Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2017, 20 (1), 267-277
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan
ISSN 1311-0489 (Print)
ISSN 2367-8364 (Online)

Влияние на генотипа върху развитието на болестния процес при български популации от блатно кокиче (*Leucojum aestivum* L.)

Лилия Георгиева[1]*, Виолета Кондакова[1], Иван Цветков[1], Мария Стоянова[2], Мария Георгиева[3]

[1]Агробиоинститут Агробиоинститут, бул. Драган Цанков 8, 1164 София, България
[2]Институт по почвознание, агротехнологии и защита на растенията "Никола Пушкаров", Шосе "Банкя" 7, 1080 София, България
[3]Институт по планинско животновъдство и земеделие, ул. "Васил Левски" 281, 5600 Троян, България
**E-mail: lilka81@abv.bg*

Influence of genotype on the development of the disease process in Bulgarian populations of summer snowflake (*Leucojum aestivum* L.)

Liliya Georgieva[1]*, Violeta Kondakova[1], Ivan Tsvetkov[1], Mariya Stoyanova[2], Maria Georgieva[3]

[1]Agrobioinstitut, 8 Dragan Tsankov Blvd., 1164 Sofia, Bulgaria
[2]Institute of Soil Science, Agro-technology and plant protection "Nikola Pushkarov", 7 Shousse Bankya Str., 1080 Sofia, Bulgaria
[3]Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, 281 Vasil Levski Str., 5600 Troyan, Bulgaria

РЕЗЮМЕ

Блатното кокиче е ценен, застрашен вид, от който се произвежда българското лекарство Нивалин®. Проведени са изкуствени заразявания в стерилни условия на *in vitro* луковички от 6 естествени български популации на блатно кокиче с 4 бактериални изолата от луковици със симптоми на гниене. Проследена е появата на симптоми на 3-ти, 6-ти и 9-ти ден след заразяването. Изчислен е процентът заразени луковички от всеки изолат. Резултатите показват,че проявата на вирулентност на патогена е в зависи-

SUMMARY

Summer snowflake is a valuable, endangered species, from which the Bulgarian drug Nivalin® is produced. The artificial infections were carried out in sterile conditions on *in vitro* bulbs from six natural populations of Bulgarian summer snowflake with 4 bacterial isolates from bulbs with symptoms of decay. The symptoms were traced on the 3rd, 6th and 9th day after infection. The percentage of infected bulbs from each isolate was calculated. The results showed that the expression of virulence of the pathogen is dependent on the genotype of the plants,

мост от генотипа на растенията, дори на ниво популации.

Ключови думи: блатно кокиче, бактериално гниене, изкуствено зразяване, взаимодействие растение-патоген

УВОД

Блатното кокиче (*Leucojum aestivum* L.) е луковично, медицинско растение от семейство Amarillydace. Екстракти от представители на това семейство са с доказани антибактериални, антивирусни и антигъбни ефекти (Sener *et al*, 1998; Szlávik et al., 2004). Високото съдържание на галантамин прави блатното кокиче ценен източник на световноизвестния български препарат Нивалин®, който се използва за лечение на тежки невродегенеративни заболявания като болестта на Алцхаймер. Естествените находища на блатното кокиче в България са ценни заради високото съдържание на галантамин в тях, в сравнение с популациите в други балкански страни (Stefanov, 1990). У нас блатното кокиче е разпространено в ниските и влажни гори, мочурливите, периодично-заливащи се ливади и крайречни тераси, по поречията на реките Тунджа, Марица, Дяволска, Факийска, Камчия и по протежение на р. Дунав. (Astadjov, 1980). Дунавските популации са най-богати на алкалоида хомоликорин, Камчийските – на алкалоида ликорин, а тези в южна България синтезират най-вече галантамин в различни количества (Georgieva et al, 2007; Berkov et al., 2013).

Наличният природен запас на *Leucojum aestivum L.* в България, определя необходимостта от планиране на дългосрочна програма за мултидисциплинарни проучвания, свързани със съхранението, поддържането и ефективното използване на този уникален растителен вид.

Почти липсват сведения за патогени при блатното кокиче, като изключим няколко съобщения за гъбни болести в изкуствени насаждения преди повече от 10 години) (Russeva, 1984; Mirkova and Karadzhova, 1993). Не е ясно дали има

even at population levels.

Key words: summer snowflake, bacterial decay, artificial infection, plant-pathogen interactions

INTRODUCTION

Summer snowflake (*Leucojum aestivum* L.) is a medical bulbous plant which belongs to the Amarillydaceae family. Its extracts have proven antibacterial, antiviral, and antifungal effects (Sener et al., 1998; Szlávik et al., 2004). The high content of galantamine makes L. aestivum a valuable resource for the world-known Bulgarian medicine Nivalin® (galantamine hydrobromide), which is used for the treatment of severe neurodegenerative diseases like Alzheimer's disease. The natural habitats of summer snowflake in Bulgaria are valuable because of their high galantamine content compared to populations in other Balkan countries (Stefanov, 1990). The Bulgarian summer snowflake is spread in low, wet forests, wetlands, periodically swamped meadows and riverside terraces along the rivers Tundzha, Maritsa, Diyavolska, Fakiyska, Kamchia and the the Danube (Astadjov, 1980). The Danube populations are most rich in the alkaloid homolycorine, those around Kamchia - in lycorine, while those in southern Bulgaria synthesize mostly galantamine in varying amounts (Georgieva et al., 2007; Berkov et al., 2013).

The available natural reserve of *Leucojum aestivum* L. in Bulgaria determines long-term multidisciplinary studies related to the presevation, maintenance and effective use of this unique plant species.

There are almost no reports of pathogens in *Leucojum sp*., except for a few ones of fungal diseases in plantations more than 10 years ago (Ruseva, 1984; Mirkova and Karadzhova, 1993). There is no information are there more pathogens

други и по какъв начин влияят върху съдържанието на галантамин в растенията. В света са известни голям брой фитопатогенни бактерии по луковичните растения от други семейства, по-голямата част от които са нови видове или видове с установени нови уникални свойства на антагонисти и биоремедиационни агенти (Bradbury, 1986; Schaad, 2001).

В предишни изследвания (Stoyanova et al., 2012), бяха регистрирани симптоми на бактериално гниене в растения от региона на гр. Тутракан (близо до р. Дунав, обл. Силистра). Общо 10 бактериални изолата бяха изолирани от луковиците. Патогеността на изолатите беше потвърдена чрез изкуствени заразявания на люспи от блатно кокиче и други гостоприемници (лук, зюмбюл, лале, нарцис). Част от изолатите бяха идентифицирани до вид, чрез секвенционен анализ на гена за 16S рРНК. Резултатите от секвенирането показаха съвпадения за *Serratia plymuthica* 97-98% (три изолата), *Rahnella aquatilis* 95% (един изолат), *Bacillus subtilis* 96% (1 изолат), *Stenotrophomonas maltophilia* 98%.(1 изолат).

Целта на настоящото изследване е да се определи патогенността на новите изолати върху луковици от блатно кокиче от различни български популации. Поради защитения статус на блатно кокиче (Gussev et al., 2007) изкуствените заразявания са извършени върху луковички размножени *in vitro.*, което намалява риска получените симптоми да се дължат на вторична инфекция.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Растителен материал: При изкуствените заразявания са използвани *in vitro* луковички във фаза първи лист, нарязани на половинки. Те са размножени и поддържани както е описано от Georgieva *et al.* (2010). Селектирани са 6 клона с произход землищата на Присад (обл. Бургас), Свиленград (обл. Хасково), Виница (обл. Пловдив), Кочово (обл. Шумен), Палаузово и Ямбол (обл. Ямбол) (Georgieva *et al*., 2007).

and how they affect the galantamine contents in plants. However, different bacterial phytopathogens have been described on bulbous plants from other families, many of which are new species or species with new unique properties of antagonists and bioremediation agents (Bradbury, 1986; Schaad, 2001).

In previous studies (Stoyanova et al., 2012), symptoms of bacterial decay in plants from the region of Tutrakan (near the Danube River, Silistra region) it was found. A total of 10 bacterial isolates were separated from their bulbs. Their pathogenicity was confirmed by artificial inoculation on scales of the summer snowflake and other hosts (onion, hyacinth, tulip, and narcissus). Some of the isolates were identified by sequence analysis of the 16S rRNA gene. Sequencing results showed matches for *Serratia plymuthica* 97-98% (three isolates), *Rahnella aquatilis* 95% (one isolate), *Bacillus subtilis* 96% (1 isolate), *Stenotrophomonas maltophilia* 98% (1 isolate).

The purpose of this study was to determine the pathogenicity of the new isolates on bulbs of *Leucojum aestivum* from different Bulgarian populations. Because of protected status of summer snowflake (Gussev et al., 2007) the artificial inoculations were performed on bulbils propagated *in vitro* which reduces the risk that the resulting symptoms were due to a secondary infection.

MATERIAL AND METHODS

Plant material: *In vitro* bulbs (first leaf phase), cut in halves were used for artificial inoculation. They were propagated and maintained according to Georgieva et al., (2010). Six clones were selected, originating from the territories of Prisad (Burgas region), Svilengrad (Haskovo reg.), Vinica (Plovdiv reg.), Kochovo (Shumen reg.), Palauzovo and Yambol (Yambol region) (Georgieva et al., 2007).

Бактериални изолати: Бактериалните изолати са поддържани на среди LB (Bertani, 1951) и KB (King's medium B) (King, 1954) и са описани подробно от Stoyanova *et al.* (2012).

Селектирани са 4 бактериални изолата, чиито вид е определен чрез секвенционен анализ на гена за 16S РНК: Изолат 1 - *Serratia plymuthica* (Genbank No. JF896806), Изолат 3 - *Serratia plymuthica* (JF896808), Изолат 5 - *Rahnella aquatilis* (JN400360), Изолат 6 - *Bacillus subtilis* (JN400359).

Приложен е **метод за изкуствено заразяване**, който е съобразен и адаптиран към целите на изследването. Използвани са не отделни люспи, а луковички нарязани надлъжно на половинки за да може да се наблюдава инфекциозността на бактериите върху всяка част от луковиците и всеки момент от инокулирането. Едновременно с това експлантите притежават сравнителна цялост (разполагат с всички части на луковичката (вътрешни, външни люспи, дънце, лист).

За всеки вариант са използвани по 12 половинки от луковички (надлъжно срязани). Нарязаните половинки са поставени в стерилни петрита с филтърна хартия, напоена с MS макросоли (Murashige and Skoog, 1962). Луковичките са инокулирани с по 10-20 µl бактериална суспензия чрез накапване. За всеки *in vitro* клон блатно кокиче е заложена контрола от същия клон, инокулирана с вода по същия метод.

Култивиране на заразените експланти*:* Вариантите от изкуствените заразявания (растение-бактерия) са поддържани в култивационно помещение за 9 дни (Georgieva *et al.* 2010). Развитието на инфекциозния процес е отчитано на всеки 3 дни (3, 6 и 9-ти ден след заразяването).

Статистически анализ: Резултатите са анализирани с помощта на софтуер Microsoft Excel 2013.

Bacterial strains: Bacterial isolates were maintained on both media - LB (Bertani, 1951) and KB (King's medium B) (King, 1954) and were described in details by Stoyanova et al. (2012).

Four bacterial isolates were selected and identified by sequence analysis of the 16S RNA gene: Isolate 1 - *Serratia plymuthica* (Genbank No. JF896806), Isolate 3 - *Serratia plymuthica* (JF896808), Isolate 5 - *Rahnella aquatilis* (JN400360), Isolate 6 - *Bacillus subtilis* (JN400359).

The **applied method of inoculation** has been suited and adapted to the purpose of the study. We have not used separate scales but bulbils that were cut longitudinally in halves in order for us to be able to monitor the infectivity of bacteria on any part of the bulb at any point of inoculation. At the same time explants possess relative integrity (with all parts of the bulbs (internal, external scales, basal steam, leaf).

For each variant 12 halves of the bulbs (longitudinal cut) were used. The halves were placed in Petri dishes with sterile filter paper soaked in MS macroelements (Murashige and Skoog, 1962) . Bacterial suspension was added to each half at an amount 10-20 µl. Sterile water instead of bacterial suspension was added to the control bulbs. For every inoculated clone *in vitro* bulb controls of the same clone were used.

Cultivation of the infected explants: The variants of the artificial infection (plant-bacterium) were maintained in a cultivation room 9 days (Georgieva et al., 2010). The development of the infectious process was recorded every 3 days (on the 3rd, 6th and 9th day after inoculation).

Statistical analyses: The results were analyzed with the commercial spreadsheet application Microsoft Excel 2013.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Контролните луковички запазиха вида си в продължение на целия период на анализ. Поради много

RESULTS AND DISCUSSION

The control bulbs kept their appearance for the entire period of the study. Because of the very similar

сходния външен вид на контролите е показана само тази с произход Виница като пример (Фигура 1).

appearance of controls, only the one of Vinica origin is shown as an example (Figure 1).

Фиг. 1. Контроли - *in vitro* луковички с произход Виница на 3-ти, 6-ти и 9-ти ден (от ляво надясно)
Fig. 1. Controls - *in vitro* bulbs originating from Vinica on days 3rd, 6th and 9th (from left to right)

Заразявания с Изолат 1 - *Serratia plymuthica*

При инокулиране с бактериалния Изолат 1 на *in vitro* луковички, получени от различни популации, засегнатите тъкани на луковичките имат кремав цвят и водниста консистенция. Те постепенно потъмняват до тъмнокафяво и в последствие изсъхват. Най-често се засяга най-вътрешния слой. Първите симптоми се появяват след 3-тия ден от заразяването, но не при всички експланти. До 9-ия ден от инокулирането симптоми проявиха четири произхода - Присад, Виница, Свиленград и Кочово, а при Палаузово и Ямбол нямаше проява на симптоми (Фигура 2). Този изолат засяга приблизително 1/5 от всички експланти.

Inoculation with Isolate 1 - *Serratia plymuthica*

The inoculation with the bacterial Isolate 1 of *in vitro* bulbs, obtained from different populations caused creamy color and a watery consistency of the affected bulb tissue. Their color gradually changes to dark brown and they subsequently wither. The inner layers were affected primarily. The first symptoms were appeared after the 3rd day of infection, but not with all explants. By the 9th day of inoculation symptoms were observed on bulbs from four origins - Prisad, Vinica, Svilengrad and Kochovo, whereas the bulbs from Palauzovo and Yambol had no symptoms (Figure 2). This isolate affected approximately 1/5 of all explants.

Фиг. 2. Симптоми при изкуствено заразени луковички с Изолат 1 на 9-ти ден след заразяването от Присад, Виница, Кочово (от ляво надясно)
Fig. 2. Symptoms of bulbs inoculated with Isolate 1 on the 9th day after the infestation by Prisad, Vinica, Kochovo (from left to right)

Фиг. 3. Симптоми на експланти, инокулирани с Изолат 3 проследени на 3-ти, 6-ти и 9-ти ден

Fig. 3. Symptoms of bulbs inoculated with Isolate 3 on days 3rd, 6th and 9th

Легенда: Пр – Присад, Св – Свиленград, Вн – Виница, Пл – Палаузово, Ям – Ямбол

Legend: Пр – Prisad, Св – Svilengrad, Вн – Vinica, Пл – Palauzovo, Ям – Yambol

Заразявания с Изолат 3 - *Serratia plymuthica*

При инокулиране с изолат 3 се наблюдават силно изразени симптоми върху растителните тъкани, които се появяват още на втория ден след инокулирането. Първоначално патогенът засяга сърцевината на луковичката, постепенно инфекцията засяга периферните люспи и до 9-тия ден почти всички експланти загиват. Цветът на засегнатите тъкани е тъмно-сивкав. Излъчват силна, неприятна миризма. Изолат 3 (*Serratia plymutica*) засяга средно над 75% от инокулираните луковички. Въпреки това се наблюдават различия в симптоматологията при различните генотипи. Най-слаба е реакцията на луковички от Ямбол и Кочово, при които тъканите изглеждат тъмни и сухи (около 50 %), Експлантите от Присад и Свиленград се засягат 100% и при тях се проявява мокро гниене. При останалите три генотипа (Виница, Палаузово и Присад) оцеляха по-малко от 25% (Фигура 3, 6).

Inoculation with Isolate 3 - *Serratia plymuthica*

Inoculation with isolate 3 was caused strongly expressed symptoms on plant tissues that appeared on the second day after inoculation. Initially, the pathogen affects the pith of the bulb, gradually the infection affects the peripheral scales, and by the 9th day, almost all the explants died. The color of the affected tissues was dark-gray. They emit a strong, unpleasant smell. Isolate 3 (*Serratia plymutica*) affects on average more than 75% of inoculated bulbs. However, there were differences in symptomatology in different genotypes. The weakest is the reaction of bulbs from Yambol and Kochovo, where the tissues look dark and dry (about 50%), Explants from Prisad and Svilengrad were affected 100% and they show wet decay. The remaining three genotypes (Vinica, Palauzovo and Prisad) survived less than 25% (Figures 3, 6).

Заразяване с Изолат 5- *Rahnella aquatilis*

При заразяване с Изолат 5 симптоми се появат на 5-6-ти ден след инокулирането. Засягат се главно вътрешните и някои периферни люспи, а петната са тъмни и засъхващи. Такава реакция се наблюдава в луковички от Присад, Свиленград, Виница и Кочово, а при тези от Палаузово и Ямбол не се наблюдаваха симптоми (Фигура 4, 6). Средно 14 % от експлантите от всеки клон бяха засегнати.

Inoculation with Isolate 5- *Rahnella aquatilis*

5-6 days after inoculation with Isolate 5, symptoms was occurred. It affected mainly the inner and some peripheral scales, and the spots were dark and dry. Such a reaction was observed in bulbs from Prisad, Svilengrad, Vinica and Kochovo, but in those from Palauzovo and Yambol no symptoms were observed (Figures 4, 6). An average of 14% of the explants from each clone were affected.

Фиг. 4. Симптоми при изкуствено заразени луковички с Изолат 5 на 9-ти ден след заразяването от Свиленград, Виница и Палаузово (от ляво надясно)
Fig. 4. Symptoms of bulbs inoculated with Isolate 5 on the 9th day after infection from Svilengrad, Vinica and Palauzovo (from left to right)

Заразяване с Изолат 6 - *Bacillus subtilis*

Изолат 6 също засяга частично инфектираните с него луковички. Много експланти останаха незасегнати, а при останалите повредите бяха главно периферни и много тъмни на цвят. Изолат 6 е един от най-слабо патогенните изолати включени в нашето изследване. При експлантите от Присад, Палаузово и Ямбол не са наблюдавани симптоми след изкуственото заразяване. Много слаба реакция (под 10%) проявяваща се на 9-ия ден от инокулирането (потъмняване вътрешната част) е отчетена при луковичките с произход Виница, Кочово и Свиленград (Фигура 5, 6).

Inoculation with Isolate 6 - *Bacillus subtilis*

Isolate 6 also affects partially infected bulbs. Many explants were unaffected, and in others damage was mainly peripheral and with very dark color. Isolate 6 was one of the least pathogenic isolates included in our study. In explants from Prisad, Palauzovo and Yambol no symptoms were observed after the artificial inoculation. A very weak reaction (less than 10%) occurring on the 9th day of inoculation (darkening of the inner part) was recorded in the bulbs originating in Vinica, Kochovo and Svilengrad (Figures 5, 6).

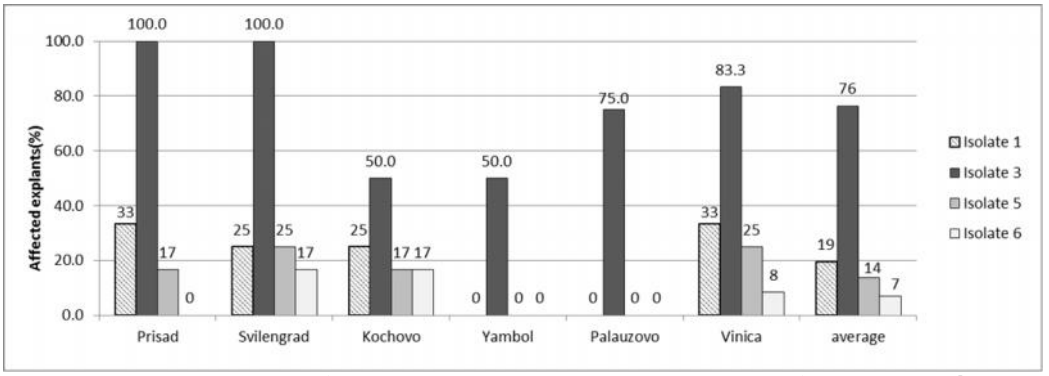
Фиг. 5. Симптоми при изкуствено заразени луковички с Изолат 6 на 9-ти ден след заразяването от Свиленград, Виница и Кочово (от ляво надясно)
Fig. 5. Symptoms of bulbs inoculated with Isolate 6 on the 9th day after the infection from Svilengrad, Vinica and Kochovo (from left to right)

При сравняване на броя заразени експланти Изолат 3 се откроява значително на фона на останалите тествани изолати (фиг. 6). Този щам засяга всички изкуствено заразени експланти от Присад и Свиленград, по-голямата част от експлантите от Палаузово и Виница и половината от Кочово и Ямбол. Същевременно това е единственият щам, който поразява луковичките от Ямбол и Палаузово (Фигура 6). Общият процент засегнати тъкани на 9-тия ден е над 80% (Фигура 7).

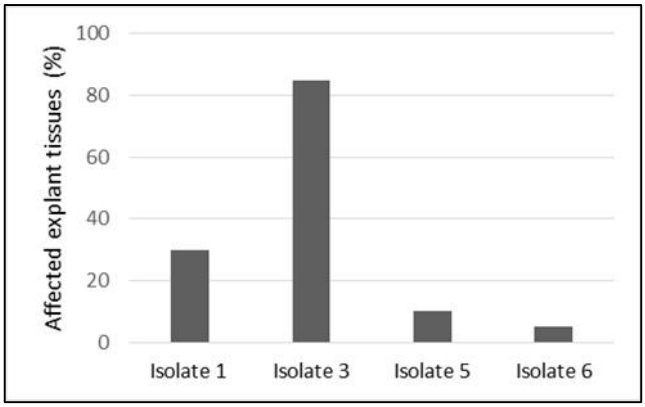
Най-слабо патогенен е Изолат 6, който заразява сравнително малък процент експланти от три находища, а процентът засегнати тъкани е със средна стойност едва 5% (Фигура 6, 7).

When comparing the number of infected explants, Isolate 3 stands out significantly against the background of the other isolates tested (Figure 6). This isolate affects all artificially infected explants from Prisad and Svilengrad, most of the explants from Palauzovo and Vinica and half of Kochovo and Yambol. At the same time this was the only isolate that was struggled the bulbs from Yambol and Palauzovo (Figure 6). The total percentage of affected tissues on the 9th day is over 80% (Figure 7).

The least pathogenic is Isolate 6, which infects a relatively small percentage of explants from three origins and the percentage of affected tissues is only 5% on average (Figures 6, 7).



Фиг. 6. Експланти от блатно кокиче със симптоми на бактериоза (% от общия брой инокулирани експланти от всеки клон)
Fig. 6. Summer snowflake explants symptoms of bacteriosis (in% of the total number of inoculated explants from each clone)



Фиг. 7. Засегнати тъкани на експланти от блатно кокиче (% от общия брой инокулирани експланти)
Fig. 7. Affected explant tissues (% of total inoculated explants)

Изолати 1 и 5 засягат сравнително близък брой луковички с изключение на тези от Присад (Фигура 6), но степента на нападение на отделните експланти е различна (съответно 30% и 10%) (Фигура 7).

Спрямо вирулентността и агресивността си изолатите се подреждат в реда: Изолат 3 >>> Изолат 1 > Изолат 5 > Изолат 6 , в който Изолат 1 изявява тези свойства в най-висока степен, а Изолат 6 – в най-ниска.

Според секвенционния анализ Изолат 1 и Изолат 3 са от един и същ вид (*Serratia plymutica*), но се характеризират с различна вирулентност и степен на нападение върху гостоприемника.

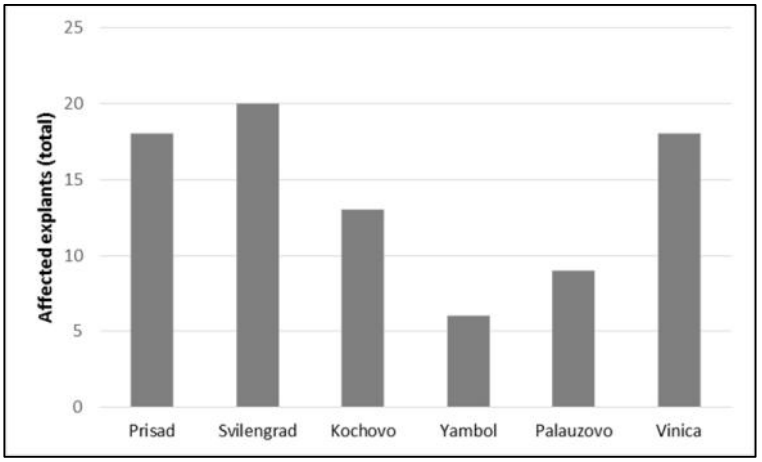
Isolates 1 and 5 relate to a relatively close number of bulbs, except those of Prisad (Figure 6), but the degree of invasion of individual explants was different (30% and 10%, respectively) (Figure 7).

About their virulence and aggression, the isolates were arranged in the order: Isolate 3 >>> Isolate 1> Isolate 5 > Isolate 6, In which Isolate 1 exhibits these properties to the highest degree, and Isolate 6 at the lowest.

According to sequencing analysis, Isolate 1 and Isolate 3 were of the same species (Serratia plymutica), but they had different virulence and host attack rate.

Проведеното изкуствено инокулиране на *in vitro* луковички с различен произход, дава информация за устойчивостта на всеки един генотип към тестваните патогени. Генотипите от Ямбол и Палаузово се оказаха устойчиви към 3 от общо 4 щама патогени, като генотипът от Ямбол се характеризира и с най-ниския отчетен процент засегнати луковички от най-вирулентния бактериален щам (Фигура 6). Най-голям брой експланти със симптоми на бактериоза се наблюдаваха при клоновете с произход Свиленград, Присад и Виница (Фигура 8), въпреки че експлантите с произход Присад не се заразиха с най-слабо вирулентния щам (Фигура 6).

The artificial inoculation of *in vitro* bulbs of different origins gives information on the stability of each genotype to the pathogens tested. The genotypes from Yambol and Palauzovo proved to be resistant to 3 of the 4 strains of pathogens and the genotype of Yambol was characterized by the lowest percentage of affected bulbs from the most virulent bacterial strain (Figure 6). The largest number of explants with symptoms of bacteriosis were observed in the clones originating from Svilengrad, Prisad and Vinnitsa (Figure 8), although Prisad origin explants did not infect the least virulent strain (Figure 6).



Фиг. 8. Засегнати експланти от блатно кокиче (общ брой за всеки клон)
Fig. 8. Affected explants from summer snowflake (total for each genotype)

Експлантите с произход Кочово представляват особен случай, в сравнение с останалите генотипи. Подобно на клона с произход Ямбол, броят заразени с най-вирулентния щам луковички е най-нисък - 50%. Същевременно този генотип се оказа чувствителен към всички тествани бактериални щамове и процентът заразени с най-слабо вирулентния щам луковички е най-висок - 17%.

Explains of Kochovo were a special case compared to other genotypes. Like the Yambol clone, the number of infected bulbs with the most virulent strain was the lowest - 50%. At the same time, this genotype was susceptible to all bacterial strains tested and the percentage infected with the least virulent bulb strain was highest - 17%.

ИЗВОДИ

Проведеното изследване на реакцията на *in vitro* луковички от блатно кокиче с различен произход, спрямо четири бактериални изолата ни дава основание да твърдим, че проявата на вирулентност

CONCLUSIONS

This study of the *in vitro* response of *in vitro* bulbs of summer snowflake of different origins to four bacterial isolates gives us reason to assert that the virulence of the pathogen is dependent on the

на патогена е в зависимост от генотипа на растенията. Според получените резултати, клоновете с произход Свиленград и Виница са най-чувствителни към изпитаните бактериални изолати, докато клон Ямбол се откроява като най-устойчив. Клон Присад също е сред чувствителните генотипи, но към три от изпитаните четири бактериални щама.

genotype of the plants. According to the results obtained, the clones originating in Svilengrad and Vinica were the most sensitive to the tested bacterial isolates, while the Yambol branch stands out as the most sustainable. Prison Branch was also among the sensitive genotypes, but three of the four tested bacterial strains.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Astadjov, N., Y. Dimitrov, St. Tsachev, T. Deneva, G Jurmanski., C. Zlatev, M. Todorov, G. Paskalev, 1980. Perspective medicinal plants, *Jusautor Sofia*, 56-74 (Bg).

2. Berkov, S., L. Georgieva, V. Kondakova, F. Viladomat, J. Bastida, A. Atanassov, C. Codina, 2013. The geographicisolation of *Leucojum aestivum* populations leads to divergation of alkaloid biosynthesis, *Biochemical Systematics and Ecology, 46*, 152-161.

3. Bertani, G., 1951. "Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*". *J. Bacteriol.*, *62,* 293-300.

4. Bradbury J., 1986. Guide to Plant Pathogenic Bacteria, CAB International, Mycological Institute, Kew, UK.

5. Georgieva, L., A. Atanassov, L. Davidkova, V. Kondakova, 2010. Long-term *in vitro* storage and multiplication of *Leucojum aestivum* L., *Biotechnol. & Biotechnol. Eq., 24(3)*, 1950-1954.

6. Georgieva, L., S. Berkov, V. Kondakova, J. Bastida, F. Viladomat, A. Atanassov, C. Codina, 2007. Alkaloid Variability *in Leucojum aestivum* from Wild Populations. *Z. Naturforsch*., 62c, pp.627-635.

7. Gussev, Ch., Y. Bosseva, B. Pandova, S. Yanev, M. Stanilova, 2007. Resource assessment of Leucojum aestivum L. (Amaryllidaceae) populations in Bulgaria. *Bocconea, 21,* 405-411.

8. King, E.O., M.K. Ward and D.E. **Raney**, 1954. Two simple media for the demonstration of pycocyanin and fluorescin*. J. Lab. Clin. Med., 44*, 301-303.

9. Mirkova, E. and J. Karadzhova, 1993. *Fusarium sp*. And *Sclerotium batatikola* threaten the summer snowflake. *Rastitelna Zashtita, 10* (Bg).

10. Murashige T. and Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15, 473-497.

11. Ruseva, N., 1984. Some diseases of snowflake and its control. *Rastitelna Zashtita, 32 (8),* 15-16. (Bg).

12. Schaad, N. W., J.B. Jones and W. Chun, 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Third Edition. *APS Press*.

13. Sener, B., F. Bingo, I. Erdogan, W.S. Bowers, P.H. **Evans**, 1998. Biological activities of some Turkish medicinal plants. *Pure & Appl. Chem., 70 (2)*, 403-406.

14. Stefanov, Zh., 1990. Ecobiological and Phytochemical Investigations of Natural Populations and Introduced Origins of Summer Snowflake (*Leucojum aestivum* L.) in Bulgaria. D.Sc. Thesis, NIHFI, Sofia, Bulgaria (Bg).

15. Stoyanova, M., L. Georgieva, N. Petrov, I. Badjakov, N. Bogatzevska, 2012. Bacterial Bulb Decay of Summer Snowflake (*Leucojum Aestivum* L.). *Biotechnology & Biotechnological Equipment, 26 (6)*, 3338-3344.

16. Szlavik, L., A. Gyuris, J. Minarovits, P. Forgo, J. Molnar, J. Hohmann, 2004. Alkaloids from *Leucojum vernum* and antiretroviral activity of *Amaryllidaceae* alkaloids. *Planta medica, 70(9)*, 871-873.

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2017, 20 (1), 278-284
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan
ISSN 1311-0489 (Print)
ISSN 2367-8364 (Online)

Влияние на някои почвени хербициди върху растежа на вегетативната крушова подложка OHF-333

Заря Ранкова

Институт по овощарство, 4004 Пловдив, кв. „Остромила", 12, България
E-mail: rankova_zarya@abv.bg

Effect of some soil herbicides on growth of the vegetative pear rootstock OHF-333

Zarya Rankova

Fruit-Growing Institute, 12 Ostromila Str., 4004 Plovdiv, Bulgaria

РЕЗЮМЕ

Изследванията се проведоха в периода 2014-2015 г. в Института по овощарство - Пловдив. Проучено бе влиянието на хербицидите Девринол 4 Ф, Стомп 33 ЕК, Гоал 4 Ф, Метофен, Пледж 50 ВП и Боналин, върху растежа на ин витро размножени и вкоренени растения от вегетативната подложка *OHF-333* в условия на съдов опит. Дозата на хербицидите бе преизчислена спрямо площта на култивационния съд. Преди третирането се измери височината на изходните растения в отделните варианти. Опитът се заложи по стандартни методи в 3 повторения. След третирането с хербицидите растенията се отглеждаха в продължение на 180 дни в стоманено-стъклена оранжерия. През този период се извършваха визуални наблюдения за поява на външни симптоми на фитотоксичност. На 180-тия ден се отчете биометричният показател прираст (cm).

Резултатите показват, че третирането с почвените хербициди, включени в проучването не предизвиква външни признаци на токсичност при ин витро размножени и вкоренени расте-

SUMMARY

Studies were carried out in the period 2014-2015 at the Fruit-Growing Institute – Plovdiv. The effect of the herbicides Devrinol 4F, Stomp 33 EC, Goal 4 F, Metofen, Pledge 50 WP and Bonalin on the growth habits of *in vitro* propagated and rooted plants of the vegetative pear rootstock OHF-333 was studied under the conditions of a pot experiment. The herbicide rate was recalculated according to the surface area of the cultivation container. The height of the source plants in the separate variants was measured before treatment. The experiment was set by standard methods in 3 replications. After treatment with herbicides, the plants were grown in a glass-house for 180 days. Visual observations for incidence of external symptoms of phytotoxicity were made. The biometric characteristic stem height increment (cm) was reported on 180th day.

The results showed that treatment with the soil herbicides, included in the study, did not cause the incidence of external symptoms of phytotoxicity in *in vitro* propagated and rooted plants of

ния от OHF-333. Растенията от вариантите третирани с напропамид, пендиметалин, оксифлуорофен, флумиоксазин и бенфлуралин имат прираст, по-голям от този на нетретираната контрола. Това дава основание да се приеме, че тези активни вещества в приложените дози не оказват подтискащо действие върху растежа на растенията. Най-голям прираст се отчита при растенията третирани с пендиметалин. Най-ниски са отчетените стойности за показателя прираст след третиране с Метофен, което показва инхибиращо влияние на този хербицид върху растежа.

Ключови думи: OHF-333, хербициди, фитотоксичност, прираст

OHF-333. The plants of the variants treated with napropamide, pendimethalin, oxyfluorfen, flumioxazine and benfluralin showed a larger stem height increment compared to the untreated control.
This gives reason to assume that these active substances in the administered doses do not exert a suppressive effect on plant growth. The largest growth was recorded in plants treated with pendimethalin. The lowest values on growth were reported after treatment with Metofen, which shows the inhibitory effect of the herbicide on plant growth.

Key words: OHF–333, herbicides, phytotoxicity, stem height increment.

УВОД

Борбата с плевелната растителност в овощните разсадници е основен агротехнически проблем, който до голяма степен определя получаването на качествен посадъчен материал. На съвременния етап в овощните разсадници за борба с плевелите се прилагат основно хербициди от групата на селективните балурициди, които ефикасно контролират едногодишните и многогодишни житни видове – ветрушка, лисича опашка, едногодишна метлица, балур, троскот, пирей и др. За борба с широколистните видове плевели е необходимо да се прилагат селективни почвени хербициди, които оказват различно влияние върху развитието на растенията. Подложките за овощните видове имат различно поведение след третиране с хербициди, което се проявява както с поява на визуални симптоми на фитотоскичност от хербицидите, така и с възможни смущения в растежа. В литературата съществуват данни за различно влияние на хербициди върху растежните прояви на овощни видове, използвани като подложки (Rankova, 2007; Hanson and Schneider, 2008; Rankova, 2011; Rankova et al., 2012; Thakur et al., 2012; Rankova and Tityanov, 2013; Rankova and Zhivondov, 2013; Abit and Hanson, 2013; Rankova and Ivanova, 2016).

INTRODUCTION

Control of weed vegetation is a major agrotechnical problem in fruit tree nurseries, determining to a great degree the production of good quality planting material. Nowadays weed control in fruit nurseries is realized by applying mainly herbicides of the group of the selective herbicides having an effect against Johnson grass species, which exert an efficient control on annual and perennial grass species, such as loose silky-bent, blackgrass, annual meadow grass, Johnson grass, Bermuda grass, coach grass, etc. Selective soil herbicides, which have different effects on plant development, should be applied for the control of broad-leaf weed species. Fruit species rootstocks show different responses to herbicide treatment, expressed in incidence of visual symptoms of phytotoxicity caused by the herbicides, as well as possible growth suppression. In literature there are data about different effects of herbicides on growth habits of the fruit species, used as rootstocks (Rankova, 2007; Hanson and Schneider, 2008; Rankova, 2011; Rankova et al., 2012; Thakur et al., 2012; Rankova and Tityanov, 2013; Rankova and Zhivondov, 2013; Abit and Hanson, 2013; Rankova and Ivanova, 2016).

Крушовата подложка OHF 333 (Old home x Farmingdale) е търсена при производството на крушов посадъчен материал, поради редица нейни предимства. Тя е устойчива на огнен пригор (*Erwinia amylovora*), нематоди и *Phytophtora Cactorum*. Подходяща е за отглеждане при сухи и варовити почви, има отлична съвместимост с крушовите сортове при присаждане. Най-добрият начин за ускорено производство на тази подложка е размножаването *in vitro*. (Kornova and Popov, 2014).

Данните за ефекта от прилагане на хербициди при вегетативната крушова подложка OHF 333 са ограничени (Urbina et al., 2003).

Целта на настоящото изследване бе в условия на съдов опит да се проследи влиянието на някои почвени и листни хербициди върху растежните прояви на *ин витро* размножени и вкоренени растения от вегетативната подложка OHF-333.

There is a demand for the pear rootstock OHF 333 ('Old Home' × 'Farmingdale') in the production of pear planting material because of the many advantages. It is resistant to Fire blight (*Erwinia amylovora*), nematodes and *Phytophthora Cactorum*. It is suitable to be grown in dry and calcareous soils; it shows an excellent compatibility with the pear cultivars for grafting. The best way for mass production of that rootstock is offered by *in vitro* propagation (Kornova and Popov, 2014).

The information about the effect of herbicide applications on the vegetative pear rootstock OHF 333 is limited in literature (Urbina et al., 2003).

The aim of the present study was to follow out the effect of some soil and leaf herbicides on the growth habits of *in vitro* propagated and rooted plants of the vegetative rootstock OHF-333 under the conditions of a pot experiment.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Изследванията се проведоха в периода 2014-2015 г. в Института по овощарство - Пловдив. Проучено бе влиянието на хербицидите напропамид (Девринол 4 Ф), пендиметалин (Стомп 33 ЕК), оксифлуорофен (Гоал 4 Ф), метолахлор+оксифлуорофен (Метофен), флумиоксазин (Пледж 50 ВП) и бенфлуралин (Боналин) върху растежа на ин витро размножени и вкоренени растения от вегетативната подложка OHF–333 в условия на съдов опит. Микроразмножени и вкоренени растения от вегетативната крушова подложка OHF-333 бяха засадени в съдове с торфено-перлитна смес с вместимост 2 L. Непосредствено след засаждането се извърши третирането с хербицидите.

Заложиха се следните варианти:

1. контрола (нетретирана)
2. напропамид – Девринол 4 Ф – 400 ml/da
3. пендиметалин – Стомп 33 ЕК – 400 ml/da
4. оксифлуорофен – Гоал 4 Ф – 250 ml/da

MATERIAL AND METHODS

Studies were carried out in the period 2014-2015 at the Fruit-Growing Institute – Plovdiv. The effect of the herbicides napropamide (Devrinol 4F), pendimethalin (Stomp 33 EC), oxyfluorfen (Goal 4 F), metolachlor + oxyfluorfen (Metofen), flumioxazine (Pledge 50 WP) and benfluralin (Bonalin) on the growth habits of *in vitro* propagated and rooted plants of the vegetative pear rootstock OHF-333 was studied under the conditions of a pot experiment. Micropropagated and rooted plants of the vegetative pear rootstock OHF-333 were planted in a peat-and-perlite mixture in pots of 2 L volume. Treatment with herbicides was applied immediately after planting.

The following variants were set:

1. Control (untreated)
2. Napropamide – Devrinol 4 F – 400 ml/da
3. Pendimethalin – Stomp 33 EC – 400 ml/da

5. оксифлуорофен + метолахлор – Метофен – 160 ml/da
6. флумиоксазин – Пледж 50 ВП – 8 g/da
7. бенфлуралин – Боналин – 300 ml/da

Дозата на хербицидите бе преизчислена спрямо площта на културационния съд. Преди третирането се измери височината на изходните растения в отделните варианти. Опитът се заложи по стандартни методи в 3 повторения. След третиране растенията се отглеждаха в продължение на 180 дни в стоманено-стъклена оранжерия. През този период се извършваха визуални наблюдения за поява на външни симптоми на фитотоксичност от хербицидите. На 180-тия ден беше отчетен биометричният показател прираст (cm). Получените резултати бяха обработени по стандартни методи на дисперсионния анализ.

4. Oxyfluorfen – Goal 4 F - 250 ml/da
5. Oxyfluorfen + metolachlor – Metofen – 160 ml/da
6. Flumioxazine – Pledge 50 WP – 8 g/da
7. Benfluralin – Bonalin – 300 ml/da

The herbicide rate was recalculated according to the surface area of the cultivation container. The height of the source plants in the separate variants was measured before treatment. The trial was set by standard methods, in three replications. After treatment the plants were grown in a glass-house for 180 days. During that period visual observations for eventual incidence of external symptoms of phytotoxicity, caused by the herbicides, had been made. The biomentric characteristic stem height increment (cm) was reported on 180th day. The results obtained were processed by standard dispersion analysis methods.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

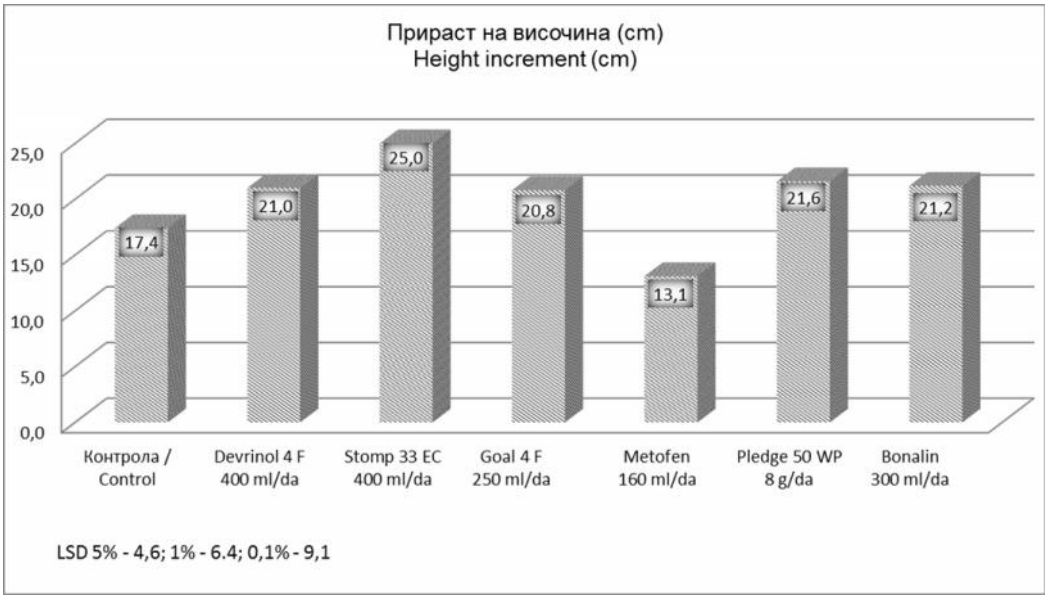
При всички третирани с хербициди варианти визуални симптоми на фитотоксичност – хлороза, некроза, депресия на растежа на растенията не бяха наблюдавани. Третираните с хербициди растения не се отличаваха по външни признаци от тези в нетретираната контрола. Вегетационният връх при всички растения бе свеж, активно растящ. Това дава основание да се приеме, че включените в проучването почвени хербициди в приложените дози не предизвикват външни симптоми на фитотоксичност при микроразмножени и вкоренени растения от OHF-333.

Резултатите от биометричния анализ са представени на Фигура 1.

RESULTS AND DISCUSSION

In all the variants treated with herbicides, external symptoms of phytotoxicity (chlorosis, necrosis, plant growth suppression) were not observed. The plants treated with herbicides did not differ in the external characteristics from the plants of the untreated control. The vegetative tips of all the plants were fresh and actively growing. That gave the grounds to assume that the soil herbicides included in the present study and applied at the rates mentioned, do not cause external symptoms of phytotoxicity in micropropagated and rooted plants of OHF-333.

The results of the biometric analysis are presented in Figure 1.



Фиг.1 Влияние на почвени хербициди върху прираста на ин витро размножени и вкоренени растения OHF-333
Fig. 1. Effect of soil herbicides on plant height of *in vitro* propagated and rooted plants of OHF-333

Растенията от вариантите третирани с напропамид, пендиметалин, оксифлуорофен, флумиоксазин и бенфлуралин имат прираст, по-голям от този на нетретираната контрола. Това дава основание да се приеме, че тези активни вещества в приложените дози не оказват подтискащо действие върху растежа на растенията. Най-голям прираст се отчита при растенията третирани с пендиметалин (вар. 3). Най-ниски са отчетените стойности за този показател след третиране с Метофен (вар. 5), което показва инхибиращо влияние на този хербицид върху растежа (Фигура 2).

The plants of the variants treated with napropamide, pendimethalin, oxyfluorfen, flumioxazine and benfluralin showed a larger stem height increment compared to the untreated control. That gave the grounds to assume that those active substances applied at the rates mentioned, do not have a detrimental effect on plant growth. The largest height increment was reported in the plants treated with pendimethalin (Var. 3). The lowest values of that characteristic were reported after treatment with Metofen (Var. 5), which shows an inhibitory effect of the herbicide on plant growth.

Фиг. 2. Растения на крушовата подложка OHF-333 с подтиснато развитие след третиране с Метофен (вариант 5)
Fig. 2. Plants of pear rootstock OHF-333 with suppressed growth after treatment with Metofen (Variant 5)

ИЗВОДИ

Третирането с почвените хербициди, включени в проучването не предизвиква външни признаци на токсичност при ин витро размножени и вкоренени растения от OHF-333.

Най-голям прираст се отчита при растенията третирани с пендиметалин. Най-ниски са отчетените стойности за този показател след третиране с Метофен, което показва инхибиращо влияние на този хербицид върху растежа.

CONCLUSIONS

Treatment with the soil herbicides included in the study did not cause any external symptoms of toxicity to *in vitro* propagated and rooted plants by OHF-333.

The plants of the variants treated with pendimethalin, showed the largest stem height increment. The lowest values on growth were reported after treatment with Metofen, which shows the inhibitory effect of the herbicide on plant growth.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Abit, M. J. M., B. D. Hanson**, 2013. Evaluation of preemergence and POST-directed herbicides on rootstock safety in field-grown almond nursery stock**.** *HortTechnology*, 23(4), 462-467.

2. **Hanson, B. D., S. A**. **Schneider**, 2008. Evaluation of weed control and crop safety with herbicides in open field tree nurseries. *Weed Technology,* 22(3), 493-498.
3. **Kornova, K., Popov S.**, 2014. Micropropagation of pear rootstock OHF 333. In: *Proceedings of X Jubilee national scientific conference with international participation "Ecology and health"*, pp. 111-116. (BG)
4. **Rankova, Z.**, 2007. Weed control in certificated fruit planting material production. In: *Proceedings of II-nd international symposium "Ecological approaches towards the production of safety food"*, pp. 257-262. (BG)
5. **Rankova, Z.**, 2011. Possibilities of applying soil herbicides in fruit nurseries – phytotoxicity and selectivity. In: Sonia Soloneski and Marcelo L. Larramendy (ed.) *Herbicides, Theory and Applications,* ISBN: 978-953-307-975-2, Publisher: InTech, pp. 495-526.
6. **Rankova, Z**., **M. Tityanov**, 2013. Effect of some soil herbicides on the vegetative habits of apricot seedlings. In: *Proceedings of the 4th Conference "Innovations in Fruit Growing", Belgrade*, pp. 255-260.
7. **Rankova, Z**., **A. Zhivondov**, 2013. Effect of some soil herbicides on the vegetative habits of the plum-apricot cultivar 'Standesto' in a nursery. In: *Proceedings of the 4th Conference "Innovations in Fruit Growing", Belgrade*, pp. 249-254.
8. **Rankova, Z., I. Ivanova**, 2016. Evaluation of influence of some herbicides on the growth of the vegetative rootstock GF-677 on the base of mathematical and statistical analyses. In: *Proceedings of national scientific conference with international participation "Ecology and health"*, pp. 217-220. (BG)
9. **Rankova, Z., S. Popov, K. Kornova**, 2012. Effect of some soil herbicides on the vegetative habits of in vitro propagated pears grown on roots in a nursery. In: *Proceedings of the 2nd International Workshop of the Environment & Agriculture in Arid and Semiarid Regions, Constanta*, pp. 309-314.
10. **Thakur**, **A., H. Singh, S. K. Jawandha, T. Kaur**, 2012. Mulching and herbicides in peach: Weed biomass, fruit yield, size, and quality. *Biological Agriculture & Horticulture,* 28(4), 280-290.
11. **Urbina, V., J. Dalmases, M. Pascual, R. Dalmau**, 2003. Performance of 'Williams' pear on five rootstocks. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 8(2), 193-196.

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2017, 20 (1), 285-295
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan
ISSN 1311-0489 (Print)
ISSN 2367-8364 (Online)

Подобрена стратегия за контрол на крушовата листна бълха (*Cacopsylla pyri* L.) (Hemiptera: Psyllidae)

Веселин Арнаудов

Институт по Овощарство, Остромила 12, 4004 Пловдив, България
E-mail: vaarnaudov@abv.bg

Improved strategy for control of pear psylla (*Cacopsylla pyri* L.) (Hemiptera: Psyllidae)

Veselin Arnaudov

Fruit Growing Institute, 12 "Ostromila", 4004 Plovdiv, Bulgaria

РЕЗЮМЕ

Обикновената крушовата листна бълха (*Cacopsylla pyri* L.) е един от ключовите насекомни вредители в крушовите градини на България. Полски опити за оценка ефикасността на две нови активни вещества спиродиклофен и спиротетрамат срещу *Cacopsylla pyri* L. (Hemiptera: Psyllidae) бяха проведени в производствена крушова градина в околностите на гр. Пловдив (България) през 2015 и 2016. Целта на изследването беше да се оцени и сравни ефикасността на спиродиклофен (Envidor ® 240 SC) и спиротетрамат (Movento® 100 SC), когато се прилагат еднократно или двукратно в комбинация с минерално масло (Akarzin), или в стратегия с други продукти, която включва тре-тиране с един от двата продукта в ком-бинация с минерално масло, последвано след 10 дни от третиране с абамектин (Vertimec ®) в комбинация с минерално масло (Akarzin). Ефикасността на двата продукта е сравнявана с тази на абамек-тин в комбинация с минерално масло (при еднократно и двукратно третиране). Спиродиклофен и спиротетрамат, когато се прилагат в стратегия с абамектин (Vertimec ®) в комбинация с минерално масло, показват по-добра ефикастност от

SUMMARY

Pear psylla (*Cacopsylla pyri* L.) is one of the key insect pests in pear orchards of Bulgaria. Field trials to evaluate the efficacy of two new active ingredients spirodiclofen and spirotetramat against *Cacopsylla pyri* L. (Hemiptera: Psyllidae) were carried out in a production pear orchard in the surroundings of Plovdiv (Bulgaria) in 2015 and 2016. The aim of the study was to assess and compare the efficacy of spirodiclofen (Envidor ®) and spirotetramat (Movento ®), when applied once or twice in combination with mineral oil (Akarzin) or in strategy with other products, which involves treatment with one of two products in combination with mineral oil, followed by treatment after 10 days with abamectin (Vertimec ®) in combination with mineral oil (Akarzin).

The efficacy of the two products was compared with that of abamectin, which is considered the best standard now.

Spirodiclofen and spirotetramat, when implemented in a strategy with abamectin (Vertimec ®) in combination with mineral oil, show better efficacy than the same

тази на същите активни вещества, приложени еднократно в комбинация с минерално масло или при двукратно прилагане на абамектин (Vertimec ®) в комбинация с минерално масло. Значението на тези резултати за подобряване на химическия контрол на *C. pyri* в България се дискутират.

Ключови думи: *Cacopsylla pyri*, круша, спиродиклофен, спиротетрамат, ефикастност, България

active substances used once in combination with mineral oil or twice-applied of abamectin (Vertimec®) in combination with mineral oil. The importance of these results for improve chemical control of pear psyllid in Bulgaria is discussed.

Key words: *Cacopsylla pyri*, pear, spirodiclofen, spirotetramat, efficacy, Bulgaria

УВОД

Обикновената крушова листна бълха (*Cacopsylla pyri* L.) е един от икономически най-важните неприятели на крушовите дървета в България, който може да причини преки щети върху производството на круши и косвени такива като вектор на "*Candidatus Phytoplasma pyri*", причинител на болест-та „внезапно загиване на крушовите дървета" (Pear Decline) (Seemüller and Schneider, 2004). Счита се че, тя е „ключов неприятел" в крушовите градини, но популациите ú често могат да бъдат регулирани от природни фактори, поради което не винаги се налага провеждането на химични третирания. В действителност обаче, подобряването на агротехническите условия (торене, напояване, резитба и т.н.) и най-вече страничният ефект на специфичните инсектициди насочени срещу други вредители и тяхната неселективност, бла-гоприятстват развитието на бълхата и често налагат необходимостта от прилагане на мероприятия за ограничаване на нейните популации и щети.

През последните години на пазара се появиха нови екологосъобразни химически продукти за контрол на ябълков плодов червей, листозавивачки и листо-миниращи молци с подчертано щадящо действие по отношение популациите на основния хищник на крушовите листни бълхи – хищната дървеница (*Anthocoris nemoralis*). Използването на селективни химически средства за контрол на *C. pyri*, позволя по-добро опазване на естествените хищници на листните бълхи и поддържане популациите на ключовия вредител под прага на икономическа

INTRODUCTION

Pear psylla (*Cacopsylla pyri* L.) is one of the most important pests of pear trees in Bulgaria, which can cause direct damage to the production of pears and indirect ones such as the vector of '*Candidatus Phytoplasma pyri*', causal agent of the disease *'Pear Decline'*, (Seemüller and Schneider, 2004).

It is considered a "key pest" in pear trees, but its populations can often be regulated by natural a factor, which does not always require chemical treatments. In fact, however, the improvement of agro-technical conditions (fertilization, irrigation, pruning, etc.) and especially the side effect of specific insecticides directed against other pests and their non-selectivity favor the development of pear psylla and often require the application of measures to limit its populations and damage.

In recent years new environmental friendly chemical products have been introduced to control of the codling moth, tortricids and leaf miners, with a pronounced protective effect on the populations of the main predator of pear psylla, *Anthocoris nemoralis* Fabr.

The use of selective chemicals for control against *C. pyri* allows better preservation of natural predators of psyllids and maintenance of 'key pest' populations below the threshold of economic harm.

вредност. В момента контролът върху този вредител се фокусира върху използването на инсектициди със специфична активност като абамектин, някои неоникотиноидни инсектициди и акарициди с инсектицидна активност, към които *C. pyri* все още не е развила резистентност.

От скоро на пазара се появиха две нови активни субстанции спиродиклофен (Envidor ®) и спиротетрамат (Movento®), представители на нов клас продукти – кетоеноли, производни на спироциклична тетронова киселина, произведени от компанията Bayer CropScience. Тези продукти се характеризират с нов начин на действие, който блокира липидния синтез в тялото на голям брой насекомни видове, в т.ч. и *C. pyri*, като по този начин успешно контролират резистентните популации на този и други вредители (De Maeyer et al., 2002; Marčić et al., 2007; Pasqualini and Civolani, 2010; Pasqualini et al., 2012; Civolani et al., 2015).

Целта на това изследване е да се проучи и сравни ефикасността на спиродиклофен (Envidor ®) и спиротетрамат (Movento ®), когато се прилагат еднократно в комбинация с минерално масло (Акарзин), или в стратегия с други продукти, включваща третиране с един от двата изследвани инсектицида в комбинация с минерално масло, последвано след 10 дни от третиране с абамектин в комбинация с минерално масло или третиране със същите инсектицидни комбинаци, но в обратен ред.

At present, control of this pest focuses on the use of insecticides with specific activity such as abamectin, some neonicotinoid insecticides and acaricides with insecticidal activity to which *C. pyri* has not yet developed resistance.

Recently, two new active substances, spirodiclofen (Envidor ®) and spirotetramat (Movento®), a new class of products – ketoenols derived from spirocyclic tetronic acid produced by Bayer CropScience, appeared on the market. These products are characterized by a new mode of action, which is expressed in blocking lipid synthesis in the body of a large number of insect species, including *C. pyri*, allowing them to successfully controlling the resistant populations of this and other similar pests (De Maeyer et al., 2002, Marčić et al., 2007, Pasqualini and Civolani, 2010; Pasqualini et al., 2012; Civolani et al., 2015).

The aim of this study is to investigate and compare the efficacy of Spirodiclofen (Envidor ®) and Spirotetramat (Movento ®) when applied in combination with mineral oil (Acarzine) or in a strategy with other products involving treatment with either Tested insecticide in combination with mineral oil followed by 10 days of treatment with abamectin in combination with mineral oil or treatment with the same insecticide combinations but in reverse order.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Полски тестове за оценка ефикасността на спиродиклофен (Envidor®) и спиротетрамат (Movento®) приложени еднократно в комбинация с минерално масло или в стратегия, включваща редуването им с други продукти за контрол на *C. pyri* L. бяха проведени в производствена крушова градина, намираща се в с. Царимир в близост до Пловдив през 2015 и 2016 година. Продуктите използвани в тестовете и техните основни характеристики са представени в Таблица 1.

MATERIAL AND METHODS

Field tests to evaluate the efficacy of spirodiclofen (Envidor®) and spirotetramat (Movento®) in combination with mineral oil applied singly or a strategy involving their alternation with other products for control of *C. pyri* were carried out in a commercial pear tree garden located in the village of Tsarimir near Plovdiv in 2015 and 2016. The products used in the tests and their basic characteristics are presented in Table 1.

Таблица 1. Продукти, използвани в тестовете
Table 1. Products used in tests

Активно вещество Active substance	Продукт Product	Търговска формулировка Commercial formulation	Доза Dose C. f. ml/hl
Spirodiclofen	Envidor ®	240 g/L SC	60
Spirotetramat	Movento ®	1000 g/L SC	150
Abamectin	Vertimec ®	18 g/L EC	150
Mineral oil + emulsifier	Akarzin	85% + 15% EC	250

Спиродиклофен (Envidor ® 240 SC) и спиротетрамат (Movento® 100 SC) бяха приложени еднократно в доза 60 или 150 ml/hl, в комбинация с минерално масло (Akarzin – 250 ml/hl) или в стратегия с други продукти, включваща първоначално третиране (T1) с един от двата изпитвани инсектицида (в същите дози) в комбинация с минерално масло (Akarzin – 250 ml/hl), последвано след 10 дни от третиране (T2) с абамектин (Vertimec® 18 EC – 150 ml/hl) в комбинация с минерално масло (Akarzin – 250 ml/hl), или третирания със същите инсектицидни комбинаци, приложени в същите дози, но в обратен ред.

Ефикасността на двата продукта в комбинация с минерално масло беше сравнявана с тази на абамектин (Vertimec® – 150 ml/hl) + минерално масло (Akarzin – 250 ml/hl), считана за най-добрият стандарт в момента (Таблица 2). Първото третиране (T1) беше проведено при наличие на преобладаващо „жълти яйца“ или първи излюпени ларви, а второто третиране (T2) (за експерименталните участъци, в които е предвидено такова третиране) – 10 дни по-късно. Експериментите са заложени в рандомизирана блок схема в 3 повторения (по четири дървета в повторение) за всяко третиране, върху шестгодишни крушови дървета от сорта „Боскова масловка“, формирани като „вретено“. Оценката на ефикасността е правена върху маркирани летораси без събиране на проби, в периода от 1-ия до 28-ия ден след третирането. Резултатите са представени като среден брой ларви (L) и нимфи (N) на летораст на 7-ми, 14-ти, 21-ми и 28-ми ден след третирането (T+7, 14, 21 и 28). Ефикасността на изпитваните химикали е оценявана съ-

Spirodiclofen (Envidor ® 240 SC) and spirotetramat (Movento® 100 SC) were applied once at a dose of 60 or 150 ml/hl in combination with mineral oil (Akarzin 250 ml/hl) or in a strategy with other products including initial treatment (T1) with one of the two tested insecticides (at the same doses) in combination with mineral oil (Akarzin – 250 ml/hl) followed after 10 days by treatment (T2) with abamectin (Vertimec® 18 EC – 150 ml/in combination with mineral oil (Akarzin – 250 ml / hl), or treatments with the same insecticide combinations applied at the same doses but in the reverse order.

The efficacy of both products in combination with mineral oil was compared to that of abamectin (Vertimec® – 150 ml/hl) + mineral oil (Akarzin – 250 ml/hl) considered to be the best standard at present (Table 2). The first treatment (T1) was conducted in the presence of predominantly "yellow eggs" or first hatched larvae and the second treatment (T2) – 10 days later (for the experimental plots where such treatment was provided). The experiments are set on a block random scheme in 3 replicates for each tretment, on 6-year pear trees with spindle-shaped form, from the 'Beurré Bosc' cultivar. Efficacy estimates were made on marked shoots without sampling, from 1 to 28 days after treatment.

The results are presented as mean number of larvae (L) and nymph (N) on shoot on the 7th, 14th, 21st and 28th days after treatment (T + 7, 14, 21 and 28). The efficacy of the tested chemicals

гласно формулата на Abbott (1925). Всички стойности са подлагани на дисперсионен анализ (ANOVA), а различията между средните са сравнявани с теста на Tukey HDS при ($p \leq 0,05$).

was evaluated according to the formula of Abbott (1925). All values were analyzed (ANOVA), and mean differences were compared with the Tukey HDS test at ($p \leq 0.05$).

Таблица 2. Експериментални условия
Table 2. Experimental conditions

Третиране Treatment	Инсектицидна комбинация Insecticide combinations	Активна субстанция Active substance	Доза/Dose ml / hl	Време на приложение Time of application	Дата на третиране Date treatmen	
					2015	2016
1.	Envidor 240 SC + Akarzin	spirodiclofen + mineral oil	60+250	T1 при наличие на „жълти яйца“ или първи излюпени ларви T1 - "yellow egg" and the first hatched larvae	30.04	25.04
2.	Envidor 240 SC + Akarzin	spirodiclofen + mineral oil	60+250	T1	30.04	25.04
	Vertimec 18 EC + Akarzin	abamectin + mineral oil	150+250	T2 – третиране 10 дни след първото приложение (T1) T2 – treatment 10 days after first aplication (T1)	10.05	5.05
3.	Vertimec 18 EC + Akarzin	abamectin + mineral oil	150+250	T1	30.04	25.04
	Envidor 240 SC + Akarzin	spirodiclofen + mineral oil	60+250	T2	10.05	5.05
4.	Movento 100 SC + Akarzin	spirotetramat + mineral oil	150+250	T1	30.04	25.04
5.	Movento 100 SC + Akarzin	spirotetramat + mineral oil	150+250	T1	30.04	25.04
	Vertimec 18 EC + Akarzin	abamectin + mineral oil	150+250	T2	10.05	5.05
6.	Vertimec 18 EC + Akarzin	abamectin + mineral oil	150+250	T1	30.04	25.04
	Movento 100 SC + Akarzin	spirotetramat + mineral oil	150+250	T2	10.05	5.05
7.	Vertimec 18 EC + Akarzin	abamectin + mineral oil	150+250	T1	30.04	25.04
8.	Vertimec 18 EC + Akarzin	abamectin + mineral oil	150+250	T1	30.04	25.04
	Vertimec 18 EC + Akarzin	abamectin + mineral oil	150+250	T2	10.05	5.05
9.	Untreated Kontrola					

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Резултатите, представени като среден брой ларви/ нимфи (L/N) на летораст са отразени в Таблица 3-4 за всяка година поотделно. Намаляването на общия брой ларви/нимфи на летораст, изразено като % е представено на Фигура 1 и 2.

RESULTS AND DISCUSSION

The results, expressed as average number of larvae/nymphs (L/N) per shoot, presented in Table 3-4 for each year separately. The reduction of the total number of larvae/ nymphs expressed as % is shown on Figure 1 and 2.

Таблица 3. Среден брой ларви (нимфи) на *C. pyri* на 7-ия, 14-ия, 21-ия и 28-ия ден след първото третиране, Пловдив 2015
Table 3. Average number of *C. pyri* larvae (nymphs) of at the 7th, 14th, 21st and 28th days after the first treatment, Plovdiv 2015

№	Продукти Products	Доза/ Dose ml/hl	Дата на третиране Date of treatment	Среден брой ларви (нимфи) на *C. pyri* на летораст Average number of *C. pyri* larvae (nymphs) per shoot			
				T1+ 7	T1+ 14	T1+ 21	T1+ 28
				MF*	MF	MF	MF
1.	Envidor +Akarzin	60+250	30.04	3,1 b	2.5 b	1,6 b	0,20 b
2.	Envidor +Akarzin Vertimec +Akarzin	60+250 150+250	30.04 10.05	3,0 b	2,0 b	1,4 b	0,05 b
3.	Vertimec+Akarzin Envidor + Akarzin	150+250 60+250	30.04 10.05	3,2 b	1,5 b	0,2 b	0,00 b
4.	Movento+ Akarzin	150+250	30.04	2,7 b	1,1 b	0,9 b	0,25 b
5.	Movento+ Akarzin Vertimec+Akarzin	150+250 150+250	30.04 10.05	2,7 b	1,2 b	0,4 b	0,00 b
6.	Vertimec+Akarzin Movento+ Akarzin	150+250 150+250	30.04 10.05	3,3 b	0,8 b	0,2 b	0,00 b
7.	Vertimec+Akarzin	150+250	30.04	3,2 b	1,0 b	2,4 b	2,06 b
8.	Vertimec+Akarzin Vertimec+Akarzin	150+250 150+250	30.04 10.05	3,3 b	0,6 b	1,1 b	0,85 b
9.	Untreated Kontrola	-		31,2 a	73,8 a	91,2 a	52,8 a

*MF – подвижни форми (ларви / нимфи на летораст); mobile forms (larvae / nymphs per shoot)

Таблица 4. Среден брой ларви (нимфи) на *C. pyri* на 7-ия, 14-ия, 21-ия и 28-ия ден след първото третиране, Пловдив 2016
Table 4. Average number of *C. pyri* larvae (nymphs) of at the 7th, 14th, 21st and 28th days after the first treatment, Plovdiv 2016

№	Продукти Products	Доза Dose ml/hl	Дата на третиране Date of treatment	Среден брой ларви (нимфи) на *C. pyri* на летораст Average number of *C. pyri* larvae (nymphs) per shoot			
				T1+ 7	T1+ 14	T1+ 21	T1+ 28
				MF*	MF	MF	MF
1.	Envidor + Akarzin	60+250	25.04	1,5 b	1,2 b	0,7 b	0,15 b
2.	Envidor + Akarzin Vertimec+Akarzin	60+250 150+250	25.04 5.05	1,4 b	1,0 b	0,5 b	0,05 b
3.	Vertimec+Akarzin Envidor + Akarzin	150+250 60+250	25.04 5.05	1,6 b	1,1 b	0,3 b	0,04 b
4.	Movento + Akarzin	150+250	25.04	1,2 b	0,6 b	0,4 b	0,08 b
5.	Movento+ Akarzin Vertimec+Akarzin	150+250 150+250	25.04 5.05	1,3 b	0,5 b	0,1 b	0,00 b
6.	Vertimec+Akarzin Movento+ Akarzin	150+250 150+250	25.04 5.05	1,6 b	0,5 b	0,2 b	0,00 b
7.	Vertimec + Akarzin	150+250	25.04	1,6 b	0,4 b	0,8 b	1,27 b
8.	Vertimec+Akarzin Vertimec+Akarzin	150+250 150+250	25.04 5.05	1,4 b	0,3 b	0,2 b	0,74 b
9.	Untreated Kontrola	-		23,4 a	51,5 a	67,6 a	49,2 a

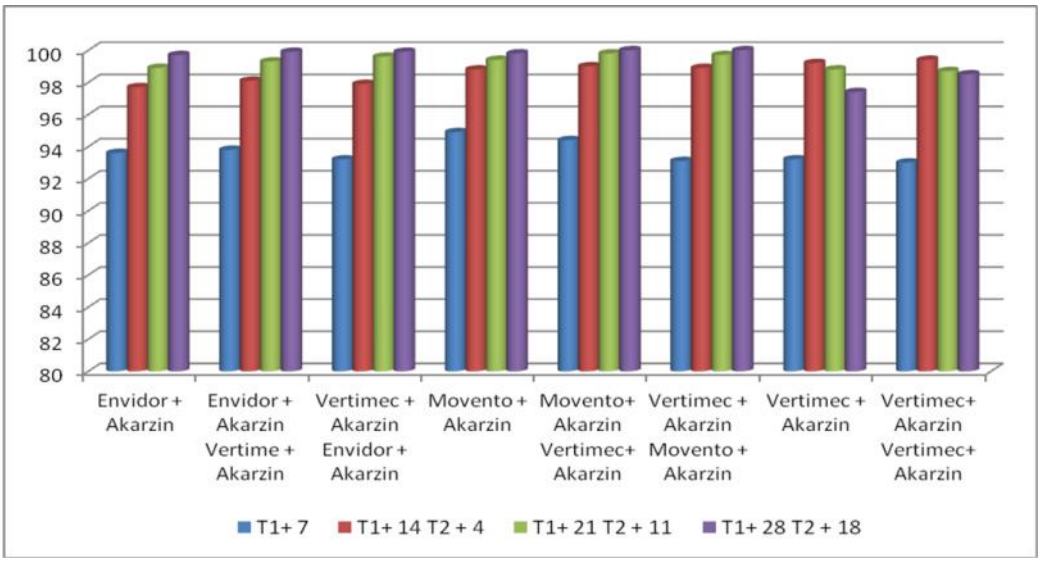
*MF – подвижни форми (ларви / нимфи на летораст); mobile forms (larvae / nymphs per shoot)

Значими различия в популационната плътност (броя на яйцата и ларвите на летораст) на *C. pyri* в различните експериментални парцели преди третирането не бяха установени и през двете

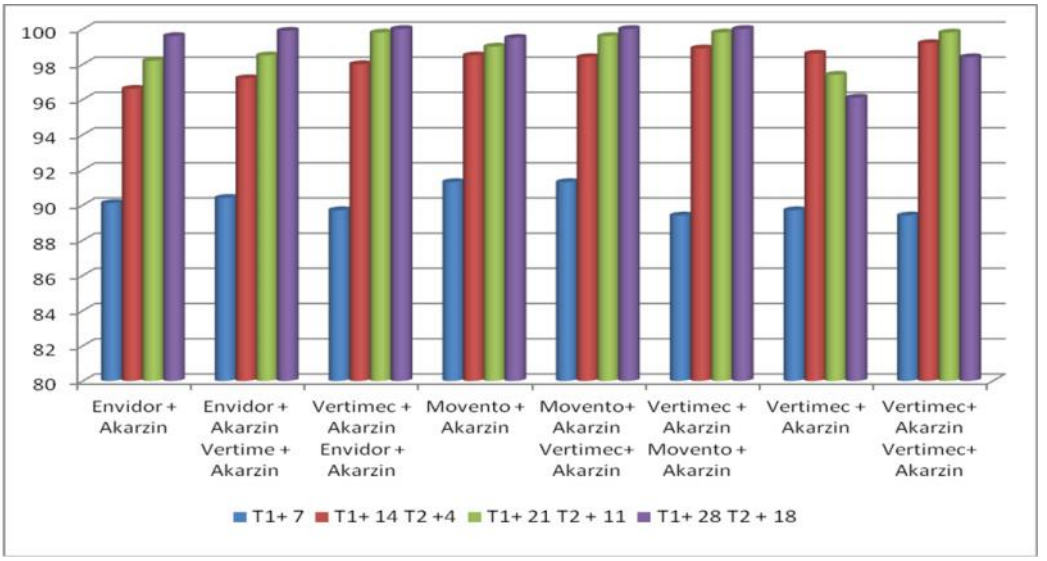
Significant differences in population density (number of eggs and larvae per shoot) of C. pyri in the different experimental plots prior to treatment were not established during both years of the

години на изследването. За разлика от плътността на популацията, степента на излюпване на яйцата в момента на третирането не беше идентична през двете години. При първите отчитания (Т1 + 7 дни) и през двете години на изследването е установено наличие на живи ларви във всички експериментални парцели (Таблица 3-4).

study. In contrast to the population density, the degree of hatching of the eggs at the time of treatment was not identical in both years. At the first counts (T1 + 7 days), live larvae were found in all experimental plots during both years of study (Table 3-4).



Фиг. 1. Ефикасност на инсектицидите срещу C. pyri (в %), Пловдив, 2015
Fig. 1. Efficacy of insecticides against C. pyri (in %), Plovdiv, 2015



Фиг. 2. Ефикасност на инсектицидите срещу C. pyri (в %), Пловдив, 2016
Fig. 2. Efficacy of insecticides against C. pyri (in %), Plovdiv, 2016

Значителни различия в броя на живите ларви, обаче са наблюдавани между пестицидно-третираните дървета и нетретираните дървета като резултат от пестицидните третирания и през двете години на изследването (Таблица 3-4).

Резултатите от проведените двугодишни тестове са идентични и очертават сходни тенденции, независимо от видимо по-ниската ефикасност на прилаганите инсектициди в края на първата седмица след третирането през 2016, дължащо се на по-високия процент излюпени ларви в момента на третирането (Таблица 3-4). Това ни дава основание да направим общ анализ на получените резултати и да ги дискутираме съвместно.

Спиродиклофен (Envidor® 240 SC) и спиротетрамат (Movento® 100 SC) в комбинация с минерално масло (Akarzin) приложени еднократно показват висока ефикасност в контрола на *C. pyri,* която е незначително по-добра от тази на референтната комбинация абамектин (Vertimec® 1.8 EC) + минерално масло (Akarzin). Приложени еднократно в комбинация с минерално масло, Envidor® 240 SC и Movento® 100 SC ефективно редуцират популациите на неприятеля, достигайки 99,5-99,8% ефикасност на 28 ден след третирането, която е незначително по-добра от тази на (Vertimec® 1.8 EC + Akarzin) – 97,4-96,1%, при еднократно прилагане (Фигура 1 и 2). Значими различия в общата ефикасност на спиродиклофен (Envidor® 240 SC) и спиротетрамат (Movento®100 SC) не се констатират, независимо, че спиродиклофен демонстрира малко по-забавен ефект в първите две седмици след третирането. За разлика от абамектин (Vertimec® 1.8 EC), който се отличава със слаба инициална токсичност и относително краткотраен ефект, Envidor® 240 SC и Movento® демонстрират слаб инициален ефект, който постепенно се подобрява във времето.

Използването на спиродиклофен (Envidor® 240 SC) и спиротетрамат (Movento®) в стратегия с други продукти, включваща първоначално третиране с един от двата инсектицида в комбинация

However, significant differences in the numbers of living larvae were observed between pesticide-treated trees and untreated trees as a result of the chemical treatments during both years of study (Table 3-4).

The results of two-year tests are identical and outline similar trends despite the apparently lower efficacy of applied insecticides at the end of the first week after treatment in 2016 due to the higher percentage of hatched larvae at the time of treatment (Table 3-4). This gives us reason to make a joint analysis of the results and to discuss them together.

Spirodiclofen (Envidor® 240 SC) and spirotetramat (Movento® 100 SC) in combination with mineral oil (Akarzin) applied singly show a high efficacy in control of C. pyri, which is insignificantly better than that of the reference combination abamectin (Vertimec® 1.8 EC) + mineral oil (Akarzin). Once applied in combination with mineral oil, Envidor® 240 SC and Movento® 100 SC effectively reduce the pest population, reaching 99.5-99.8% efficacy at 28 days post-treatment, which is slightly better than that of (Vertimec ® 1.8 EC + Akarzin) – 97.4-96.1%, with one application (Figure 1 and 2). Significant differences in the overall efficacy of spirodiclofen (Envidor® 240 SC) and spirotetramat (Movento® 100 SC) were not found, although spirodiclofen demonstrated a slightly slower effect over the first two weeks after treatment. Unlike abamectin (Vertimec® 1.8 EC), which is characterized by a low initial toxicity and a relatively short-lasting effect, Envidor® 240 SC and Movento® show a poor initial effect that gradually improves over time.

The use of spirodiclofen (Envidor® 240 SC) and spirotetramat (Movento®) in strategy with other products involving initial treatment with one of the two

с минерално масло, последвано след 10 дни от третиране с абамектин в комбинация с минерално масло, или същите инсектициди, но приложени в обратен ред, допринася за значително подобряване контрола на *C. pyri*. Включването на тези продукти в една от двете стратегии води до значително нарастване на ефикасността (до 100%), изразяващо се в пълно редуциране на популациите на вредителя до четири седмици след първоначалното третиране.

Спиродиклофен и спиротетрамат, когато се прилагат в стратегия с други продукти (абамектин + минерално масло), които предхождат или следват основното третиране, показват по-добра ефикастност от тази на спиродиклофен (Envidor 240 SC), спиротетрамат (Movento®) и абамектин (Vertimec ®), приложени еднократно в комбинация с минерално масло или при двукратно приложение на абамектин (Vertimec ®).

insecticides in combination with mineral oil after 10 days followed by abamectin treatment in combination with mineral oil or the same Insecticides, but applied in reverse order, contributes to significantly improve the control of *C. pyri*. Incorporation of these products into one of the two strategies leading to a significant increase in the efficacy (up to 100%), resulting in complete reduction of pest populations up to four weeks after the initial treatment.

Spirodiclofen and spirotetramat when used in a strategy with other products (abamectin + mineral oil) that preceded or followed the main treatment showed better efficacy than spirodiclofen (Envidor 240 SC), spirotetramat (Movento®) and abamectin (Vertimec ®) applied once in combination with mineral oil or abamectin (Vertimec ®) in combination with mineral oil but in two consecutive treatments.

ИЗВОДИ

Тези експерименти потвърждават добрата ефикастност на Envidor® 240 SC и Movento® 100 SC в контрола на *C. pyri*, която се подчертава и в предходни експерименти (Arnaudov, 2016a; Arnaudov, 2016b). Добавянето на минерално масло към тях подобрява тяхната ефикасност и ги прави още по-надеждни в ограничаване популациите на ключовия вредител. Контролът на популациите на *C. pyri* е толкова по-добър и по-дълготраен, колкото подходящия момент за третиране е по-добре определен. Ранното прилагане на тези продукти, така както и закъснялото им прилагане, при наличие на вече излюпени ларви може значително да намали тяхната ефикасност. Активността на Envidor® 240 SC + минерално масло и Movento® 100 SC + минерално масло, еднократно приложени изглежда да е по-надеждна от тази Vertimec® + минерално масло при конкретните условия на градината.

Използването на Envidor® 240 SC или Movento® 100 SC в комбинация с минерално масло в стратегия с предхож-

CONCLUSIONS

Experiments confirm the good efficacy of Envidor® and Movento® in control of *C. pyri*, which is also reported in previous studies (Arnaudov, 2016a, Arnaudov, 2016b). The addition of mineral oil to them improves their efficacy and makes them even more reliable in limiting the key pest populations. The control of *C. pyri* populations is as better and longer as the right time for treatment is better defined. Early application of these products, as well as their later application, in the presence of already hatched larvae, can significantly reduce their efficacy.

The activity of Envidor® 240 SC + mineral oil and Movento® 100 SC + mineral oil, once applied, seems to be superior to this Vertimec® + mineral oil under the specific garden conditions.

The use of Envidor® 240 SC or Movento® 100 SC in combination with mineral oil in a strategy with prior or subsequent treatment with Vertimec® 18

дащо или последващо третиране с Vertimec® 18 EC + минерално масло дава сходни или незначително подобри резултати, отколкото еднократното третиране с Envidor 240 SC, Movento® 100 SC или Vertimec® 18 EC + минерално масло, или двукратното третиране с Vertimec® 18 EC+ минерално масло. Тази стратегия с две последователни третирания с различни активни субстанции (спиродиклофен или спиротетрамат, последвано от абамектин или обратно в комбинация с минерално масло) може да представлява значително по-добро решение, както и възможна алтернатива на еднократното и двукратно третиране с абамектин + минерално масло, особено в случаите на силно и продължително нападение от *C. pyri*.

В случаите на по-слабо нападение от този вредител, еднократното третиране с Envidor® 240 SC или Movento® 100 SC в комбинация с минерално масло може да се окаже напълно достатъчно за да поддържа популациите на вредителя на икономическо безопасно ниво. Включването на Envidor® 240 SC и Movento® 100 SC в стратегията за управление на популациите на *C. pyri,* чрез еднократни прилагания или в схема с други продукти ще направи последната по-гъвкава и по-надеждна в контрола на този ключов неприятел.

EC + mineral oil gives similar or negligibly improved results than single treatment with Envidor 240 SC, Movento® 100 SC Or Vertimec® 18 EC + mineral oil, or twice-treatment with Vertimec® 18 EC + mineral oil. This strategy, with two consecutive treatments with different active substances (spirodiclofen or spirotetramat, followed by abamectin or vice versa in combination with mineral oil), can be a significantly better solution as well as a possible alternative to once-and-twice treatment with abamectin + mineral oil, in cases of severe and prolonged attack by *C. pyri*.

In the case of a lesser attack from this pest, single treatment with Envidor® 240 SC or Movento® 100 SC in combination with mineral oil may be enough to keep the pest population at an economically safe level. The inclusion of Envidor® 240 SC and Movento® 100 SC in the strategy for controlling the populations of *C. pyri* by single application or in a scheme with other products will make the latter more flexible and more reliable in controlling this key pest.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Abbott, W. S.**, 1925. A method for computing the effectiveness of an insecticide, *Journal of Economic Entomology*, Vol. 18, 265−267.
2. **Arnaudov, V.**, 2016a. Efficacy and timing of some new products against pear psylla (*Cacopsylla pyri* L.) (Hemiptera: Psyllidae): I. Spirotetramat, "*Agricultural Science and Technology*", Vol. 8 (3), 213-216.
3. **Arnaudov, V.**, 2016b. Efficacy and timing of some new products against pear psylla (*Cacopsylla pyri* L.) (Hemiptera: Psyllidae): II. Spirodiclofen "*Agricultural Science and Technology*", Vol. 8 (4), 306-309.
4. **De Maeyer, L., Peeters, J. M. Wijsmuller, A. Cantoni, E. Bruck, S. Heibges**, 2002. Spirodiclofen: a broad-spectrum acaricide with insecticidal properties - efficacy on *Psylla pyri* and scales *Lepidosaphes ulmi* and *Quadraspidiotus perniciosus*. In: Proc. of the Brighton Crop Protection Conference – Pests & Diseases, UK, pp. 65-72.
5. **Civolani, S., M. Boselli, A. Butturini, M. Chicca, S. Cassanelli, M. G. Tommasini, V. Aschonitis, E. A. Fano**, 2015.Testing Spirotetramat as an Alternative Solution to Abamectin for *Cacopsylla pyri* (Hemiptera: Psyllidae) Control: Laboratory and Field Tests. *Journal of Economic Entomology*, Vol. 108 (6), 2737-42.

6. **Civolani, S., S. Cassanelli, M. Rivi, G. C. Manicardi, R. Peretto, M. Chicca, E. Pasqualini, M. Leis**, 2010. Survey of susceptibility to abamectin of pear psylla *Cacopsylla pyri* L. (Hemiptera: Psyllidae) in northern Italy. *Journal of Economic Entomology*, 103(3), 816-822.
7. **Marčić, D., P. Perić, I. Ogurlić, M. Prijović, G. Andrić**, 2007. Effectiveness of Spirodiclofen in the Control of European Red Mite (*Panonychus ulmi*) on Apple and Pear Psylla (*Cacopsylla pyri*). Pesticides and Phytomedicine (Belgrade), 22, 301-309.
8. **Pasqualini, E. and S. Civolani**, 2010. Activities of (Movento®) (spirotetramat) of *Cacopsylla pyri*. Atti Giornate Fitopatologiche, Vol. I, 51-54 (It).
9. **Pasqualini, E., M. Scannavini and M. Boselli**, 2012. A new insecticide against pear psyllid. *L'Informatore Agrario,* Vol. 17, 70-73 (It).
10. **Seemüller, E. and B. Schneider**, 2004. '*Candidatus* Phytoplasma mali', '*Candidatus* Phytoplasma pyri', and '*Candidatus* Phytoplasma prunorum', the causal agents of apple proliferation, pear decline, and European stone fruit yellows, respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 1217-1226.

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2017, 20 (1), 296-305 ISSN 1311-0489 (Print)
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan ISSN 2367-8364 (Online)

Оптимизиране аклиматизацията на микроразмножени крушови растения (*Pyrus communis* L.) чрез прилагане на нови биостимулатори с естествен произход

Наталия Димитрова[1*], Лиляна Начева[1], Малгожата Берова[2]

[1]Институт по овощарство, България, ул. „Остромила“ 12, 4004 Пловдив, България
[2]Аграрен Университет, бул. „Менделеев“ 12, 4000 Пловдив, България
**E-mail: natalka_dmt@abv.bg*

Optimisation of acclimatization of micropropagated pear plants (*Pyrus communis* L.) by new plant biostimulators of natural origin

Nataliya Dimitrova[1*], Lilyana Nacheva[1], Malgorzata Berova[2]

[1]Fruitgrowing Institute, 12 Ostromila Str., 4004 Plovdiv, Bulgaria
[2]Agricultural University, 12 Mendeleev Blvd., 4000 Plovdiv, Bulgaria

РЕЗЮМЕ

Аклиматизацията е една от най-критичните стъпки в процеса на микроразмножаване. Целта на настоящото проучване е да се изследват възможностите за оптимизиране на аклиматизацията на *in vitro* размножавани растения чрез прилагане на ново поколение биостимулатори с естествен произход – Регоплант и Стимпо (Agrobiotech, Ukraina). Тези биостимулатори съдържат метаболитни продукти от *in vitro* култивирането на ендофитни гъби, изолирани от корените на женшен. За целта на настоящото проучване микроразмножени и вкоренени растения от крушовата подложка OHF 333 (*Pyrus communis* L.) са третирани с разтвори на Регоплант или Стимпо в концентрации 50 µl l^{-1} или 100 µl l^{-1}. Контролните растения са третирани само с вода, без добавка на растежни регулатори. Всички растения са засадени във форми за разсад в торфено

SUMMARY

Acclimatization is one of the key steps in the micropropagation process. The aim of the present investigation is to study the possibility to improve acclimatization of micropropagated plants by new generation of plant biostimulators of natural origin – Regoplant and Stimpo (Agrobiotech, Ukraina).

These biostimulators contain metabolism products of *in vitro* cultivation of endophyte fungus, isolated from ginseng roots. For the purpose of this study micropropagated and rooted plantlets from pear rootstock OHF 333 (*Pyrus communis* L.) are treated with Regoplant or Stimpo in concentrations 50 µl l^{-1} or 100 µl l^{-1}.

Plantlets treated with distilled water (without plant growth regulators) serve as a control sample. Multi-cell bedding plant trays filled with peat: perlite (1:1) are used

перлитен субстрат (1:1) и култивирани във фитостатна камера с фотопериод 16 часа (150 μmol m^{-2} s^{-1} PPFD) и висока влажност. На 30-я ден след третирането са отчетени следните показатели: свежа и суха маса, съдържание на фотосинтетични пигменти, антиоксидантна активност и хлорофилна флуоресценция. Най-добри резултати са получени при растенията, третирани с 50 μl l^{-1} Регоплант.

Ключови думи: микроразмножаване, аклиматизация, круша, биостимулатори, Регоплант, Стимпо

for acclimatization. Plants were kept in a growth chamber under 16 h photoperiod (150 μmol m^{-2} s^{-1} PPFD) and high humidity. Data on fresh and dry matter, mean number of roots per plant, stem and root length, photosynthetic pigments, antioxidant activity and chlorophyll fluorescence are collected 30 days after treatment. The best result is obtained with plants treated with 50 μl l^{-1} Regoplant.

Keywords: micropropagation, acclimatization, pear, biostimulators, Regoplant, Stimpo

УВОД

Клоналното микроразмножаване *in vitro* е ефективен метод за получаване на голям брой ценни генотипове. При много видове, особено при дървесните, микроразмножаването е ограничено поради трудностите при вкореняване и големите загуби при адаптиране на *in vitro* растенията към *ex vitro* условия. При *in vitro* култивирането микрорастенията се отглеждат в малки, плътно затворени съдове с висока влажност, слаб газообмен с околната среда, относително нисък интензитет светлина и в присъствието на екзогенни захари. В резултат на това, в края на светлинния период в културалните съдове се натрупват газообразни токсични продукти като етилен, а растенията изпитват недостиг на CO_2. Тези специфични условия водят до анормална морфология, анатомия и физиология на растенията. След прехвърлянето им от *in vitro* към ex *vitro* условия, растенията трябва да коригират тези аномалии и да се приспособят към новите условия. По тази причина аклиматизацията е една от най-критичните стъпки в процеса на микроразмножаване. За повишаване преживяемостта и оцеляването на растенията след изваждането им от културалните съдове, се прилагат различни подходи като засенчване, третиране с антитранспиранти и др.

INTRODUCTION

In vitro propagation is an efficient method for large scale production of valuable species. In many species, especially in woody plants, micropropagation is limited due to rooting difficulties and the low survival rate of the plantlets during the *ex vitro* acclimatization. During *in vitro* conditions, plantlets grow under specific climatic conditions – in small tightly closed vessels with high air humidity, low gas exchange and thus a CO_2-shortage during almost the whole photoperiod, ethylene production and relatively low light intensity, in a culture medium with a large concentration of sugar.

These special conditions result in the formation of plants with abnormal morphology, anatomy and physiology.

After the transfer from *in vitro* to *ex vitro* conditions, plants have to correct the abnormalities and to acclimatize to the new environments in the greenhouse or in the field. Acclimatization is one of the key steps in the micropropagation process.

Some approaches are often used to increase plant survival rate after transplanting, such as natural light shading, antitranspirant application for reducing plant transpiration etc.

Регоплант и Стимпо са биостимулатори с естествен произход. Техният механизъм на действие се основава на синергичния ефект на метаболитни продукти от култивирането на ендофитни гъби – микромицети, изолирани от корените на женшен и аверсектин – биологичен продукт с противопаразитно действие (Agrobiotech, Ukraina, http://www.agrobiotech.com.ua).

Крушовата подложка OHF 333 (*Pyrus communis* L. 'Old Home' x 'Farmingdale') е с умерен растеж, добра съвместимост с повечето крушови сортове и слабо чувствителна към огнен пригор (Van der Zwet and Beer, 1995; Wertheim, 2002). Размножава се сравнително трудно чрез резници или микроразмножаване, като особено проблемно е вкореняването (Jones and Webster, 1989).

Целта на настоящото проучване е да се изследват възможностите за оптимизиране на аклиматизацията на микроразмножени растения от крушовата подложка OHF 333 чрез прилагане на ново поколение природни биостимулатори – Регоплант и Стимпо (Agrobiotech, Ukraina).

Plant growth stimulators Regoplant and Stimpo are composite natural plant biostimulators. Their action is based on synergic effect of products of biotechnological cultivation of fungi-micromycetes from root system of ginseng and aversectine – biological product with antiparasitic action (Agrobiotech, Ukraina, http://www.agrobiotech.com.ua).

The pear rootstock OHF 333 (*Pyrus cuommunis* L. 'Old Home' x 'Farmingdale') has moderate growth, good compatibility with most pear varieties and is slightly susceptible to fire blight (Van der Zwet and Beer, 1995; Wertheim, 2002). It is relatively difficult to propagate through cuttings or micropropagation, especially rooting (Jones and Webster, 1989).

The aim of the present investigation is to study the possibility of improving acclimatization of micropropagated plants by new generation of plant growth stimulators of natural origin – Regoplant and Stimpo (Agrobiotech, Ukraina).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Изследванията са проведени с крушовата подложка OHF 333 (*Pyrus communis* L. 'Old Home' x 'Farmingdale'). *In vitro* растенията са култивирани във фитостатна камера с температура 22±2°C и фотопериод 16/8 часа (40 μmol m^{-2} s^{-1} PPFD, бели флуоресцентни лампи OSRAM, 40 W). Връхчетата с височина около 30 mm са заложени за вкореняване в полипропиленови съдове със зелен филтър, осигуряващ газообмен 81,35 GE/day (Microbox, Belgium). Във всеки съд (600 ml) на 100 ml хранителна среда са заложени по 10 връхчета. На 14-ия ден растенията са много добре вкоренении и след изваждане от агара се потапят в разтвор на съответния препарат за 10 минути. Изпитани са следните

MATERIAL AND METHODS

The experiments are carried out with plants of pear rootstock OHF 333 (*Pyrus communis* L. 'Old Home' x 'Farmingdale'). *In vitro* plantlets are cultivated in a growth chamber at 22±2°C and 16 h photoperiod (40 μmol m^{-2} s^{-1} PPFD, fluorescent tubes OSRAM, 40 W). Shoot tips (30 mm) are set for rooting in polypropylene vessels with green antibacterial filter (gas exchange rate 81,35 GE/day, Microbox, Belgium). In each vessel (600 ml) onto 100 ml nutrient medium 10 shoots are inoculated. On the 14^{th} day, the plants are very well rooted and, after being removed from the agar, are treated by dipping in a solution of Regoplant or Stimpo for 10 minutes. As a control sample served microshoots dipped in water.

варианти:

1. Контрола – дестилирана вода;
2. Регоплант - 5 0 µl l^{-1} (R1);
3. Регоплант - 100 µl l^{-1} (R2);
4. Стимпо - 50 µl l^{-1} (S1);
5. Стимпо - 100 µl l^{-1} (S2).

Растенията са засадени във форми за разсад (105 гнезда) в торфен субстрат с перлит (2:1) и култивирани в растежна камера при температура 22±2°C и фотопериод 16/8 часа фотопериод (150 µmol m^{-2} s^{-1} PPFD, бели флуоресцентни лампи OSRAM, 40 W) и висока влажност за две седмици, след което влажността постепенно се понижава.

Резултатите са отчетени на 30–и ден като са измерени биометричните показатели, съдържанието на фотосинтетични пигменти и хлорофилната флуоресценция. Непосредствено след изваждане от субстрата се определя свежата маса на растенията (FW) – тегловно. Сухата маса на растенията (DW) се определя тегловно след изсушаване на растителния материал при 80 °C за 48 h (Beadle, 1993).

Фотосинтетичните пигменти са екстрахирани на тъмно, с охладен до 4 °C 85% (v/v) ацетон, в присъствието на $CaCO_3$. Оптическата плътност на получените извлеци е определена спектрофотометрично при 663 nm, 644 nm и 440 nm след центрофугиране на екстрактите при 4500 g за 10 min. Количеството на пигментите е изчислено по формулите на Lichtenthaler и Wellburn (1983) и е представено като mg g^{-1} свежа маса.

Параметрите на хлорофилната флуоресценция са определени с импулсно модулиран флуорометър MINI-PAM (Heinz Walz, Germany) на първите (от върха надолу) напълно оформени листа, неоткъснати от стъблото. След 30-минутна тъмнинна адаптация на листата се определя началната флуоресценция (F_0) и максимална флуоресценция (F_m), на базата на които апаратът автоматично изчислява потенциалната фотохимична активност на ФС2 – $Y = (F_m - F_0)/F_m$ (Genty et al., 1989).

С помощта на апарата са снети бързи светлинни криви, които дават

Variants:

1. Control – distilled water;
2. 50 µl l^{-1} Regoplant (R1);
3. 100 µl l^{-1} Regoplant (R2);
4. 50 µl l^{-1} Stimpo (S1);
5. 100 µl l^{-1} Stimpo (S2).

Multi-cell bedding plant trays filled with peat: perlite (1:1) are used for acclimatization. Plants are kept in growth chamber at 22±2°C under 16 h photoperiod (150 µmol m^{-2} s^{-1} PPFD, fluorescent tubes OSRAM, 40 W) and high humidity conditions for 2 weeks and then humidity was gradually decreased.

After 30 days in *ex vitro* conditions growth parameters, physiological and biochemical analysis are performed.

Fresh weight of whole plants (FW) is determined immediately after removing the plants from the soil. The dry weight of plants (DW) is measured after drying the material at 80 °C for 48 h (Beadle, 1993).

The photosynthetic pigments are extracted in the dark, with cooled to 4 ° C 85% (v/v) acetone, in the presence of $CaCO_3$. The optical density of the obtained extracts is determined spectrophotometrically at 663 nm, 644 nm and 440 nm after centrifugation of the extracts at 4500 g for 10 min. The content of photosynthetic pigments is calculated according to Lichtenthaler and Wellburn (1983) and expressed in mg g^{-1} fresh weight of sample.

The chlorophyll fluorescence is measured by MINI-PAM, Heinz Walz, Germany on the first (top-down) fully formed unattached leaves. After 30 min in the dark initial (F_0) and, maximal fluorescence (F_m) are measured and overall quantum yield of photochemical energy conversion (Yield) $Y = (F_m - F_0)/F_m$ (Genty et al., 1989) is calculated.

Rapid light curves are generated with the MINI-PAM and photosynthetic

информация за скоростта на електронния транспорт през ФС2 (ETR = Y*0.5.ФАР*0.84) в реално време (Handbook of operation with MINI-PAM, 1996).

Антиоксидантната активност е определена по метода на Yen and Chen (1995) и изчислена по Rossi et al. (2003).

За всеки вариант са заложени по 30 растения, като експериментът е заложен двукратно. Получените резултати са обработени чрез дисперсионен анализ (One-way ANOVA) и Duncan тест при ниво на значимост 95%.

electron transport rates (ETR) are calculated from chlorophyll fluorescence (ETR = Y×PAR×0.5×0.84) (Handbook of operation with MINI-PAM, 1996).

Antioxidant activity is determined according to the method of Yen and Chen (1995) and the percentage of DPPH radical scavenging capacity was calculated according to Rossi et al. (2003).

The experiment is conducted twice with 30 explants for variant. Statistical analyses were carried out by One-Way ANOVA using Duncan's test to validate the different significance at p = 95%.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Още на 14-ия ден след третирането с Регоплант и Стимпо са установени видими разлики между вариантите като с най-добър статус се отличават растенията, третирани с 50 µl l^{-1} Регоплант (Фигура 1).

RESULTS AND DISCUSSION

As early as the 14th day after treatment with Regoplant and Stimpo, apparent differences are found between the variants, with the best status distinguishing the plants treated with 50 µl l^{-1} Regoplant (Figure 1).

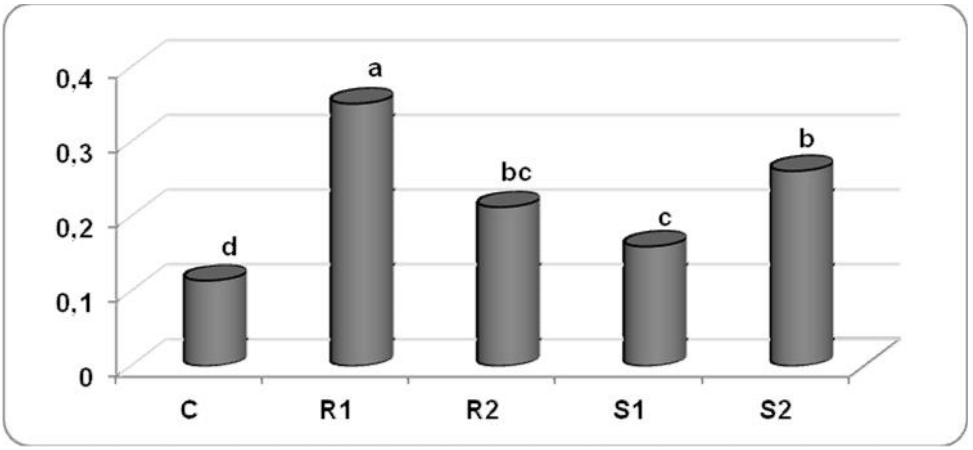
Фиг. 1. Общ изглед на крушовите растения, третирани с Regoplant или Stimpo 14 дни след третирането и прехвърлянето им в *ex vitro* условия
Fig. 1. General view of the pear plants, treated with 50 µl l^{-1} Regoplant or 50 µl l^{-1} Stimpo 14 days after transplanting to *ex vitro* conditions
Control - distilled water; R1 - 50 µl l^{-1} Regoplant; R2 - 100 µl l^{-1} Regoplant; S1 - 50 µl l^{-1} Stimpo; S2 - 100 µl l^{-1} Stimpo

Резултатите в края на адаптацията на 30-ия ден потвърждават това наблюдение. При всички третирани варианти е установено натрупване на повече свежа (FW) и суха (DW) маса в сравнение с контролата (Фигура 2). С най-високи стойности се отличават растенията, третирани с 50 µl l^{-1}

The results at the end of the acclimatization (30th day) confirm this observation. In all treated variants, higher fresh (FW) and dry (DW) weight accumulation is observed compared to the control sample (Figure 2). The highest values are recorded for plants treated with 50 µl l^{-1} Regogplant (R1)

Регоплант (R1) (Таблица 1, Фигура 2), следвани от тези от вариант със Стимпо (S2).

(Table 1, Figure 2), followed by those of the variant treated with 100 µl l^{-1} Stimpoo (S2).



Фиг. 2. Свежа маса на растенията (g) 30 дни след третиране с Регоплант или Стимпо и прехвърляне в *ex vitro* условия

Fig. 2. Fresh weight of one pear plant (g), treated with Regoplant or Stimpo 30 days after transplanting to *ex vitro* conditions

C - control; R1 - 50 µl l^{-1} Regoplant; R2 - 100 µl l^{-1} Regoplant; S1 - 50 µl l^{-1} Stimpo; S2 - 100 µl l^{-1} Stimpo.
Различните букви при всяка колона показват доказана разлика по Дънкан (P<0.05)
Different letters within each column indicates significant difference (P<0.05) by DMRT

Таблица 1. Биометрични и биохимини показатели на растения, третирани с Регоплант или Стимпо 30 дни след третиране и прехвърляне в *ex vitro* условия

Table 1. Growth and biochemical parameters of plants, treated with Regoplant and Stimpo 30 days after treatment and transplanting to *ex vitro* conditions

Варианти Variants	DW g	DW/FW %	DPPH %	Yield Y=Fv/Fm
Control (C)	0,0515 ± 0,001^{d}	45,01 ± 1,48^{a}	21,44 ± 1,76^{a}	0.768
50µ µl l^{-1} Regoplant (R1)	0,1190 ± 0,022^{a}	33,64 ± 1,50^{b}	20,82 ± 2,20^{a}	0.803
100 µl l^{-1} Regoplant (R2)	0,0809 ± 0,001^{c}	38,11 ± 2,10^{ab}	25,94 ± 0,63^{a}	0.779
50 µl l^{-1} Stimpo (S1)	0,06 ± 0,004^{cd}	35,93 ± 0,45^{b}	21,31 ± 0,50^{a}	0.776
100 µl l^{-1} Stimpo (S2)	0,0972 ± 0.005^{b}	37,19 ± 1,66^{b}	26,37 ± 4,99^{a}	0.783

*Различните букви при всяка колона показват доказана разлика по Дънкан (P<0.05)
Different letters within each column indicates significant difference (P<0.05) by DMRT

Свежа маса (FW) и суха маса на 1 растение (DW), DPPH – антиоксидантна активност; Потенциална фотохимична активност (квантов добив) на ФСII – Yield (Y= Fv/Fm)
Fresh weight (FW) and dry weight (DW) were based on one plant. DPPH (%)-radical scavenging capacity; Maximum quantum yield of photosystem II - Yield – (Y = Fv/ Fm)

FW на едно растение, третирано с 50 µl l^{-1} Регоплант (R1), е три пъти по-голяма, а DW два пъти от контролния вариант (Таблица 1, Фигура 2). Процентът на суха спрямо свежа маса

Fresh weight (FW) of plant, treated with 50 µl l^{-1} Regoplant (R1), is three times greater and dry weight (DW) is two times greater than the control variant (Table 1, Figure 2). The ratio of DW to

(DW/FW) не се различава съществено при растенията, третирани с Регоплант и Стимпо, но е съществено по-висок при контролата (Таблица 1).

Най-високи стойности на фотосинтетичните пигменти са отчетени в листата на растенията, третирани със Стимпо в доза 100 µl l^{-1}, следвани от контролата и варианта с Регоплант 100 µl l^{-1}. При варианта R1 (50 µl l^{-1} Регоплант) съдържанието на общ хлорофил е най-ниско. Това най-вероятно се дължи на факта, че получените стойности са определени на база свежа маса, а именно този вариант се отличава с максимална стойност на FW. Това е потвърдено от редица други автори (Fujiwara et al. 1992; Pospisilova 1996).

Подобна тенденция се наблюдава и при каротеноидите, без да има статистически доказана разлика между вариантите. Съотношенията хл.а/ хл. b и общ хлорофил/каротеноиди са в границите на норма при всички изследвани варианти (Таблица 2).

FW does not differ significantly in the plants treated with Regoplant or Stimpo but is significantly higher in the control (Table 1).

The highest values of photosynthetic pigments are recorded in the leaves of the plants treated by Stympo at a dose of 100 µl l^{-1}, followed by the control and the variants with 100 µl l^{-1} Regoplant.

The total chlorophyll content in variant R1 (50 µl l^{-1} Regoplant) is the lowest. This is most likely due to the fact that the values obtained are determined on fresh weight basis, namely that this variant has a maximum value of FW. This is well documented by other authors (Fujiwara et al. 1992; Pospisilova 1996).

A similar trend is observed in carotenoids, with no statistically proven difference between the variants. The ratio of chl.a/chl.b. and total chlorophyll/carotenoids are within the normal range for all tested variants (Table 2).

Таблица 2. Съдържание на фотосинтетични пигменти (mg g^{-1} FW) в листата на крушови растения, третирани с Регоплант или Стимпо 30 дни след третиране и прехвърляне в *ex vitro* условия

Table 2. The content of photosynthetic pigments (mg g^{-1} FW) in the leaves of pear plants treated by Regoplant or Stimpo 30 days after treatment and transplanting to *ex vitro* conditions

Варианти Variants	Chl a mg g^{-1} FW	Chl b mg g^{-1} FW	Chl (a+b) mg g^{-1} FW	Carotenoides mg g^{-1} FW	Chl a/Chl b	Chl (a+b)/Car
Control (C)	3,09±0,14^{ab}	1,03±0,03^{b}	4,44±0,10^{ab}	1,24±0,09^{a}	2,99±0,22^{ab}	3,58±0,19^{a}
50µ µl l^{-1} Regoplant (R1)	2,31±0,40^{b}	0,78±0,04^{b}	3,33±0,46^{b}	0,94±0,18^{a}	2,92±0,35^{ab}	3,58±0,21^{a}
100 µl l^{-1} Regoplant (R2)	3,09±0,01^{ab}	1,01±0,08^{b}	4,39±0,08^{ab}	1,29±0,02^{a}	3,07±0,25^{a}	3,39±0,13^{a}
50 µl l^{-1} Stimpo (S1)	2,66±0,53^{b}	0,90±0,17^{b}	3,81±0,76^{b}	1,10±0,22^{a}	2,95±0,03^{ab}	3,45±0,02^{a}
100 µl l^{-1} Stimpo (S2)	3,62±0,19^{a}	1,53±0,26^{a}	5,54±0,52^{a}	1,33±0,04^{a}	2,41±0,29^{b}	4,15±0,51^{a}

*Различните букви при всяка колона показват доказана разлика по Дънкан (P<0.05)
Different letters within each column indicates significant difference (P<0.05) by DMRT

Общата антиоксидантна активност (DPPH) не се различава съществено при изпитаните третирания (Таблица 1).

Квантовият добив (Y) е мярка за потенциалната фотохимичната активност на ФС2 при тъмнинно адаптирани растения. В нашия случай данните показват, че в листата на микрорастенията фотосинтетичната функция е подобрена незначително при третираните

Total antioxidant activity (DPPH) does not differ significantly in the tested treatments (Table 1).

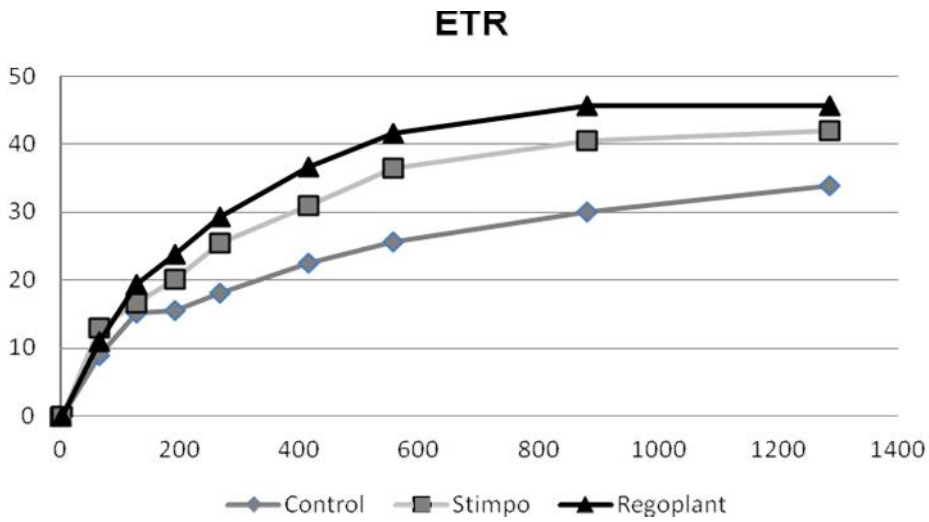
Quantum yield of photochemical energy conversion (Y) is an indicator of photochemical activity of Photosystem II in dark-adapted plants. In our experiment, the results show that the photosynthetic function in the leaves of the plants is negligibly improved in the treated plants.

растения. Разликата между вариантите не са доказани статистически. Счита се, че стойности в границите 0.75-0.83 са характерни за здрави листа (Bolhar-Nordenkampf and Oquist, 1993). Представените в Таблица 1 данни показват, че в изследваните растения (третирани и контролни) не са констатирани съществени изменения в потенциалната фотохимична активност на ФС2.

Бързите светлинни криви предоставят информация за скоростта на електронния транспорт (ETR) през ФС2 и дават представа за пластичността на фотосинтетитичния апарат към нарастваща интензивност на светлината (White and Critchley, 1999). Стойностите на ETR при растенията, третирани с 50 µl l^{-1} Регоплант (R1) и 50 µl l^{-1} Стимпо (S1) са по-високи в сравнение с контролата (Фигура 3).

The difference between the variants is not statistically proven. Values ranging from 0.75 to 0.83 are characteristic of healthy leaves (Bolhar-Nordenkampf and Oquist, 1993). The results presented in Table 1 show that not significant alterations are found in the photochemical potential of Photosystem II in the test plants (treated and control).

The rapid light curves provide information about the electronic transport rate (ETR) trough Photosystem II and give information about the plasticity of the photosynthetic apparatus to the increasing intensity of the light (White and Critchley, 1999). The values of ETR in plants treated with µl l^{-1} Regoplant (R1) and 50 µl l^{-1} Stimpo (S1) are higher than the controls (Figure 3).



Фиг. 3. Скорост на фотосинтетичния електронен транспорт (ETR) на растения, третирани с 50 µl l^{-1} Регоплант или 50 µl l^{-1} Стимпо 30 дни след прехвърляне в *ex vitro* условия

Fig. 3. Apparent electron transport rate (ETR) of plants, treated with 50 µl l^{-1} Regoplant or 50 µll^{-1} Stimpo 30 days after transplanting to *ex vitro* conditions

Значително по-високата свежа и суха маса, по-големият квантов добив (Y) и ETR при растенията, третирани с 50 µl l^{-1} Регоплант (R1), ни дават основание да предположим, че тези

The significantly higher FW and DW, larger quantum yield (Y) and ETR in plants treated with 50 µl l^{-1} Ragoplant (R1) give us a reason to suppose that these plants have more intensive

растения имат по-интензивна фотосинтеза, натрупват по-бързо биомаса и по-лесно са преодолели стреса от прехвърлянето от *in vitro* към *ex vitro* условия. Затова бихме могли да препоръчаме прилагането на Регоплант при аклиматизацията на *in vitro* растенията за по-лесно приспособяване към новите условия.

photosynthesis, accumulate more effective biomass and more easily overcome stress from the transfer from *in vitro* to *ex vitro* conditions. Therefore, we could recommend the use of Regoplant in the acclimatization of *in vitro* cultivated plants for easier acclimatization to new *ex vitro* conditions.

ИЗВОДИ

Прилагането на биостимулатора с естествен произход Регоплант в концентрация 50 µl l^{-1} стимулира растежа и подобрява аклиматизацията на микроразмножени растения от крушовата подложка OHF 333 (*Pyrus communis* L.).

CONCLUSIONS

The application of biostimulator of natural origin Regoplant (50 µl l^{-1}) could significantly stimulate the growth and improve the acclimatization of micropropagated pear rootstock OHF 333 plants (*Pyrus communis* L.).

БЛАГОДАРНОСТИ

Препаратите Регоплант и Стимпо са любезно предоставени от акад. Сергей Пономаренко в рамките на проект ДНТС/Украйна/01/9 за двустранно сътрудничество между България и Украйна, финансиран от Фонд „Научни изследвания“ към Министерство на образованието и науката, България.

ACKNOWLEDGEMENTS

Biostimulators Regoplant and Stimpo was kindly provided by Academic Serhiy Ponomarenko, Agrobiotech, Kiev, Ukraine as a part of the bilateral Bulgarian-Ukrainian project DHTC/Ukraina/01/9, supported by National Science Fund, Ministry of Education and Science, Bulgaria.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Beadle, C.**, 1993**.** Growth analysis. In: Photosynthesis and Production in a Changing Environment: a field and laboratory manual Chapman & Hall, London (UK), 36-46.

2. **Bolhar-Nordenkampf, H. and G. Oquist**, 1993. Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. In: Photosynthesis and Production in a Changing Environment: a field and laboratory manual Chapman & Hall, London (UK), 193-206.

3. **Fujiwara, K., S. Kira, T. Kozai**, 1992. Time course of CO_2 exchange of potato cultures *in vitro* with different sucrose concentration in the culture medium. *J. Agr. Met*., 48(1)**,** 49-56.

4. **Genty, B., J.-M. Briantais, N. R. Baker**, 1989**.** The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica Biophysica Acta*, 990(1), 87-92.

5. **Jones, O.P. and C. Webster**, 1989. Improved rooting from conventional cuttings taken from micropropagated plants of *Pyrus communis* rootstocks. *J. Hort. Sci.*, 64(4), 429-434.

6. **Lichtenthaler, H. and A. Wellburn**, 1983. Determination of total carotenoids and chlorophyll a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions*, 603, 591-592.

7. **Pospisilova, J., J. Catsky, Z. Sestak**, 1996. Photosynthesis in plants cultured *in vitro.* In: Handbook of photosynthesis, eds. M. Pessarakli, Marcel Dekker, NY.

8. **Rossi, M., E. Giussani, R. Morelli, R. Scalzo, R. Nani, D. Torreggiani**, 2003. Effect of fruit blanching on phenolics and radical scavenging activity of highbush blueberry juice. *Food Research International*, 36(9-10), 999-1005.
9. **Van der Zwet, T., S. Beer**, 1995**.** Fire Blight – Its Nature, Prevention and Control. Department of Agriculture, *Agricultural Information Bulletin*, Washington (US), 631.
10. **Wertheim, S**., 2002. Rootstocks for European pear, *Acta Horticulturae*, 596, 299-309.
11. **White, A., C. Critchley**, 1999. Rapid light curves: A new fluorescence method to assess the state of the photosynthetic apparatus. *Photosynthesis Research*, 59(1), 63-72.
12. **Yen, G.S., H.Y. Chen**, 1995. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(1), 27-32.