forestry programs, as well as for environmental reclamation, to increase crop yield and health and to limit the application of agrochemicals (Smith and Smith, 2011, Beltrano et al., 2013, Jiang et al., 2013).

Mycorrhizal symbiosis is considered an important method to aid the cultivation of field crops, even under high salinity or in areas prone to water or nutrient deficiencies (Malik et al., 2017; Saxena et al., 2017). While the artificial infection is effective in the nurseries, some problems have not yet been solved, such as the difficulty to produce a large amount of commercial pathogen-free product, the scarce knowledge on the host-fungus interactions, the likely competition with the soil borne fungi, the impossibility to sterilize the nursery soil (Bavaresco et al., 2011; Viera et al.,2017).

The aim of the study is to investigate the influence of different mycorrhizal fungi on the absorption of minerals and accumulation of dry matter in nursery fruit plants Gisela 6 / Van.

MATERIAL AND METHODS

In vitro obtained and mycorrhizated (Table 1) Gisela 6 rootstocks were produced by SME Fitotechniki- Greece in framework of EC FP7 SITINPLANT project. It was planted in the Bulgarian project experimental field (Sliven region). The rootstocks were grafted 5 months after planting with certified buds from cherry variety “Van” by T-budding (10 cm from the soil level, with one-bud scions) (Hartman et al., 1997) (Figure 1).

Таблица 1. Микоризиране на експерименталните растения Gisela 6/Van
Table 1. Mycorrhizations of the experimental plants Gisela 6/Van

Substances/Субстанция (abbreviation/абревиатура)	Quantity/Количество per plant/на растение (g)	Type of application/Начин на приложение
(TP)- Trianum P®- KOPPERT (*Trichoderma harzianum* T 22)	0,27	liquid culture течна култура
(TG)- Trianum G®- KOPPERT (*Trichoderma harzianum* T 22)-granules	1,5	прах
(AG)- Aegis®- ITALPOLLINA (*Glomus intraradices*)	2,0	прах

Фиг. 1. Gisela 6/cv.Van експериментални разсадникови растения (май-юни-юли-септември-ноември)
Fig. 1. Gisela 6/cv.Van experimental nursery plants (May-June-July-September-November)

Анализите на натрупването на свежо / сухо вещество и усвояването на минерални елементи са извършени в началото и в края на вегетацията на присадените растения в цикъла на разсадника. Унищожени са и са анализирани по 3 индивидуални растения (репликации) за всеки експериментален вариант. Всяко растение е разделено на четири части (проби): корен на подложката, горна част на подложката, летораст на сорта, листа на сорта (A, B, C, D). Анализи за акумулирането на свежо / сухо вещество са извършени за всяка част от растението (проби). Средните стойности за акумулирането на свежо / сухо вещество от 1 растение са изчислени като сума от средните стойности за всяка част на растението (A + B + C + D). FW / DW стойностите са изчислени на база съотношението на средните стойности на свежото тегло на цялото растение към средните стойности на сухото тегло. Всяка проба е анализирана по отношение усвояване на шест основни макро и микроелементи (N, P, K, Ca, Mg, Fe), по методи, описани от Penkov et al. (1981).

Analysis of fresh/dry matter accumulation and mineral elements uptake were done at the start and at the end of plant vegetation of the grafted plants in nursery cycle. It was destroyed and analyzed tree individual plants (replications) per each experimental variant. Every plant is separated to four parts (samples): rootstock root, rootstock upper part, variety shoot, variety leaves (A, B, C, D). Fresh/dry matter accumulation analyses have done for each plant part (sample). Average values of the plant fresh/dry matter accumulation of 1 plant were calculated as aggregate amount of average values of each plant parts (samples) (A+B+C+D). FW/DW ratios were present as coefficients, obtained by dividing of average plant fresh weight to average plant dry weight. Each sample was analysed for mineral uptake of six basic macro and microelements (N, P, K, Ca, Mg, Fe) by the methods described by Penkov et al. (1981).

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Получените резултати показват, че по отношение на свежо тегло Glomus вариант изпреварва Control 1 с 14,47% и Control 2 с 22,60%. При сухото тегло същите проценти са още по-високи – съответно с 21,93% и 27,13%. Можем също така да отбележим, че вариантите, включващи микоризните гъби Glomus и Trichoderma демонстрират по-голяма способност за натрупване на суха и суха биомаса в присадниковите части от растението, което е много важно за доброто развитие на присадения сорт (Таблица 2, Таблица 3).

RESULTS AND DISCUSSION

Obtained results shows that concerning fresh weight Glomus variant overrun Control 1 with 14,47% and Control 2 with 22,60%. In case of the dry weight the same percentages are even more- 21,93% and 27,13% respectively. We could noticed also that the variants, including mycorrhizal fungi Glomus and Trichoderma demonstrated more fresh and dry biomass accumulation ability in scion parts of the plant which is very important for good development of the grafted variety (Table 2, Table 3).

Таблица 2. Акумулиране на свежо и сухо вещество (начало на вегетация)
Table 2. Accumulation fresh/dry matter (start of vegetation)

Variant Вариант	Fresh Weight (g) Свежо тегло					Dry Weight (g) Сухо тегло					FW/DW ratio съотношение
	A	B	C	D	Plant Растение	A	B	C	D	Plant Растение	
Trichoderma	48,62	8,64	32,72	52,58	**142,56**	20,02	4,94	12,53	24,11	**61,60**	**2,314**
Glomus	74,61	10,78	29,44	46,58	**161,41**	31,98	6,02	11,03	21,79	**70,82**	**2,279**
Control Sitinplant	78,50	24,05	26,78	50,92	**180,25**	33,62	15,12	10,03	18,07	**76,84**	**2,346**
Glomus + Trichoderma	62,67	12,32	32,52	47,79	**155,40**	28,48	7,02	12,69	21,01	**69,20**	**2,245**
Control Nursery	71,24	10,32	30,41	50,50	**162,47**	29,97	6,03	12,02	22,79	**70,81**	**2,294**

Таблица 3. Акумулиране на свежо и сухо вещество (край на вегетация)
Table 3. Accumulation fresh/dry matter (end of vegetation)

Variant Вариант	Fresh Weight (g) Свежо тегло					Dry Weight (g) Сухо тегло					FW/DW ratio съотношение
	A	B	C	D	plant	A	B	C	D	plant	
Trichoderma	77,89	17,71	53,22	38,59	**187,41**	32,98	8,79	28,39	18,58	**88,74**	**2,111**
Glomus	78,13	42,10	53,51	44,28	**218,02**	40,51	24,20	27,32	18,53	**110,56**	**1,972**
Control Sitinplant	76,72	46,38	32,51	30,81	**186,42**	34,85	25,68	14,49	11,29	**86,31**	**2,159**
Glomus + Trichoderma	76,10	31,32	36,79	26,87	**171,08**	28,28	20,97	23,29	11,47	**83,01**	**2,061**
Control Nursery	87,32	28,42	31,71	21,30	**168,75**	43,51	15,50	13,52	8,03	**80,56**	**2,094**

LEGEND: A-ROOTSTOCK ROOT; B-ROOSTOCK UPPER PART (up to grafting point); C-VARIETY SHOOT; D-VARIETY LEAVES; PLANT=A+B+C+D
ЛЕГЕНДА: : А-КОРЕН НА ПОДЛОЖКАТА; В-НАДЗЕМНА ЧАСТ НА ПОДЛОЖКАТА (ДО МЯСТОТО НА ПРИСАЖДАНЕ); ЛЕТОРАСТ НА СОРТА; D-ЛИСТА НА СОРТА; РАСТЕНИЕ=А+В+С+D

И двата варианта показват също най-високи стойности на усвояване на минерални елементи (Таблица 4): вариант Glomus при акумулиране на N и Fe, а вариант Trichoderma – на Mg. По отношение на усвояването на минералните елементи K и Ca всички експериментални растения показаха много близки стойности на акумулиране, в рамките на стандартното отклонение.

Both two variants shows also best mineral uptake rates (Table 4): the variant Glomus – In N and Fe accumulations, Trichoderma- in Mg ones. Concerning K and Ca mineral elements uptake all experimental plants showed very close accumulation rates, in framework of standard deviation.

Таблица 4. Усвояване на минерални елементи от експерименталните растения
Table 4. Mineral elements uptake of experimental plants

Variant Вариант Months Месеци	Plant dry matter accumulation Акумулиране на сухо вещество от растението (g)		N (g) /per plant/ /на растение/		P (g) /per plant/ /на растение/		K (g) /per plant/ /на растение/		Ca (g) /per plant/ /на растение/		Mg (g) /per plant/ /на растение/		Fe (ppm) /per plant/ /на растение/	
	Rootstock Подложка	Scion Присадка	Rootstock Подложка	Scion Присадка	Rootstock Подложка	Scion Присадка	Rootstock Подложка	Scion Присадка	Rootstock Подложка	Scion Присадка	Rootstock Подложка	Scion Присадка	Rootstock Подложка	Scion Присадка
June юни	24,96	36,64	0,459	0,843	0,065	0,095	0,105	0,348	0,459	0,956	0,052	0,216	26,01	10,66
October октомври	**41,77**	***46,97**	**0,731**	**1,127**	**0,108**	**0,122**	**0,228**	**0,460**	**0,744**	***1,310**	**0,084**	***0,258**	**62,74**	***13,90**
June юни	38,00	32,82	0,844	0,820	0,087	0,089	0,193	0,283	0,684	0,721	0,080	0,187	30,48	9,65
October октомври	***64,71**	**45,85**	***1,372**	***1,137**	***0,142**	***0,128**	***0,298**	***0,550**	***0,874**	**1,225**	***0,104**	**0,238**	***76,88**	**13,71**
June юни	48,74	28,10	0,897	0,759	0,107	0,073	0,200	0,266	0,751	0,618	0,068	0,174	33,92	9,91
October октомври	**60,53**	**30,78**	**1,090**	**0,892**	**0,139**	**0,111**	**0,248**	**0,280**	**0,829**	**1,040**	**0,085**	**0,206**	**75,78**	**12,59**
June юни	35,50	33,70	0,618	0,807	0,089	0,092	0,124	0,292	0,618	0,674	0,060	0,199	30,35	9,98
October октомври	**49,25**	**34,76**	**0,975**	**0,976**	**0,137**	**0,111**	**0,241**	**0,355**	**0,768**	**0,838**	**0,074**	**0,251**	**62,25**	**13,87**
June юни	36,00	24,81	0,679	0,694	0,082	0,060	0,158	0,198	0,644	0,689	0,061	0,129	38,70	8,44
October октомври	**49,01**	**30,55**	**0,980**	**0,825**	**0,132**	**0,089**	**0,240**	**0,299**	**0,789**	**0,852**	**0,074**	**0,159**	**67,19**	**11,27**

Legend/Легенда: experimental variants/експериментални варианти

Trichoderma	Glomus	Control SITINPLANT	Glomus+Trichoderma	Control Nursery

ИЗВОДИ

Нашите проучвания показаха, че микоризните третирания имат положителен ефект върху натрупването на минерали и сухо вещество при разсадникови овощни растения Gisela 6 / Van. Гъбните инокулации, стимулират растежа на растенията, натрупването на биомаса и

CONCLUSIONS

Our studies showed that mycorrhiza treatments have a positive effect on mineral uptake and dry matter accumulation of Gisela 6/Van nursery plants. The fungal inoculations promoting plant growth, biomass accumulation and mineral nutrients absorption and could абсорбцията на минерални хранителни вещества и биха могли да дадат важен принос за по-нататъшното развитие на овощните растения. Приложението на микоризни гъби в разсадниковия цикъл изглежда обещаваща техника, но са необходими допълнителни проучвания, за да се разберат по-добре взаимодействията растение-почва микроорганизми (естествени почвени и доставени) и как да се запази ефективността на изкуствените инокулуми по време на жизнения цикъл на растенията.

make an important contribution to further fruit plants development.

The implementation of mycorrhizal fungi in the nursery cycle seems to be a promising technique, but further studies are necessary in order to have better understanding of plant- soil-microorganisms (natural soil- borne and supplied) interactions and how to keep effective the artificial inoculums along the plant life cycle.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Bavaresco, L., M. Gatti, M. Zamboni, C. Fogher, F. Ferrarri**, 2011. Role of artificial mycorrhization on iron uptake in calcareus soils, on stilbene root synthesis and in other physiological processes in grapevine. In: Proceedings of 33rd World Congress of Vine and Wine, 20-25 June 2010, Tbilissi, Georgia (O.I.V. eds.), 113-119.
2. **Beltrano, J., M. Ruscitti, M. Arango, M. Ronco**, 2013. Effects of arbuscular mycorrhiza inoculation on plant growth, biological and physiological parameters and mineral nutrition in pepper grown under different salinity and P levels. *J. Soil Sci. Plant Nutr.*, 13, 123-141.
3. **Carrillo, R., J. Guerrero, M. Rodríguez, C. Merino-Gergichevich**, 2016. Colonization of blueberry (Vaccinium corymbosum) plantlets by ericoid mycorrhizae under nursery conditions. *Ciencia e Investigación Agraria*, 42(3), 365-374.
4. **Castillo, C., I. Astroza, F. Borie, R. Rubio**, 2008. Efecto de cultivos hospederos y no hospederos sobre propágulos micorrícicos arbusculares. *J. Soil Sci. Plant Nutr.*, 8, 37-54.
5. **Hartmann, H., D. Kester, F. Davies, R. Geneve**, 1997. Plan Propagation: Principles and Practices, 6th edition. Prentic Hall, Upper Saddle River NJ. (eds.), 770-790.
6. **Jiang, W., G. Gou and Y. Ding**, 2013. Influences of arbuscular mycorrhizal fungi on growth and mineral element absorption of Chenglu hybrid bamboo seedlings. *Pak. J. Bot.*, 45(1), 303-310.
7. **Malik, N., A. Nunez and L. McKeever**, 2017. Mycorrhizal Inoculation Increases Growth and Induces Changes in Specific Polyphenol Levels in Olive Saplings. *Journal of Agricultural Science*, 9(2), 1-7.
8. **Mondragon-Valero, A., I. Lopez-Cortes, D. Salazar, P. de Córdova**, 2017. Physical mechanisms produced in the development of nursery almond trees (Prunus dulcis Miller) as a response to the plant adaptation to different substrates. *Rhizosphere*, 3, 44-49.
9. **Penkov, M., Y. Dimitrova, I. Hristov, Y. Kozarov**, 1981. Guide of Soil knowledge and soil analyses. (BAS Eds.), 60-143 (Bg).
10. **Pigna, M., A. Caporale, P. Cartes, V. Cozzolino, M. Mora, A. Sommella, A.Violante**, 2014. Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation and phosphorus fertilization on the growth of escarole (*Cichorium endivia* L.) in an arsenic polluted soil. *J. Soil Sci. Plant Nutr.*, 14, 199-209.

11. **Saxena, B., K. Shukla and B. Giri**, 2017. Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Tolerance of Salt Stress in Plants. In: *Arbuscular Mycorrhizas and Stress Tolerance of Plants*, Springer Singapore, 67-97.
12. **Smith, S. and F. Smith**, 2011. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 62, 227-250.
13. **Viera, W., D. Campana, S. Castro, W. Vasquez, P. Viteri, J. Zambrano**, 2017. Effectiveness of the arbuscular mycorrhizal fungi use in the cherimoya (Annona cherimola Mill.) seedlings growth. *Acta Agronómica*, *66*(2), 207-213.

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2017, 20 (1), 259-266 ISSN 1311-0489 (Print)
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan ISSN 2367-8364 (Online)

Афинитет и динамика на растеж на селектирана форма дива лоза (*Vitis vinifera* ssp. *sylvestris*) присадена върху различни подложки

Иван Цветков[1]*, Мария Георгиева[2], Теодора Джамбазова[1]

[1]Агробиоинститут, бул. Драган Цанков 8, 1164 София, България
[2]Институт по планинско животновъдство и земеделие, ул. "Васил Левски" 281, 5600 Троян, България
**E-mail: ivantsvetkov@abi.bg*

Affinity and growth dynamic of selected wild grape form (*Vitis vinifera* ssp. *sylvestris*) grafted on different rootstocks

Ivan Tsvetkov[1]*, Maria Georgieva[2], Teodora Dzhambazova[1]

[1]Agrobioinstitute, 8 Dragan Tsankov Blvd., 1164 Sofia, Bulgaria
[2]Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, 281 Vasil Levski Str., 5600 Troyan, Bulgaria

РЕЗЮМЕ

Загубата на биологично разнообразие е основен проблем на лозарството в света. Последният доклад на Осмата сесия на работната група на Междуправителствената Техническа Работна Група за Растителни Генетични Ресурси показва, че само 8-9 процента от наличните световни сортове се използват за производство грозде и вино (FAO, 2016). Основният път за решението на този нарастващ проблем е подобряването на генетичните и селекционните програми при лозата, чрез ефективно използване на генетичния потенциал на непроученото местно биоразнообразие (ЕС, 2013). В случая на дивата лоза, друг съществен проблем е загубването на вече маркирани индивидуални форми поради климатични промени, урбанизация или промяна на статуса на естествените им местообитания. Това предполага търсене на

SUMMARY

Biodiversity loss is a major problem in viticulture worldwide. The last report of the Eighth Session of the Intergovernmental Technical Working Group on Plant Genetic Resources showed that only 8-9 percent of the available world varieties are used for grape and wine production (FAO, 2016).

Principal way to the resolution of this growing problem is the improvement of the grapevine genetic and breeding programs by effective use of the genetic potential of unexplored local biodiversity (EC, 2013).

In the case of wild grape, another significant problem is the loss of already tagged individual forms due to climate change, urbanization or change the status of their natural habitats. This assumes finding ways for initial preservation and

начини за първоначално съхранение и размножение чрез ин витро култури и включване на адаптирани индивидуални образци в генбанки и ампелографски колекции.

Целта на настоящото изследване е да проучи афинитета и динамиката на растеж на селектирана и размножена форма дива лоза, присадена върху 4 различни подложки, подходящи за условията на България. Резултатите показват сравнително добър афинитет на дивата лоза към всички изследвани подложки (варираш от 75 % до 91 %). По отношение да динамиката на растеж на присадените растения, при подложката SO_4 са получени най-добри комплексни резултати по отношение на растежни показатели и едногодишен зрял прираст.

Ключови думи: *Vitis vinifera* ssp. *Sylvestris*, лозови генетични ресурси, агробиоразнообразие, опазване на биологичното разнообразие

propagation by in vitro cultures and include adopted individual accessions in genebanks and ampelographic collections.

The purpose of this study is to explore the affinity and dynamics of growth of selected and reproduced form wild grape grafted on four different rootstocks suited to the conditions of Bulgaria. The results show a relatively good affinity of wild grape to all tested rootstocks (ranging from 75% to 91%).

With regard to the dynamics of growth of the grafted plants, the rootstock SO_4 received best comprehensive results in terms of growing parameters and mature-year shoots yield.

Key words: *Vitis vinifera* ssp. *Sylvestris*, grapevine genetic resources, agrobiodiversity, biodiversity conservation

УВОД

Лозарството допринася с приблизително 15 милиарда евро годишно за икономиката на ЕС и отговаря за повече от 200 000 преки работни места (EC, 2012). Въпреки споменатото по-горе икономическо и глобално значение, генетичният потенциал на лозата остава недостатъчно изследван, с около 10 000 сорта лоза по света, от които само 35 представляват 66% от лозята. Тенденциите през последното десетилетие са още по-обезпокоителни – почти половината от световните насаждения са отчетени с 21 сорта през 2000 г. и само с 15 през 2010 г. (Anderson and Ariel, 2013). Много местни, както автохтонни, така и новосъздадени сортове могат да бъдат загубени, тъй като техният търговски потенциал се пренебрегва, което драстично намалява генетичното биоразнообразие на лозата (Carimi et al., 2012; Biagini et al., 2016).

Вътревидовото богатство и разнообразие на различните биотипове

INTRODUCTION

The viticulture contributes by approximately €15 billion annually to the EU economy and is responsible for more than 200,000 direct job positions (EC, 2012). Despite the above mentioned economic and global importance, the genetic potential in grape remains undiscovered with about 10,000 grape varieties worldwide from which only 35 account for 66% of the vineyards. The trends in the past decade are even more disturbing – almost half the world's plantings were accounted to 21 varieties in the year 2000, and to only 15 in 2010 (Anderson and Ariel, 2013). Many local, both autochthonous and newly bred, varieties may be lost as their commercial potential is ignored which is reducing drastically the grapevine genetic biodiversity (Carimi et al., 2012; Biagini et al., 2016).

Within species richness and diversity of the different biotypes, wild диви лози са естествена предпоставка за обогатяване на генофонда (Tsvetkov et al., 2006; Oceta et al., 2007), чрез отбор на форми с повишена устойчивост към биотичен и абиотичен стрес и други стопански ценни качества, които имат важно значение за генетиката и селекцията (Arroyo-Garcıa and Revilla, 2013, Cantos et al., 2017).

Целта на настоящото изследване е да проучи афинитета и динамиката на растеж на селектирана и размножена форма дива лоза, присадена върху 4 различни подложки, подходящи за условията на България.

grapes are natural prerequisite for enrichment of the gene pool (Tsvetkov et al., 2006; Oceta et al., 2008), by selection of forms with increased resistance to biotic and abiotic stress and other economically valuable qualities that are important for the genetics and breeding (Arroyo-Garcıa and Revilla, 2013, Cantos et al., 2017).

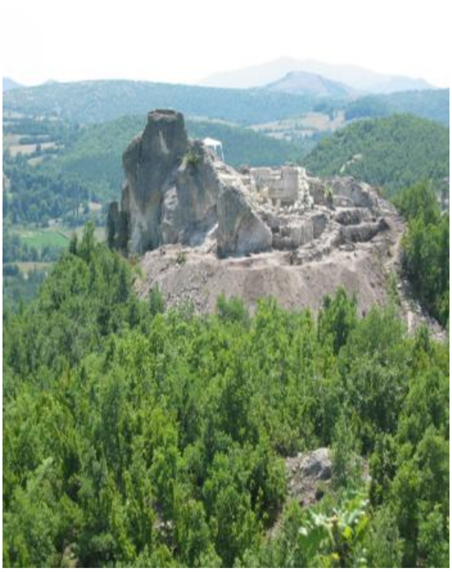
The purpose of this study is to explore the affinity and dynamics of growth of selected and reproduced form wild grape grafted on four different rootstocks suited to the conditions of Bulgaria.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Селектирана е подходяща диворастяща форма *Vitis vinifera* L. ssp. *sylvestris* (Т-1) открита през 2004 година, в подножието на югоизточните Родопи, в района на тракийското светилище край село Татул (369 m надморска височина) (Фигура 1).

MATERIAL AND METHODS

It was selected a suitable wild-type form of Vitis vinifera L. ssp. Sylvestris (T-1), discovered in 2004, at the foot of the southeastern Rhodope Mountains, in the region of the Thracian sanctuary, near the village of Tatul (369 m above sea level) (Figure 1).



Фиг. 1. Тракийското светилище край с. Татул
Fig. 1. Thracian sanctuary nearby v. Tatul

След първоначални фитопатологични (Genov et al., 2006; Kamenova et al., 2007) и молекулярни (Dzhambazova et al., 2009)

After initial phytopathological (Genov et al., 2006; Kamenova et al., 2007) and molecular (Dzhambazova et al., 2009) анализи и микровинификация (Dincheva et al., 2011), са взети 2 двупъпкови зрели резници, които са вкоренени и включени като изходни образци в лозовата генбанка на Агробиоинститут - София. Същите са използвани като източник за изходни експланти за ин витро въвеждане и микроразмножаване. Ограничен брой адаптирани ин витро растения са засадени на поле, с цел първично преразмножаване и включване в селекционни програми. За сравнителните проучвания по отношение афинитет и влияние върху динамиката на растеж са използвани лозови растения, получени чрез присаждане на зрели резници от Т-1 преразмножения материал, върху утвърдени в практиката лозови подложки: два клона (102 и РТ) на подложката SO4 (*V. berlandieri* x *V. riparia*, sel. Oppenheim 4), 41 B кл. 195 (*V. vinifera* cv. Chasselas x *V. berlandieri*) и Феркал кл. 262 (BC1 x 333 EM). Проучванията по отношение на адаптацията, афинитета и динамиката на растеж са осъществени по стандартни методики, описани от Babrikov (1979), Lilov (1979) и Radulov et al. (1992). За получаването на експерименталните растения е приложена утвърдена технология за производство на лозов посадъчен материал по картонажен метод на Опитна станция по лозарство и винарство, гр. Септември (Tsvetkov et al., 2007) (Фигура 2).

analyzes, and microvinification (Dincheva et al., 2011), two buds mature cuttings were taken, which were rooted and included as starting specimens in the grapevine genebank of Agrobinoinstitute-Sofia. They are used as a source for initial explants for in vitro insertion and micropropagation. A limited number of adapted in vitro plants are planted in a field for primary replication and inclusion in breeding programs. For the comparative studies on affinity and influence on growth dynamics, it was used grapevine plants, obtained by grafting of mature shoots of T-1 pre-propagated material on approved in practice grapevine rootstocks: two clones (102 and PT) of the SO4 rootstock *(V. berlandieri* x *V. riparia*, sel. Oppenheim 4), 41 B clone 195 (*V. vinifera* cv., Chasselas x *V. berlandieri*) and Fercal clone 262 (BC1 x 333 EM).

Studies concerning adaptation, the affinity and the dynamics of growth were carried out by standard methods, described by Babrikov (1979), Lilov (1979) and Radulov et al. (1992). For the production of the experimental plants, a well-established technology for the production of grapevine planting material by cartonage method of Experimental Station of Viticulture and Wine-growing-Septemvri was applied (Tsvetkov et al., 2007) (Figure 2).

Фиг. 2. Дивата лоза (Т-1): естественото местообитание – ин витро микроразмножаване – първично преразмножение – присаждане върху лозови подложки – засаждане на присадените растения

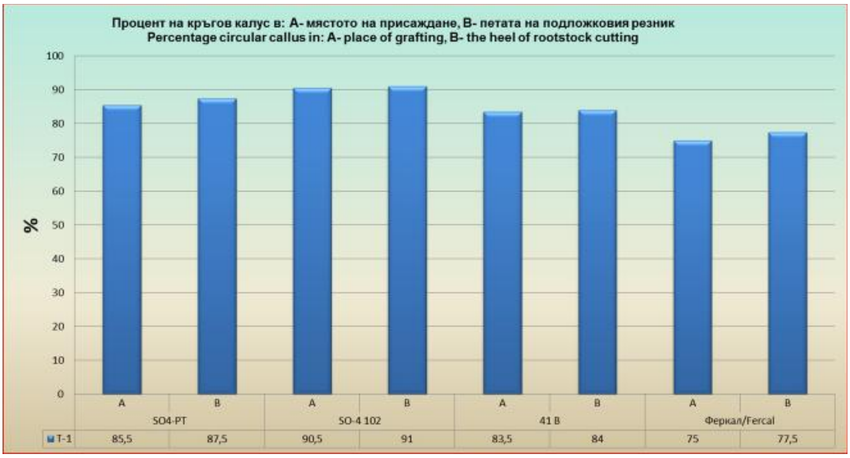
Fig. 2. The wild grape (T-1): natural habitat – in vitro micropropagation – first pre-propagation – grafted on grapevine rootstock – planting of grafted plants

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Резултатите показват сравнително добър афинитет на дивата лоза (Т-1) към всички изследвани подложки (процент кръгов калус вариращ от 75 % до 90,5 % в мястото на присаждане и съответно от 77,5% до 91% – в петата на подложковия резник) (Фигура 3).

RESULTS AND DISCUSSION

The results show a relatively good affinity of wild-type grapevine (T-1) to all tested rootstocks (percentage of circular callus ranging from 75% to 90.5% at the place of grafting and 77.5% to 91%, at the heel of rootstock cutting, respectively) (Figure 3).



Фиг. 3. Афинитет и калусообразуване на присадените растения
Fig. 3. Affinity and callus formation of the grafted plants

По-ниският процент калусообразуване, получен при варианта с подложката Феркал е сходен с подобни изследвания за афинитета на същата подложка към различни комерсиални сортове лози (Gokbayrak et al., 2007). По отношение да динамиката на растеж на присадените растения, при подложката SO_4 кл. 102 са получени най-добри комплексни резултати по отношение на растежни показатели (Таблица 1) и едногодишен зрял прираст (Фигура 4). Предстоят следващи експерименти, свързани с проучване на влиянието на различните подложки върху количеството и качеството на плодовете и с цел подобряване на рандемана на генотипа с балансирано запазване на качествените характеристики. Част от представените изследвания са дискутирани и одобрени като примери за иновативни практики за устойчиво използване на биоразнообразието за подобряване на селекционните

The lower percentage callus formation obtained with the Fercal rootstock variant is analogous to similar affinity studies of the same rootstock to different commercial varieties of grapevines (Gokbayrak et al., 2007). Regarding the growth dynamics of the grafted plants, the best complex results were obtained in the rootstock SO_4 cl. 102 with respect to the growth indicators (Table 1) and one-year maturity increase (Figure 4).

Future experiments are under way to study the impact of different rootstocks on the quantity and quality of fruits and to improve the yield of genotype with a balanced preservation of the quality characteristics. Part of the presented study have been discussed and approved as examples of innovative practices for sustainable use of grapevine biodiversity for improving the breeding qualities and tolerance to качества и толерантността към стресови фактори на лозата на Първата Работна Среща на Европейските Експерти към Фокус Група 23 „Болести и неприятели в лозарството“ на Европейското Партньорство за Иновации в областта на селското стопанство (EIP-AGRI), 25-26.10.2016, гр. Порто, Португалия (https://ec.europa.eu/eip/agriculture/en/content/diseases-and-pests-viticulture).

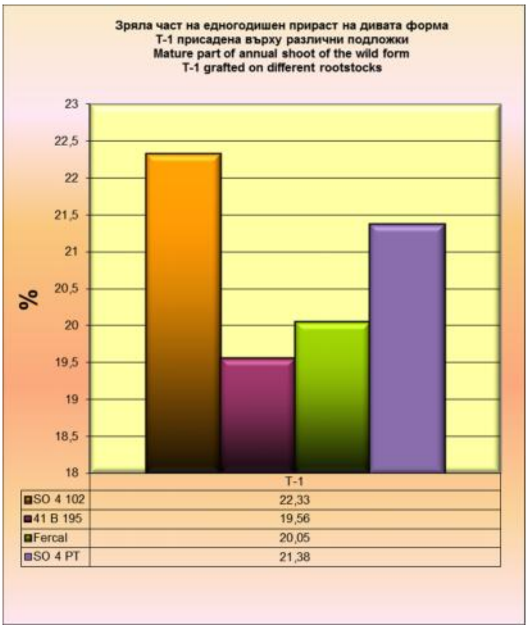
stress factors at the First Working Meeting of European Experts on Focus Group 23 "Pests and diseases in viticulture" of the European Innovation Partnership for Agriculture (EIP-AGRI), 25-26.10.2016, Porto, Portugal (https://ec.europa.eu/eip/agriculture/en/content/diseases-and-pests-viticulture).

Таблица 1 / Фигура 4. Динамика на растеж и зряла част на едногодишен прираст на присадените растения

Table 1 / Figure 4. Growth dynamic and mature part of annual shoots of the grafted plants

Варианти Variants	Вкоренени лози Rooted grapevines (%)	Брой стъпални корени Number of stepping roots (дебелина над 1mm) (thickness over 1 mm)	Средна дължина на 1 корен Average length of 1 root (cm)	Брой леторасти Number of shoots (на 1 лоза) (per 1 plant)	Средна дължина на едногодишен прираст Average length of annual shoot (cm)	Средна дебелина на едногодишен прираст Average thickness of annual shoot lenght (mm)
SO4 PT/T-1	84	12,6	19,2	2	81,60	3,76
41B 195/T-1	76	12,8	17,8	2	66,36	3,44
Fercal/T-1	68	12,5	16,5	2	51,84	3,22
SO4 102/T-1	92	13,1	19,7	2	82,76	4,09

Legend: T-1 - Tracian sanctuary wild grape form, rootstocks: SO 4 (*V. Berlandieri* x *V. Riparia*), 41 B (*V.vinifera* x *V.berlandieri*), Fercal (сложен хибрид между BC1 (*Berlandieri* x *Colombard*) x 333EM (Cabernet Sauvignon x *Berlandieri*).



ИЗВОДИ

1. Резултатите показват сравнително добър афинитет на дивата лоза към всички изследвани подложки
2. По-ниският процент калусообразуване, получен при варианта с подложката Феркал е сходен с подобни изследвания за афинитета на същата подложка към различни комерсиални сортове лози
3. По отношение да динамиката на растеж на присадените растения, при подложката SO_4 кл. 102 са получени най-добри комплексни резултати по отношение на растежни показатели и едногодишен зрял прираст

CONCLUSIONS

1. The results show a relatively good affinity of wild grape to all tested rootstocks
2. The lower percentage callus formation obtained with the Fercal rootstock variant is analogous to similar affinity studies of the same rootstock to different commercial varieties of grapevines
3. Regarding the growth dynamics of the grafted plants, the best complex results were obtained in the rootstock SO4 cl. 102 with respect to the growth indicators and one-year maturity increase

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Anderson, K. and N. Aryal**, 2013. Which Winegrape Varieties are Grown Where?: A Global Empirical Picture, University of Adelaide Press.
2. **Arroyo-Garcıa, R. and E. Revilla**, 2013. The current status of wild grapevine populations (Vitis vinifera ssp sylvestris) in the Mediterranean basin. In: The Mediterranean Genetic Code - Grapevine and Olive, D. Poljuha, B. Sladonja (Eds.), In Tech, Rijeka (Croatia), 51-72.
3. **Babrikov, D.**, 1979. A study of rooting in cuttings of internodes and its impact on the yield of premium vine. Scientific papers HAI "V. Kolarov" Plovdiv, № 3, 43-53 (Bg).
4. **Biagini, B., S. Imazio, A. Scienza, O. Failla, G. De Lorenzis**, 2016. Renewal of wild grapevine (Vitis vinifera L. subsp. sylvestris (Gmelin) Hegi) populations through sexual pathway: some Italian case studies. *Flora*, 219, 85-93.
5. **Cantos, M., R. Arroyo-García, J. García, M. Lara, R. Morales, M. Lopez, A. Gallardo , C. Ocete, A. Rodrıguez, J. Valle, R. Vaca, M. Gonzalez-Maestro, H. Banati, R. Ocete**, 2017. Current distribution and characterization of the wild grapevine populations in Andalusia (Spain). *Comptes Rendus Biologies*, 340(3), 164-177.
6. **Carimi, F., R. Pathirana and A. Carra**, 2012. Biotechnologies for grapevine germplasm management and improvement. In: Grapevines: Varieties, Cultivation and Management, PV Szabo & J Shojania (eds.), Nova Science Publisher, New York, 199-249.
7. **Dincheva, I., I. Badjakov, I. Tsvetkov, T. Dzambazova, V. Kondakova, R. Batchvarova**, 2011. GC-MS determination of secondary metabolites in red wine from Bulgarian wild grape (Vitis vinifera ssp. sylvestris). *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans*, 14(6), 1331-1343.
8. **Dzhambazova, T., I. Tsvetkov, I. Atanassov, K. Rusanov, J. Martínez-Zapater, A. Atanassov, T. Hvarleva**, 2009. Genetic diversity in native Bulgarian grapevine germplasm ("Vitis vinifera" L.) based on nuclear and chloroplast microsatellite polymorphisms. *Vitis: Journal of Grapevine Research*, ISSN 0042-7500, 48(3), 115-121.
9. **European Commission**, 2012. Report from the Commission to the European Parliament and the Council, Brussels, 184-185.

10. **European Commission**, 2013. Agricultural Genetic Resources - from conservation to sustainable use. Report from the Commission to the European Parliament, the Council and the European Economic and Social Committee, EC (eds.), Brussels, 2-13.
11. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, 2016. Report of the Eighth session of Intergovernmental Technical Working Group on Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. Commission on genetic resources for food and agriculture (eds.), FAO, Rome, 1-17.
12. **Genov, I., I. Atanassov, I. Tsvetkov, A.Atanasov**, 2006. Isolation and characterization of Agrobacterium strains from grapevines in Bulgarian vineyards and wild grapes V. vinifera ssp. Sylvestris. *Vitis: Journal of Grapevine Research*, 45 (2), 97-101.
13. **Gokbayrak, Z., G. Soylemezoglu, M. Akkurt, H. Celik**, 2007. Determination of grafting compatibility of grapevine with electrophoretic methods. *Scientia horticulturae*, 113(4), 343-352.
14. **Kamenova, V., I. Tsvetkov and A. Atanassov**, 2007. Virus testing of grapevine certified material in Bulgaria. *Biotechnology & Biotechnology Equipment*, 21(1), 66-68.
15. **Lilov, D.**, 1979. Biological fundamentals of affinity in grapevine. Publishing House of BAS, 35-79 (Bg).
16. **Oceta, R., M. Lopez, A. Gallardo, C. Arnold**, 2008. Comparative analysis of wild and cultivated grapevine (Vitis vinifera L.) in the Basque region of Spain and France. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 123, 95-98.
17. **Radulov, L., D. Babrikov and S. Georgiev**, 1992. Ampelography with fundamentals of enology. HAI Plovdiv (eds.), 34-45 (Bg).
18. Tsvetkov, I., A. Atanassov, M. Jankulova, V. Vulchev, I. Todorov, S. Pandeliev, I. Malenin, K. Katerov, Y. Tsvetkov, T. Hvarleva, I. Genov, T. Dzambazova, I. Antonov, L. Marinov, E. Dimitrov, M. Panamska, G. Varadinova, K. Slavova, I. Atanassov, G. Shishmanov, V. Yaneva, N. Ivanova, P. Nikolov and M. Laginova, 2006. Development and Evaluation of a Bulgarian Grapevine Genebank. In: Proceedings of 15th meeting of the International Council for the Study of Virus and Virus-like diseases of the Grapevine, 3-7.04.2006, Stellenbosch, South Africa, G. Martelli (eds.), 261-263.
19. **Tsvetkov, Y., N. Taneva and K. Pondev**, 2007. Technology for the production of grafted rooted plants by cartonage method. *Viticulture and En*ology, 5 (an.), 1-24 (Bg).
20. https://ec.europa.eu/eip/agriculture/en/content/diseases-and-pests-viticulture