Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2018, 21 (4), 145-165
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan
ISSN 1311-0489 (Print)
ISSN 2367-8364 (Online)

Съвременни тенденции в асортимента и технологията на отглеждане на семковите овощни видове в Република Сърбия

Милан Лукич*, Сладжана Марич, Небойша Милошевич, Ивана Глишич, Мира Милинкович

Изследователски институт по овощарство, Чачак, "Краля Петра I", 9, 3200 Чачак, Република Сърбия

Modern trends in the assortment and growing technology of pome fruit species in the Republic of Serbia

Milan Lukić*, Slađana Marić, Nebojša Milošević, Ivana Glišić, Mira Milinković

Fruit Research Institute, Čačak, Kralja Petra I/9, 32000 Čačak, Republic of Serbia
**E-mail: direktor@institut-cacak.org*

Received: 13.08.2018 *Accepted:* 13.11.2018 *Published:* 12.12.2018

РЕЗЮМЕ

Овощните насаждения в Република Сърбия обхващат 170 426 ha, от които около 20% са семкови видове. Делът на семковите, в общото производство на плодове в Република Сърбия днес е около 25% и се очаква увеличаване, поради голямата необходимост от тях, особено ябълката. Тя доминира в групата на семковите и се характеризира с променливи асортимент и технологии., Съвременните тенденции в технологиите на ябълковото производство са свързани със сгъстяване схемата на засаждане, включване на нови сортове, отговарящи на пазарните изисквания и предпочитанията на потребителите, изграждане на мрежи против градушка и напоителни системи. Понастоящем най-важните пазарни сортове са: 'Golden Delicious Reinders®', 'Granny Smith Challenger®',

SUMMARY

Fruit plantations in the Republic of Serbia cover 170,426 ha, of which about 20% is occupied by pome fruit species. The share of pome fruits in the total fruit production in the Republic of Serbia is nowadays about 25% and further progress is expected due to larger demands for these fruits, especially apple. The pome group is dominated by apple, which is characterized by frequent changes in the assortment and growing technology. Current trends in apple production are related to establishing high-density plantings with modern cultivars according to market demands and consumer preferences, which also include anti-hail nets and irrigation systems. The following commercial cultivars are currently the most important: 'Golden Delicious Reinders®', 'Granny Smith Challenger®', 'Superchief Spur Red

‘Superchief Spur Red Delicious®’, ‘Red Delicious Jeromine’, ‘Gala Buckeye’, ‘Gala Fendeca’, ‘Fudži Kiku 8’, ‘Braeburn Mariri Red®’, ‘Evelina®’ и ‘Pink Lady®’. Разглеждаме също и подобренията в технологиите за съхранение.

През последните години са създадени нови насаждения от круша и дюля на по-големи площи, но в сравнение с ябълката при тях няма съвременен асортимент и прилагане на интензивна технология за отглеждане. В структурата на сортовете круши преобладават летни ("Вилямова масловка" "Санта Мария" и "Кармен") и зимни сортове ("Абат Фетел" и "Попска"), най-важните сортове в асортимента на дюля са "Лесковачка", "Вранска" и "Шампион". Основните проблеми при производството на круши и дюли са изборът на подходящи подложки и чувствителността към огнен пригор [*Erwinia amylovora* (Burnill)].

Основанта цел на настоящата статия е да направи преглед на сегашния асортимент и технологиите за отглеждане при производството на ябълки, круши и дюли в Република Сърбия. Предвид ситуацията в света, представяме перспективите за по-нататъшно подобряване на производството на семкови плодове.

Ключови думи: асортимент, технологията за отглеждане, ябълка, круша, дюля

УВОД

Поради благоприятните агроекологични условия за отглеждане на плодове в умерения пояс, Република Сърбия има дългогодишна традиция в производството и преработката на тези видове. Нашата страна е водещ производител на плодове в региона, а по отношение на някои овощни видове е водещ европейски и световен производител. Според данни на Републиканското статистическо бюро, Сърбия (2017), общата площ, заета от овощни градини възлиза на 170,426 ha (средно

‘Superchief Spur Red Delicious®’, ‘Red Delicious Jeromine’, ‘Gala Buckeye’, ‘Gala Fendeca’, ‘Fui Kiku 8®’, ‘Braeburn Mariri Red®’, ‘Evelina®’ and ‘Pink Lady®’. In addition, the improvements in storage technology were discussed.

In recent years, new pear and quince plantations have been established on larger areas, but in comparison to apple, they are not followed by a modern assortment and the application of intensive growing technology. The pear cultivar structure is dominated by summer (‘William’s Bon Chrétien’, ‘Santa Maria’ and ‘Carmen’) and winter cultivars (‘Abate Fetel’ and ‘Cure’), whereas ‘Leskovačka’, ‘Vranjska’ and ‘Champion’ are the most important cultivars within the quince assortment. The main problems in pear and quince production are the choice of the appropriate rootstocks and the cultivar sensitivity to the fireblight [*Erwinia amylovora* (Burnill)].

This paper was undertaken primarily to give an overview of the current assortment and growing technology in the apple, pear and quince production in the Republic of Serbia. Considering the situation in the world, the prospects for further improvement in the pome fruits production were presented.

Key words: apple, pear, quince, cultivar, orchard management

INTRODUCTION

Due to the favourable agro-ecological conditions for growing temperate zone fruit species, the Republic of Serbia has a long tradition of production and processing of these species. Our country is also the leading fruit producer in the region, and with regard to certain fruit species, the leading European and world producer. According to the data of the Republic Bureau of Statistics, Serbia (2017), the total area occupied by orchards amounts to 170,426 ha (average for the period 2013/2017),

за периода 2013-2017), което покрива 4.8 % от общата земеделска площ. Производството на плодове представлява 11 % от общото селскостопанско производство, което заедно с плодовите продукти има 17 % дял в структурата на износа на селскостопански продукти.

В структурата на овощарството в Република Сърбия, семковите видове представляват 19,25 %, докато в структурата на общото производство на плодове те представляват 25 % (Републиканско статистическо бюро, Сърбия, 2017). Ябълките, крушите и дюлите са известни като много взискателни видове по отношение на технологията на отглеждане, но и много рентабилни, следователно сред производителите съществува интерес. В нашата работа са анализирани текущият асортимент и технологията на отглеждане на семковите плодове в Република Сърбия. С преглед на световните тенденции са дадени предложения за необходимите мерки за подобряване на производството на тези плодове.

Тенденциите в производството

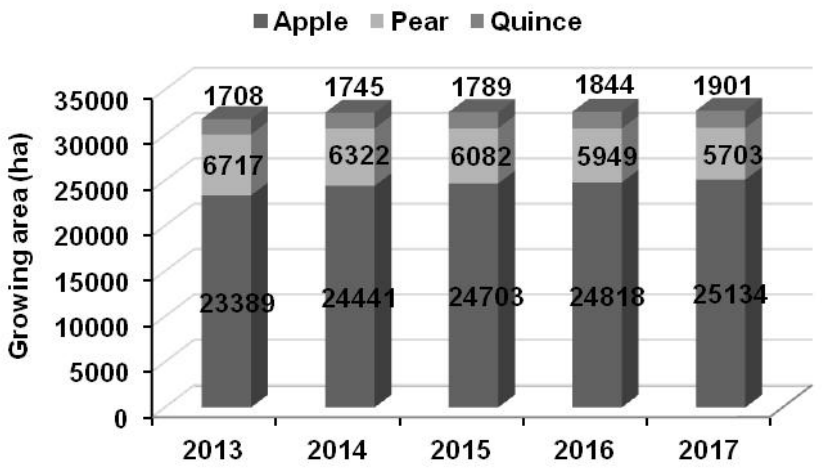
Най-важният вид от семковите в Република Сърбия е ябълката, следвана от крушата и дюлята, която е най-малко разпространена. Площите заети от ябълки и дюли се увеличават, а тези на круши намаляват (Фигура 1). През 2017 г., в сравнение с 2013 г. площите с овощни градини от ябълки и дюли се увеличиха с 1745 ha и 200 ha, съответно. Обратно на това, площите с овощни градини от круши намаляха с почти 1000 ha, а причината за това е неадекватният избор на места за засаждане и видове подложки, както и появата на бактериален огнен пригор [*Erwinia amylovora* (Burnill)] и листна бълха по крушата [*Cacopsilla piry* (L.)] (Keserović et al., 2014). Според същите автори през последните години има повишен интерес към отглеждането на дюли, така че Република Сърбия може да стане един от водещите производители на този вид.

which covers 4.8% of the total agricultural land area. Fruit production accounts for 11% of the total agricultural production value and, together with fruit products, have a 17% share of the agricultural product export structure.

In the structure of fruit growing area in the Republic of Serbia, pome fruit species account for 19.25%, while in the structure of total fruit production they represent 25% (Republic Bureau of Statistics, Serbia, 2017). Apple, pear and quince are known as very demanding fruit species in terms of growing technology, but highly profitable as well, therefore, the interest of growers is present. In our work, current assortment and growing technology of pome fruit species in the Republic of Serbia were analysed. With a review of world trends, suggestions of the necessary measures for further improvement of these fruit species production were given.

Production trends

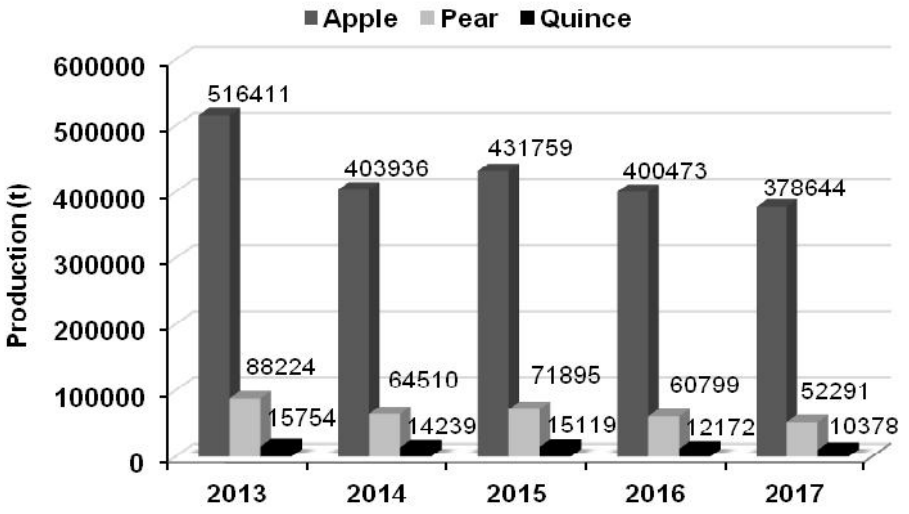
The most important pome fruit in the Republic of Serbia is apple, followed by pear, whereas quince is the least prevalent. The areas of apple and quince orchards are being increased, while the pear growing areas are being reduced (Figure 1). In 2017, compared to 2013, the areas under apple and quince orchards were larger by 1,745 ha and 200 ha, respectively. In contrast, the areas under pear orchards decreased by almost 1,000 ha, caused by an inadequate choice of planting sites and rootstock, as well as the occurrence of bacterial fireblight [*Erwinia amylovora* (Burnill)] and pear psyllid [*Cacopsilla piry* (L.)] (Keserović et al., 2014). The same authors stated that in the last years there has been a great interest in growing quince, so that the Republic of Serbia might become one of the world's leading producers of this fruit species.



Фиг. 1. Площи заети с ябълки, круши и дюли в Република Сърбия (2013/2017)
Fig. 1. Growing area of apple, pear and quince in the Republic of Serbia (2013/2017)

В европейски мащаб, според площите заети от ябълки, круши и дюли нашата страната е на дванадесето, десето и първо място, съответно (FAO, 2018; Републиканско бюро по статистика, Сърбия, 2017).

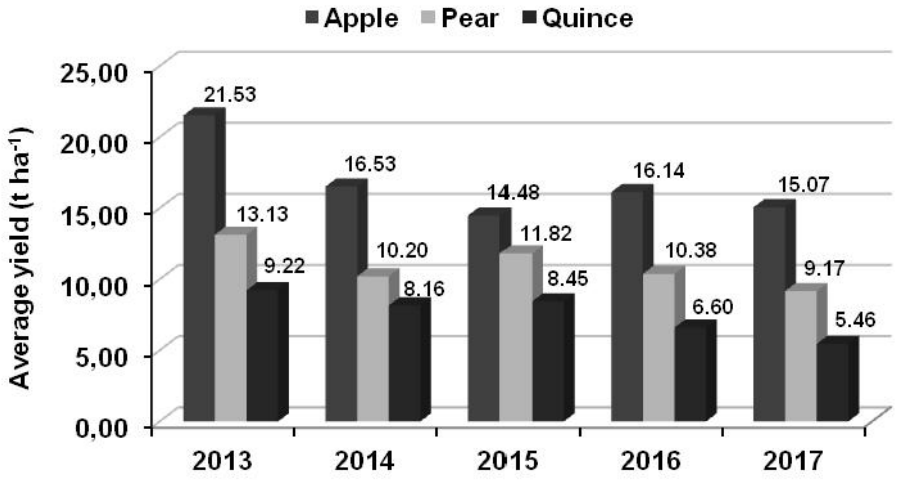
In European scales, according to the apple-, pear- and quince-growing areas, our country is in the twelfth, tenth and first place, respectively (FAO, 2018; Republic Bureau of Statistics, Serbia, 2017).



Фиг. 2. Производство на ябълки, круши и дюли в Република Сърбия (2013/2017)
Fig. 2. Production of apple, pear and quince in the Republic of Serbia (2013/2017)

Средното годишно производство на ябълки в Република Сърбия през периода 2013/2017 г. е 426 244,6 t (Фигура 2), класиращо страната ни на седмо място сред производителите от европейските страни. През същия период средното годишно производство на круши е 543,8 t, което нарежда страната ни на дванадесето място в Европа (WAPA, 2016; Републиканско статистическо бюро, Сърбия, 2017). По отношение на средно годишното производството на дюли 13532,4 t дюли, Република Сърбия представлява водещ европейски производител (FAO, 2018, Републиканско статистическо бюро, Сърбия, 2017). Но реален индикатор за ситуациата при семковите плодове е добивът. Според данни на Републиканското статистическо бюро Сърбия (2017), средните добиви от определени видове семкови плодове в периода на оценка са: 16,75 t ha^{-1} ябълки; 10,94 t ha^{-1} круши и 7,58 t ha^{-1} дюли (Фигура 3). В сравнение с добива на ябълки и круши на водещите европейски държави, добивите от тези плодове в Република Сърбия са няколко пъти по-ниски (FAO, 2018).

The average annual apple production in the Republic of Serbia in the period 2013/2017 was 426,244.6 tons (Figure 2), ranking our country as the seventh producer among European countries (WAPA, 2016; Republic Bureau of Statistics, Serbia, 2017). In the same period, the average annual pear production was 67,543.8 tons, which ranked our country on twelfth place in Europe (WAPA, 2016; Republic Bureau of Statistics, Serbia, 2017). Regarding the average annual production of 13,532.4 tons of quince, the Republic of Serbia represents a leading European producer (FAO, 2018, Republic Bureau of Statistics, Serbia, 2017). However, the real indicator of the situation in pome fruits production is yield. According to the data of the Republic Bureau of Statistics, Serbia (2017), average yields of certain pome fruit species in the assessed period are: apple – 16.75 t ha^{-1}; pear – 10.94 t ha^{-1} and quince – 7.58 t ha^{-1} (Figure 3). Compared to the yield of apple and pear of leading European countries, yields of these fruit species in the Republic of Serbia are several times lower (FAO, 2018).



Фиг. 3. Среден добив от ябълки, круши и дюли в Република Сърбия (2013/2017)

Fig. 3. Average yield of apple, pear and quince in the Republic of Serbia (2013/2017)

Добивът и колебанията в средното годишно производство на семковите видове, зависят от температурните условия през периода на зимния покой, щетите от пролетни мразове, суша, градушки, повърхностни води и алтернативното плододаване. Тези условия отреждат най-голям дял на екстензивните овощни градини. Напоследък са създадени интензивни ябълкови насаждения, което ще повлияе увеличаването на общото производство и добива от единица площ (Keserović et al., 2013). Добивите от ябълки в тези насаждения са от 80 до 100 t ha^{-1}, с над 90 % плодове клас екстра и първокласни. Средните добиви на ябълки в някои региони на Република Сърбия от младите и високо интензивни насаждения са 26425,6 t ha^{-1} (Републиканско статистическо бюро, Сърбия, 2017). Освен това, се създават нови насаждения от круши и дюли, въпреки че те не са съпроводени с технологии за интензивно отглеждане, като ябълките.

Избор на сортове и подложки

Изборът на ябълкови сортове и подложки и тяхното взаимно комбиниране е най-важното за създаването на нови производствени насаждения. При избора на сорт, е необходимо да се имат предвид високите стандарти за качество на плодовете, специфичните изисквания на потребителите на целевия пазар и силната конкуренция. Освен това трябва да бъдат взети под внимание агро-екологичните условия на местата, в които се планира създаването на нови овощни градини. В постарите ябълкови овощни градини в Република Сърбия най-разпространен е сорт "Айдаред", следван от сортове от групата "Златна превъзходна", "Грени Смит", "Джонаголд" и "Червена Превъзходна" (Nikolić et al., 2012). От интродуцираните сортове в съвременните насаждения, значителен дял принадлежи на сортове ‘Golden Delicious

The yield and oscillations of the average annual production of pome fruit species have occurred as consequences of temperature changes during the period of dormancy, as well as the spring frost damage, drought, hail, surface water and alternate bearing. All of the above is an indicator that the largest number of orchards is extensive. In recent times, highly intensive apple plantations have been established, which will also affect the increase in total production and yield per unit area (Keserović et al., 2013). Apple yields in these plantations range from 80 to 100 t ha^{-1}, with over 90% of extra and first-class fruits. Regarding this, average apple yields in some regions of the Republic of Serbia with a larger share of young and highly intensive plantations are 26,425.6 t ha^{-1} (Republic Bureau of Statistics, Serbia, 2017). Furthermore, new plantations of pear and quince are being established, although they are not accompanied by intensive growing technology, as is the case of apple.

Choice of cultivars and rootstocks

Choice of apple cultivars and rootstocks and their mutual combinations is the most important for establishing new commercial orchard. When choosing a cultivar, it is necessary to take into account high standards of fruit quality, specificity of the consumers’ demands on target market and strong competition. Furthermore, the agro-ecological conditions of the sites in which the planting of new orchard is planned should be taken into account. In older apple orchards in the Republic of Serbia, the cultivar ‘Idared’ is most prevalent, followed by the cultivars from the group ‘Golden Delicious’, ‘Granny Smith’, ‘Jonagold’ and ‘Red Delicious’ (Nikolić et al., 2012). Among newly-introduced cultivars in modern plantations, a significant share belongs to the cultivars ‘Golden Delicious Reinders’, ‘Granny Smith Challenger’, ‘Superchief Spur Red

Reinders', 'Granny Smith Challenger', 'Superchief Spur Red Delicious', 'Red Delicious Jeromine', 'Gala Buckeye', 'Gala Fendeca','Fuji Kiku 8®', 'Braeburn Mariri Red®', 'Evelina®' и 'Pink Lady® (Lukić et al., 2016a).

Сортовете от групата на "Златна Превъзходна", с дял от 21 %, са водещи в производството за Европейския съюз през 2016 г., (WAPA, 2016). Следват сортовете от група "Гала" с дял от около 11 %, а "Айдаред" се нарежда на трето място, с дял от около 9 %. По данни от същия източник, делът на "Айдаред" в производството на ябълки в Европейския съюз се е удвоил през последните десет години, което е във връзка с изискванията на потребителите от руския пазар. Също така някои анализи и оценки показват, че въпреки големия брой нови сортове, от десетилетия в света се налагат "Златна превъзходна", "Червена превъзходна", "Гала", "Фуджи", "Айдаред", "Грани Смит" и "Бребърн" (Guerra, 2016.). Въз основа на тези анализи и предвид агро-екологичните условия на Република Сърбия, за създаване на интензивни ябълкови насаждения се препоръчват следните сортове: 'Golden Delicious' – 'Reinders®'; 'Granny Smith' – 'Challenger®'; от групата Red Delicious' тип спър 'Superchief®Sandige', 'Redchief®Camspur', 'Scarlet Spur®Evasni' и 'Red Cap Valdor®'; групата 'Red Delicious' стандартни – 'Red Delicious Redvelox®', 'Red Delicious Jeromine' и 'King® Roat Red Delicious'; групата 'Fuji' – 'Fui Kiku 8®' и 'Fubrax®'; групата 'Jonagold' – 'Red Jonaprince®'; групата на 'Gala' – 'Gala Schnitzer Schinga®', 'Brookfield®Baigent Gala', 'Buckeye Gala®Simmons', 'Galaxy Selecta®' и 'Devil Gala'; групата 'Braeburn' 'Hillwell® Hidala' и 'Mariri Red®'.

Най-разпространената ябълкова подложка в света и в нашата страна е М9. В световен мащаб се използват различни клонови подложки, характе-

Delicious', 'Red Delicious Jeromine', 'Gala Buckeye', 'Gala Fendeca', 'Fuji Kiku 8®', 'Braeburn Mariri Red®', 'Evelina®' and 'Pink Lady®' (Lukić et al., 2016a).

The leading apple cultivars in the European Union in 2016 (WAPA, 2016) were those from the 'Golden Delicious' group, with a production share of about 21%. Cultivars from the group 'Gala' follow with a share of about 11%, whereas the 'Idared' ranks third with a share of about 9%. According to the data from the same source, the share of the 'Idared' in the European Union's apple production has doubled in the last ten years, which can be associated with the demands of the Russian consumer market. Also, some analyses and estimations showed that, despite a large number of newly released apple cultivars, for ten years now the world's leading cultivars will still be 'Golden Delicious', 'Red Delicious', 'Gala', 'Fuji', 'Idared', 'Granny Smith' and 'Braeburn' (Guerra, 2016). Based on these analyses and considering the agro-ecological conditions of the Republic of Serbia for the establishment of intensive apple plantations, the following cultivars are recommended: 'Golden Delicious' – 'Reinders®'; 'Granny Smith' – 'Challenger®'; 'Red Delicious' spur type group – 'Superchief®Sandige', 'Redchief®Camspur', 'Scarlet Spur®Evasni' and 'Red Cap Valdor®'; 'Red Delicious' standard types group – 'Red Delicious Redvelox®', 'Red Delicious Jeromine' and 'King® Roat Red Delicious'; 'Fuji' group – 'Fui Kiku 8®' and 'Fubrax®'; 'Jonagold' group – 'Red Jonaprince®'; 'Gala' group – 'Gala Schnitzer Schinga®', 'Brookfield®Baigent Gala', 'Buckeye Gala®Simmons', 'Galaxy Selecta®' and 'Devil Gala'; 'Braeburn' group – 'Hillwell® Hidala' and 'Mariri Red®'.

The most prevalent apple rootstock in the world and in our country is M 9. Worldwide, different clones of the

ризиращи се с по-добро вкореняване. Най-важната от тях е T337 NAKB. Други подложки, подобни на M9, също се използват по целия свят и въпреки че те показват по-добри резултати по отношение на устойчивост към огнен пригор, листна въшка по ябълката и ниски температури, нито една от тях не е въведена в Република Сърбия. Водещи подложки в модерните сгъстени, ябълкови насаждения, с интензивна агротехника, трябва да бъдат M 9 и клон NAKB (T) 337. Те се препоръчват за умерено и силно растящи сортове. Подложките MM106 и M 26 се препоръчват за сортовете от спъров тип, като "Червена превъзходна", отглеждани при неполивни условия.

Най-стабилен в Европа е асортиментът на крушата. Производството на круши в света и в нашата страна е доминирано от сортовете, утвърдени през 18ти и 19ти век (Milatović, 2009). В Република Сърбия е представен от летните сортове, от които най-разпространени са "Вилямова масловка" и "Санта Мария", а през последните години, като сорт с по-голямо значение се е наложил "Кармен". Сред зимните сортове круши най-често отглеждан е сортът "Абат Фетел". В много стари овощни градини съществува сортът "Попска круша", който не се препоръчва за създаването на нови насаждения, поради ниското качеството на плодовете. Според данни на WAPA (2016) в Европейския съюз преобладават крушовите сортове "Конфърънс" (42,3 %), "Абат Фетел" (13,4 %) и "Вилямова масловка" (11.6 %). Предишни опити показаха, че "Конфърънс" не е подходящ за отглеждане при екологичните условия на Сърбия, поради появата на пригори по листата.

При избора на крушови сортове за структурата на комерсиалното производство, трябва да бъде отчетена липсата на рано и средно-

aforementioned rootstock, characterized by better rooting are used. The most important of them is T337 NAKB clone. Other rootstocks that are similar to M 9 are also used worldwide, although they show better results in terms of resistance to fireblight, wooly apple aphid and low temperatures, but none of them has been introduced in the Republic of Serbia. Leading rootstocks in modern high-density apple plantations, where intensive agro and pomo-technical measures are applied, should be M 9 and the clone NAKB (T) 337. They are recommended for moderately vigorous and vigorous cultivars. Rootstocks MM106 and M26 are recommended for grafting of spur types of 'Red Delicious' grown under non-irrigated conditions.

The European pear has the most stable assortment of cultivars among fruit species. The production of pear both in the world and in our country is dominated by the cultivars released in 18th and 19th century (Milatović, 2009). The pear assortment in the Republic of Serbia is dominated by summer cultivars of which most prevalent are 'William's Bon Chrétien' and 'Santa Maria', while in recent years, the 'Carmen' has become more important cultivar. Among winter pear cultivars, the most commonly grown is 'Abate Fetel'. In very old orchards, the cultivar 'Cure' is present, which is not recommended for the establishment of new plantations due to the poor fruit quality. According to the WAPA data (2016), the following pear cultivars are prevalent in the territories of the European Union: 'Conference' (42.3%), 'Abate Fetel' (13.4%) and 'William's Bon Chrétien' (11.6%). Previous experience showed that the 'Conference' was not suitable for growing under Serbian ecological conditions, due to the occurrence of burns on leaves.

When choosing a pear cultivar structure for commercial production, the lack of early and medium-early ripening cultivars on the market should be taken

ранно зреещи сортове (Nikolić and Mitrović, 2009). От по-рано зреещите сортове се препоръчват за отглеждане "Хубава юнска", "Джулиана", "Кося Прекоче", "Бутира Прекоче Муретини" и "Турандот". Отчитайки факта, че сортовете с леко червена или изцяло червена кожица са търсени на световния пазар, но заемат по-малки площи, средно-рано зреещият сорт "Анджелия" също представлява интерес. Той е нов сорт от Изследователския институт по овощарство Чачак, с изцяло тъмно червена кожица (Lukić et al., 2016b). Между есенните и зимните сортове, освен "Абат Фетел", се препоръчват сортове "Боскопска масловка" и "Пакъмс триумф".

Производството на круши се характеризира с липса на поливалентна подложка, която да се адаптира към различни почвени условия и да бъде съвместима с отглежданите сортове. Освен това, при избора на подложка за круши, трябва да имаме предвид възможностите за напояване и целта на производството. Най-често използваните подложки в Европа са вегетативни, дюлеви (*Cydonia oblonga* L.), които ограничават растежа и ускоряват встъпването в плододаване. Основният недостатък на тези подложки е слабата съвместимост с някои крушови сортове. Освен тях се използват също и подложки от круша (*Pyrus comunis* L.). В Съединените американски щати се използват най-вече подложки *Pyrus communis* L. (OH × F). Те се адаптират най-добре към почвено-климатичните условия на тази страна и са устойчиви на огнен пригор и листна въшка. Използваните подложки за круши в Република Сърбия са семенни от дива круша и вегетативни дюлеви.

За напред използването на дива круша, като подложка, може да се препоръча само в случай на създаване на неполивни насаждения. За интензивни насаждения от круши се

into account (Nikolić and Mitrović, 2009). Of the earlier ripening cultivars, 'Bella di Giugno', 'Juliana', 'Coscia Precoce', 'Butirre Precoce Morettini' and 'Turandot' are recommended for growing. Considering the fact that pear cultivars with a red blushed or completely red fruit skin are required on the world market for growing on smaller areas, the mid-early ripening cultivar 'Anđelija' may be interesting too. 'Anđelija' is a newly released, completely dark red skinned cultivar from the Fruit Reserch Institute, Čačak (Lukić et al., 2016b). Among autumn and winter cultivars, besides the 'Abate Fetel', the cultivars 'Beurre Bosc' and 'Packham's Triumph' are also recommended.

Pear production is characterized by the absence of a polyvalent rootstock that would be adapted to different soil conditions and be compatible with the grown cultivars. Apart from that, when choosing a pear rootstock, we should bear in mind the possibility of irrigation and the purpose of the production. The most commonly used rootstocks in Europe are the vegetative ones originating from quince (*Cydonia oblonga* L.), which reduce the vigour and affect earlier productivity of grafted pear cultivars. The main disadvantage of these rootstocks is poor compatibility with certain pear cultivars. Beside them, the pear-derived rootstocks (*Pyrus comunis* L.) are also used. In the United States, clonal *Pyrus communis* L. (OH × F) rootstocks are mostly used. They are best adapted to the climatic conditions and soils of this country, and are resistant to fireblight and wooly apple aphid. Pear rootstocks used in the Republic of Serbia are the seedlings of wild pears and vegetative rootstocks originating from quince.

In the forthcoming period, the use of wild pear seedling as a rootstock can be recommended only in the case of establishing plantations under conditions without irrigation. In high-density pear

препоръчват: дюля ADAMS, дюля MA, дюля Ba 29 и дюля SYDO. Използване на дюля MC не се препоръчва, поради чувствителността ú към екстремни зимни студове.

В световното производство на дюли има около 100 сорта, но липсва доминиращ сорт (Nikolić, 2009), тоест сортовете са специфични за определен регион (Nikolić et al., 2012). В нашата страна се отглеждат главно старите местни сортове ’Лесковачка’ и ’Враниска’, а българският сорт "Шампион" присъства в по-малка степен. За обогатяване на сортимента се препоръчва сорт "Морава", селекциониран в Изследователския институт по овощарство Чачак, както и интродуцираните сортове "Асеница", "Триумф" и "Хемус".

При производството на дюли в Република Сърбия се използват дюлеви подложки. На практика най-често използваната подложка е дюля MA, поради нейната добра съвместимост с всички сортове, но трябва да се даде приоритет на дюля Ba 29, заради здравата коренова система и толерантност към варовити почви. Препоръчва се също използването на дюля SYDO.

Технология на отглеждане

Посадъчен материал. Успешното плодопроизводство не може да се постигне без високо качество на посадъчния материал. Добре развитите и здрави дръвчета осигуряват ранна реколта и по-бърза възвръщаемост на инвестициите. За създаване на високо интензивни ябълкови и крушови градини, е добре посадъчният материал да има формирани достатъчен брой, добре развити странични разклонения, в зоната на бъдещата корона. Така наречените ‘knip’ дървета, осигуряват ранно встъпване в плододаване и кон-

plantations, the leading rootstock in the upcoming period should be: quince ADAMS, quince MA, quince Ba 29 and quince SYDO. Use of the quince MC is not recommended due to the susceptibility to severe winter frosts.

In the world’s production of quince there are about 100 cultivars with no cultivar dominating the production (Nikolić, 2009), namely some cultivars are specific to certain region (Nikolić et al., 2012). In our country, the old indigenous cultivars ‘Leskovacka’ and ‘Vranjska’ are mainly grown, while the Bulgarian cultivar ‘Champion’ is present to a lesser degree. In order to intensify the quince production, apart from ‘Leskovacka’ and ‘Champion’, a domestic cultivar ‘Morava’, derived from planned hybridization at the Fruit Research Institute, Čačak, as well as introduced cultivars ‘Asenica’, ‘Triumph’ and ‘Hemus’are also recommended.

In the production of quince in the Republic of Serbia, vegetative rootstocks originating from quince have been used. In practice, the most commonly used rootstock is quince MA due to its good compatibility with all cultivars, but the priority should be given to the quince Ba 29 due to its stronger root and tolerance to higher lime content in the soil. The use of quince SYDO is recommended as well.

Growing technology

Planting material. Successful fruit production cannot be achieved without high quality nursery trees. Well-developed and healthy nursery trees allow early cropping and faster return of investments. For establishing highly intensive apple and pear orchards, nursery trees with adequate number of well-developed premature branches are deployed in the formation zone of the future crown. These are so-called ‘knip nursery trees that provide early productivity (Hrotko et al., 2000; Wertheim et al., 2000), thereby

трол на вегетативния растеж (Hrotko et al., 2000; Wertheim et al., 2000). Освен това, в първите години след засаждане, са по-лесни за манипулиране (Palmer and Warrington, 2000) по-продуктивни са и изискват по-малко труд в процеса на формиране на короната и грижите (Van der Berg, 2003). През последните години някои разсадници в Република Сърбия започнха производство на такива дървета, но то не задоволява нуждите на производителите по отношение на асортимента от сортове и качество на материала и следователно големи количества от ябълковите и крушовите дръвчета се внасят.

Подобна е ситуацията и при посадъчния материал от дюли. Проблем в производството на дюли е чувствителност към огнен пригор [*Erwinia amylovora* (Burnill)]. Основен начин за преодоляване на този проблем е използването на сертифицирани или стандартни калеми от избрани, здрави, маточни дървета (Nikolić, 2009). На този етап в нашата страна няма достатъчно маточни дървета за калеми и някои качествени сортове не са включени в официалния национален списък на сортовете. Липсват и качествени маточници за подложки.

Създаване на насаждения. Знае се, че продуктивността на семковите овощни видове се обуславя от адекватния подбор и комбинация от съвместими сортове, както и реда им на засаждане. При създаването на ябълкови и крушови насаждения в Република Сърбия до скоро, най-често използвана бе комбинацията от сортове в двойни редове. Основният сорт е представен в шест или четири реда, а сортовете опрашители в два или четири реда. Тази концепция е запазена в насажденията от круши до този момент, докато при ябълките, днес се използва концепцията моносорт, което означава, че всяко 20то дърво в един ред е сортът опрашител. По този

controlling the vegetative growth of trees as well. Apart from that, in the first years after planting, manipulation with trees is easier (Palmer and Warrington, 2000), and during exploitation such trees are more productive and require less labor in the process of crown formation and care (Van der Berg, 2003). In the last few years, some nurseries in the Republic of Serbia started producing these trees, though such production does not meet the needs of growers in terms of cultivar assortment and quality of material and therefore the large quantities of apple and pear nursery trees are imported.

Similar situation is with nursery trees for the new quince orchards. The main problem in quince production is sensitivity to the fireblight [*Erwinia amylovora* (Burnill)], and one of the basic ways to overcome this problem is the use of one-year certified or standard nursery trees that come from selective and healthy mother trees (Nikolić, 2009). At this moment in our country, there are not enough mother trees for grafting, and some of the quality cultivars are not included in the official national list of cultivars. There is also a lack of quality mother planted rootstocks.

Plantation establishment. Productivity of pome fruit species is known to be conditioned by an adequate selection and a combination of compatible cultivars, as well as their planting order. When establishing apple and pear plantations in the Republic of Serbia in the previous period, the most commonly used was the combination of cultivars in double rows. The main cultivar was represented with six or four rows and pollinizer cultivars with two or four rows. This concept has been retained in pear plantations to date, while in apple the concept of monocultivar orchards is used today, which means that a pollinizer cultivar is planted as every 20^{th} tree in a row, thus achieving a share

начин се постига дял от около 3 % опрашители в едно насаждение.

Декоративни видове (crabapples) като ‘Professor Springer’, ‘Golden Gem’, ‘Crimson Gold’, ‘Everest’, ‘Red Santinel’ и ‘Hillary’ се използват като опрашители, защото те обикновено имат малко по-ранен и по-дълъг цъфтеж от основните сортове и няма объркване или смесване на плодовете при прибирането. В този вид насаждения се осигурява полесна защита срещу болести и вредители, улеснява се прореждането и прибирането на реколтата (Keserović et al., 2017).

В съвременните ябълкови насаждения, стандартната схема е 3.20 m до 3.60 m между редовете и 0.60-0,65 m в реда при спъровите и 0,75-0,80 m при стандартните сортове. Броят на растенията на хектар варира от 3900 до 5200.

Интензификацията на производството на круши и дюли е ограничена от избора на подложка. В зависимост от използваната подложка, пространството в насаждения на круши варира от 4.5-5 m × 2.5-3.5 m при присадените върху дива круша, до 3.2-3,5 m × 0,8-1,0 m върху дюлевите подложки ADAMS или MA. Създаването на интензивни насаждения не се препоръчва в Република Сърбия, тъй като те включват големи инвестиции с несигурен резултат, главно поради трудния контрол над огнения пригор [*Erwinia amylovora* (Burnill)] и крушова листна бълха [*Cacopsilla piry* (L.)], както и контрол на растежа и недостатъчното познаване на спецификата на технологията на отглеждане (Radivojević et al., 2017a). По-новите овощни градини от дюли се базират на по-големи разстояния на засаждане, в сравнение с ябълковите и крушовите. Разстоянието между редовете е 5-6 m, разстоянието в реда е 3-4 m.

Система за формиране. При избора на формировка в съвременните насаждения, тенденцията е младите дръвчета да встъпят рано в плододаof about 3% of pollinizers in the plantation.

The flowering crabapples, such as ‘Professor Springer’, ‘Golden Gem’, ‘Crimson Gold’, ‘Everest’, ‘Red Santinel’ and ‘Hillary’ are used as pollinizers, because they generally have slightly earlier and longer flowering time than main cultivars, and also there is no confusion about what to pick at harvest. This orchard design provides easier protection against diseases and pests, as well as thinning and fruit harvesting (Keserović et al., 2017).

In recent apple plantations, the planting has been standardized with planting space 3.20 m to 3.60 m between rows, and 0.60–0.65 m in-row spacing for spur types and 0.75–0.80 m for standard cultivars. The number of plants per hectare varies from 3,900 to 5,200.

Intensification of pear and quince production is limited by the rootstock selection. Depending on the rootstock used, the space in pear plantations varies from 4.5–5 m × 2.5–3.5 m in case of wild pear seedling, up to 3.2–3.5 m × 0.8–1.0 m if the ADAMS or MA quince is used as the rootstock. Establishing of high-density plantings is not recommended in the Republic of Serbia, because they involve high investments with uncertain outcome, primarily due to difficult control of the fireblight [*Erwinia amylovora* (Burnill)] and pear psyllid [*Cacopsilla piry* (L.)], as well as vigour control and insufficient knowledge of specific growing technology (Radivojević et al., 2017a). Newer orchards of quince are based on a somewhat larger planting space in relation to apple and pear. The distance between rows is 5–6 m, while in-row spacing is 3–4 m.

Training system. When choosing a training system in modern plantations, there is a tendency to bring young trees into production early, actually to develop

ване и да развият силна корона, която да издържи плодовия товар. Най-разпространената системата за формиране при интензивните ябълкови насаждения в Република Сърбия е вретеновидната и някои нейни модификации, докато при по-старите овощни градини присъстват вретеновидната, пирамидална и отворена ваза. В съвременните крушови градини в нашата страна, при присаждане върху по-слабо растящи подложки се използва вретеновидната формировка.

За сортове, присадени върху семенна подложка дива круша, като системи за формиране се използват вретеновидна, пирамидална корона и палмети. Най-често използваната система за формиране при дюлите е отворен ваза, въпреки че опитът показва, че се постигат добри резултати и при пирамидална корона.

Управление (регулиране) на плододаването. Семковите видове са известни като много взискателни по отношение на технологията на отглеждане. Стандартът в производството на ябълки в Република Сърбия е засаждане с голяма гъстота, с мрежи против градушка и напоителни системи, изградени едновременно със създаването на насажденията. Някъде се прилагат и системи за защита от слани. Това намалява риска от отрицателни въздействия на определени метеорологични условия върху реколтата (Veličković and Golijan, 2015). Използването на мрежи против градушка и монтирането на напоителни системи в насажденията от круши и дюли в нашата страна са рядко срещани. За постигането на постоянни и високи добиви, придружени от съответното качество на плодовете е необходимо редовно и своевременно прилагане на съответните агротехнически мерки като: зимна и лятна резитба, напояване, торене, защита от градушка, защита от измръзване, химическо прореждане и др.

a strong tree architecture that can support crop loads. The most represented training system in intensive apple plantations in the Republic of Serbia is spindle and some of its modifications, while in older orchards there is a presence of spindle bush, pyramidal crown and open vase crown. In recent pear orchards in our country in the case of grafting of cultivars on the rootstocks of poorer vigor, the spindle has been used.

Spindle bush, pyramidal crown and palmetto are used as a training system, if rootstock is the seedling of a wild pear. The most commonly used training system for quince is open vase crown, although experience has shown that good results are achieved in case of the use of pyramidal crown as well.

Crop load management. Pome fruit species are known as very demanding in terms of growing technology. The standard in apple production in the Republic of Serbia is a high-density planting with anti-hail nets and irrigation systems simultaneously set up with the plantation establishment. Anti-frost systems have been sporadically installed too. These reduce the risk of negative impacts of certain meteorological circumstances on yield (Veličković and Golijan, 2015). The use of anti-hail nets and installation of irrigation systems in pear and quince plantations in our country is a rare case. In order to achieve regular and high yields accompanied by appropriate fruit quality, regular and timely application of appropriate agro- and pomo-technical measures is necessary such as: winter and summer pruning, irrigation, fertilization, anti-hail protection, frost protection, chemical thinning, etc.

Резитбата със сигурност е едно от най-важните мероприятия, прилагани в насажденията. Целта е правилно формиране и поддържане на короната, плодородието и регулиране на растежа, високо качество на плодовете и дълъг живот на дърветата. Днес в ябълковите насаждения в Сърбия, късата резитба' се заменя от така наречената дълга резитба, където двугодишните клони не се режат. По този начин намалява растежната сила на овощните дървета, стимулира се образуването на цветни пъпки, улеснява се химическото прореждане, в резултат на това плодовете се оцветяват по-добре и се намалява предварителното опадане. Въвеждането на съвременни системи за отглеждане, доведе до неизбежното прилагане на зелена резитба. Два са ключовите моменти на резитбите през вегетационния период. Първият, по време на интензивния растеж на леторастите и формиране вида на короната, посредством избора на необходимите и премахването на ненужните и конкурентни летораст. Вторият момент е след приключването на интензивния растеж, с допълнителни коригиращи действия за формиране, да се стимулира диференциация на цветните пъпки за следващата година, стимулиране на развитието на плода и оцветяването, улесняване на растителната защита.

Въпросът за регулиране силата на растеж на дърветата стои основно при насажденията от круши. През периода на покой, освен намаляване на храненето и напояването, се прилага подрязване на кореновата система. Възможно е използване на растежни регулатори, като в нашата страна за тази цел е регистриран "Регалис", представляващ прохексадион-калций® (Radivojević et al., 2017b).

Освен за регулиране на растежа, в съвременните насаждения от семкови овощни видове се използват регулатори за прореждане на цветовете и

Pruning is certainly one of the most important pomo-technical measures applied in plantations. It aims at proper formation and maintenance of the crown, productivity and vigour regulation, high quality of fruits and a long life of trees. Nowadays, in apple plantations in Serbia, short pruning' is being replaced by the so-called 'long pruning', where two-year branches are not shortened. In this way, the vigor of fruit trees is decreased, the formation of flower buds is stimulated, and thus chemical thinning of fruits facilitated, resulting in better coloration of fruits and a decrease in their fall-off.

Introduction of modern growing systems brought the inevitability of using green pruning. During vegetation period, within pruning, the two key terms are distinguished. The first, at the time of the intense growth of the shoots and is directed towards the formation of a type of crown by selecting the necessary and removing unnecessary and competitive shoots. The second term is after the intensive growth of shoots has been completed and, in addition to some corrective actions directed towards the formation of the crown form, it mainly refers to the stimulation of differentiation of flower buds for the next year, stimulation of the fruit development and coloring, contributing to better protection against diseases and pests.

The issue of regulating the vigour of trees is especially evident in pear plantations. Apart from the reduction of nutrition and irrigation, cutting of the root system is also applied during the period of dormancy. Application of growth regulators is possible as well, and in our country, 'Regalis', which represents prohexadione-calcium®, has been registered for these purposes (Radivojević et al., 2017b).

Besides regulation of tree vigour, some growth regulators have been used in modern plantations of pome fruit

плодовете, за предотвратяване диференцирането на плодни пъпки, за стимулиране развитието на партенокарпни (безсеменни) плодове и за предотвратяване преждевременно окапване на плодовете. От споменатите регулатори, при ябълковите насаждения в Република Сърбия се използват регулатори на растежа, за прореждане на цветовете и плодовете. На базата на интензивни изследвания, проведени в нашата страна, химическото прореждане е въведено в редовната практика (Keserović et al., 2009; Lukić et al., 2012a, 2012b; Lukić and Marić, 2013),. Прореждането на цветовете се основава предимно на амониев тиосулфат (ATS), който се смята за безопасен за, околната среда и потребителите (Milić et al., 2011). За прореждане на плодовете се използват Нафталин ацетамид (NAD), α-нафтилацетилова киселина (NAA) и 6-бензиладенин (BA).

Прореждането на цветовете и плодовете на крушата и дюлята не е обичайна практика в развитите страни. Третиране с гиберелини (A_3 или GA_{4+7}) се препоръчва с цел формиране на партенокарпни плодове при крушите.

Някои сортове ябълки, широко разпространени и в нашата страна, като "Айдаред", "Джонаголд" и групите на "Червена Превъзходна" и до известна степен сортовете от групата на "Златна превъзходна", се характеризират с отделяне на голямо количество етилен и склонност за предварително опадане преди прибирането на реколтата (Radivojević et al., 2017b). Такива плодове нямат оптимален цвят, зрялост и размер и затова не могат да се използват. За да се предотвратят тези значителни загуби в ябълковото производство, се препоръчва употребата на NAA, AVG (амино етокси винил глицин) и MCP (метилциклопропен) самостоятелно или в комбинация AVG + NAA, или MCP и AVG + NAA (Yuan and Li, 2008).

Една от най-важните агротехнически мерки в съвременните насаж-

species for flowers and fruits thinning, to prevent the differentiation of generative buds, to stimulate germination of partenocarp fruits and to prevent the fruit drop before harvest. From the aforementioned, in apple plantations in the Republic of Serbia, plant growth regulators are used for thinning of flowers and fruits. Based on intensive research conducted in our country (Keserović et al., 2009; Lukić et al., 2012a, 2012b; Lukić and Marić, 2013), chemical thinning has been introduced into regular practice. Flower thinners are mostly based on ammonium thiosulphate (ATS), which is considered user, environment and consumer safe (Milić et al., 2011). Naphthalene acetamide (NAD) preparations, α-naphthylacetic acid (NAA) and 6-benzyladenine (BA) are used for fruit thinning.

Pear and quince flower and fruit thinning is not common in developed countries. Treatment with gibberellins (A_3 or GA_{4+7}) is recommended for the purpose of forming partenocarp fruits in pears.

Some apple cultivars, which are at the same time most represented in our country, such as ‘Idared’, ‘Jonagold’ and ‘Red Delicious’ groups, and to some degree the cultivars from the ‘Golden Delicious’ group, are characterized by high ethylene production and tendency to pre-harvest fruit drop (Radivojević et al., 2017b). Such fruits have no optimal colour, maturity and size and cannot be used accordingly. In order to prevent these significant losses in apple orchards, NAA, AVG (amino ethoxy vinyl glycine) and MCP (methylcyclopropene) are recommended to be used alone or in combination AVG + NAA, or MCP and AVG+NAA (Yuan and Li, 2008).

One of the most important agrotechnical measures in modern plantations of pome fruit species is fertilization.

дения е торенето. Чрез него се компенсира липсата на определени хранителни вещества в зоната на кореновата система, необходими за нормалния жизнен цикъл. Количествата на някои елементи, които трябва да бъдат вложени в почвата, се определят на база установената запасеност (Ankerman and Large, 1977). Доставят се хранителни елементи, необходими за вегетативния растеж и добива (Mišić, 1994). Хранителният статус и специфичните нужди за определени хранителни елементи може да се определят с листна диагностика, но това не се практикува често в нашата страна (Milošević and Milošević, 2015). В Република Сърбия, се прилагат различни системи за торене (с грануларен тор или чрез капкови емитери).

В съвременните насаждения се прилага също и листно подхранване, за компенсиране на значително помалко липсващи хранителни вещества в листата и плодовете. Видът и дозата хранителни вещества се определят според почвено-климатичните условия, стадият на развитие, начините на поддържане, т.е. напояване (Jivan and Sala, 2014).

В държавите с най-развито плодопроизводство, практически е застъпена концепцията за Интегрирано производство на плодове до 90 и повече процента от площите (Nikolić et al., 2012). Според него всички агро-технически мерки се извършват по определени правила (защита, торене, напояване, прореждане, поддържане на почвата, събиране на реколтата, съхранение и т.н.). Специално внимание се отделя на избора на средствата за защита срещу болести и вредители, карантинния период и методите за прилагане, според възможните странични ефекти, превантивни и биологични мерки. Тази концепция предполага подаване на заявка за включване в режим за Интегрирано производство, приемане на задължението за спаз-

Fertilization provides compensation of certain nutrients in the root system zone of plants enabling their normal life cycle. The quantities of certain elements that need to be put into the soil are specified according to the determined fertility of the soil (Ankerman and Large, 1977) and delivering nutritional elements necessary for vegetative growth and fruiting of the trees (Mišić, 1994). Fruit nutritional state and determination of the specific needs for certain nutritive elements is most likely to be defined by leaf analyzing (Milošević and Milošević, 2015), which is not a common practice in our country. Different systems of fertilization in the orchards of pome fruit species (soil application of granular fertilizers or fertigation through drip emitters) in the Republic of Serbia are applied.

In modern plantations, foliar nutrition is applied too, compensating that way less lacking quantities of nutrients in leaves and fruits. The type and rate of the applied nutritives is defined according to soil and climatic conditions, vegetation stage, orchard management practices, i.e. irrigation (Jivan and Sala, 2014).

In the most developed fruit growing countries, the concept of Integrated fruit production has been applied in practice to 90% and more of the surface (Nikolić et al., 2012). In this production concept, the regulations prescribe all agro-technical measures (protection, fertilization, irrigation, thinning, land maintenance, harvesting, storing, etc.). According to the respective programme, a special attention is given to the choice of means for protection against diseases and pests, with holding period and application methods according to possible side effects, preventive and biological measures. This concept implies filing for inclusion in the integrated production mode, acceptance of the obligation to comply with the prescribed technology and its control from the competent service and finally, marketing that

ване на предписаната технология и контрол от страна на компетентните служби и накрая, маркетинг, който осигурява поблагоприятна пазарна позиция. Въз основа на "AGRIOS" моделът от Южен Тирол, в някои ябълкови насаждения във Войводина е започнало развитие по модела на интегрираното производство в Република Сърбия (Keserović et al., 2007; 2012) и в предстоящия период е необходимо да се направи преходът от традиционно към интегрирано производство на плодове при модерните ябълкови градини (Keserović et al., 2017).

Събиране и съхранение на плодове. Основна предпоставка за успешен маркетинг е качеството на плодовете, значително обусловено от срока за прибиране на реколтата и условията на съхранението ú. Найголям напредък в Република Сърбия е постигнат в съвременните технологии за съхранение при ябълките. Все поголям брой производителите на ябълки, с цел правилно определяне времето за прибиране на реколтата, все повече използват методи като теста йод-нишесте, твърдост на плодовете и съдържание на разтворими твърди вещества, а по-малко разчитат на опита и субективните оценки, като оцветяването на плодовете. Следвайки увеличението на ябълковото производство, броят и капацитетът на складовете с модерна контролирана атмосфера (CA), също нараства. Най-често тези складове/хранилища имат възможност за намаляване на нивата на кислорода и въглеродния диоксид под 1 % ((ULO), а технологията за Динамично контролирана атмосфера (DCA), позволява съхраняването на плодове при много ниски концентрации на кислород, което също се използва в някои складове. Синтетично произведените подобрители на качеството на ябълките, включително такива като "SmartFresh®" и "Fitomag", които съдържат 1-MCP са регистрирани в Република Сърбия, съответно 2011 г. и 2016 г. Тези

provides a more favorable market position. Based on the “AGRIOS” model from South Tyrol, in some apple plantations in Vojvodina, development of the Integrated Production Model in the Republic of Serbia has begun (Keserović et al., 2007; 2012) and in the upcoming period, the transition of conventional to integrated fruit production is necessary to be done in modern apple orchards (Keserović et al., 2017).

Harvesting and storing fruits. The quality of fruits is a basic precondition for successful marketing largely conditioned by the harvest time and storage conditions. The greatest progress in the Republic of Serbia has been made in the modern apple storage technologies.

An ever-increasing number of apple growers, with the aim of properly determining the harvest time have been increasingly using methods such as iodine-starch test, firmness of fruit and soluble solids content, while being decreasingly reliant on experience and subjective evaluations such as fruit coloration.

Following the increase of apple production, the number and capacity of modern controlled atmosphere (CA) storages has also been increasing. Most commonly, these storages have the possibility of reducing oxygen and carbon dioxide levels below 1% (ULO), while Dynamic Controlled Atmosphere (DCA) technology, which allows the keeping of fruits at very low oxygen concentrations, has also been used in some storages.

Synthetically produced quality enhancers of apple fruit, such as ‘SmartFresh®’ and ‘Fitomag’, which contain 1-MCP, have been registered in the Republic of Serbia since 2011 and 2016, respectively.

These quality enhancers are capable of

подобрители на качеството са в състояние да потиснат етиленовото действие и да повлияят положително на твърдостта и сочността на плодове, по-дългото запазване на зеления цвят на кожицата и предотвратяване появата на петна при чувствителните сортове (Magazin et al., 2010; 2017).

С цел допълнително подобряване на технологията на съхранение на ябълките, трябва да се обърне повече внимание за адекватно прилагане на агротехническите мероприятия в овощната градина, което се отнася предимно до правилното торене, напояване и прилагането на биорегулатори и калций (Magazin and Đurović, 2017).

От друга страна при производството на круши, по-голямата част се преработва, а по-малък дял е предназначен за директна консумация, следователно по-дългото съхранение на плодовете е рядко срещано. Въз основа на опита от други развити страни, плодовете на "Вилямова масловка", както и плодовете на други есенни и зимни сортове круши, могат успешно да се съхраняват в складове с Контролирана Атмосфера (CA) за по-дълъг период от време. Препоръчва се третиране с 1-MCP-базирани подобрители на качеството. Освен това, качеството при класифицирането и опаковането на круши трябва да бъде значително подобрено, което е основна предпоставка за тяхното признаване на международния пазар. Тъй като дюлите като плод са предназначени за преработка, съхраняването на плодовете в типични охладителни складове е само временна мярка, прилагана в някои случаи.

inhibiting ethylene action and positively affect the firmness and juiciness of fruits, longer retention of the skin green colour preventing the occurrence of scalds in susceptible cultivars (Magazin et al., 2010; 2017).

In order to further intensify the storage technology of apple fruits, more attention should be paid to adequate application of agro- and pomo-technical measures in the orchard, which primarily refers to proper nutrition, irrigation and application of bioregulators and calcium (Magazin and Đurović, 2017).

On the other hand, most of the pear production is being processed and smaller share is intended for table consumption, therefore the longer storing of fruits is rare. Based on the experience from other developed countries, the fruits of 'William's Bon Chrétien', as well as the fruits of other autumn and winter pear cultivars, can be successfully kept in CA storages over a longer time period.

Treatment with 1-MCP-based quality enhancers is recommended. Apart from that, the quality of classification and packaging of pear fruits must be significantly improved which are basic preconditions for their recognition in the international market. Since the fruit of quince is planned for processing, keeping the fruit in regular cold storages is just a temporary measure applied in some cases.

ИЗВОДИ

През последните няколко години са направени следните основни промени в производството на семкови плодове в Република Сърбия (особено при ябълките): нови сортове и клонове на стари такива, както и нови подложки с по-слаб растеж; по-високо качество на посадъчния материал; технологията на

CONCLUSIONS

During the last few years, the following major changes in the production of pome fruit species in the Republic of Serbia (especially apple) have been made: new cultivars and clones of old ones, as well as new rootstocks of poorer vigour, are being introduced in modern plantations; high quality nursery trees are

отглеждане се интензифицира, чрез: увеличаване броя на растенията на единица площ, въвеждане на много нови агротехнически мероприятия и увеличаване на площите с инсталирани напоителни системи и мрежи против градушка; технология с контролирана атмосфера, за дългосрочно съхранение, с цел поддържане на доброто качество на плодовете и удължаване срока на годност на пресните плодове.

Допълнителните дейности, целящи да подобрят производството на ябълки, круши и дюли се базират на гореспоменатите мерки. Важна е и подкрепата на държавата в модернизацията на производството, чрез благоприятни заеми и субсидиране за създаване на насаждения, осигуряване на подходящи напоителни системи, защита срещу градушка и слана, закупуване на селскостопанска техника и изграждане на плодо-хранилища.

За да се постигнат международните стандарти за качество и да се повиши конкурентоспособността на пазара, е необходимо асоциацията на производителите да изисква по-нататък да се постигне значително подобрение във воденето, подкрепата, координирането, разпространението и насърчаването на производството на семкови плодове в Република Сърбия.

used for planting; growing technology is intensified by: increasing the number of plants per unit area, introducing many new agro- and pomo-technical measures, and increasing area with installed irrigation systems and anti-hail nets; controlled atmosphere storage technology is being used for long-term storage in order to maintain good fruit quality and extend shelf life of fresh fruits.

Further activities aiming to intensify apple, pear and quince production are based on the aforementioned measures. In addition, it is also important to emphasize the support of the state in production modernization through enabling favorable loans and subsidizing establishment of plantations, procurement of appropriate irrigation systems, anti-hail and anti-frost protection, procurement of agricultural machinery, and building of storage capacities.

In order to achieve international standards in terms of fruit quality and to increase competitiveness in the market, further association of growers is required to bring substantial improvement in leading, supporting, coordinating, representing and promoting the pome fruits production in the Republic of Serbia.

БЛАГОДАРНОСТИ

Тази дейност се подкрепя със субсидия от Министерството на образованието, науката и технологичното развитие на Република Сърбия, Проект № TR-31064.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work is supported by the grant of Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia, Project No TR-31064

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Ankerman, D. and R. Large**, 1977. Minor elements. Soil and Plant Analysis. Madison, Wisconsin, USA, Soil Science Society of America, Inc., pp. 34–45.
2. FAOSTAT FAO Statistics Division. http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor, 2018.
3. **Hrotko, K., Magyar, L. and Z. Ronay**, 2000. Improved featherinhg on apple nursery trees by BA application. *Acta Horticulturae*, 514, 113–122.
4. **Jivan, C. and F. Sala**, 2014. Relationship between tree nutritional status and apple quality. *Horticultural Science*, 41(1), 1–9.

5. **Keserović, Z., Gvozdenović, D., Magazin, N. and B. Milić**, 2007. Integrated fruit production. *Economics of Agriculture*, 54(2), 149–160 (Sr).
6. **Keserović, Z., Magazin, N., Milić, B. and A. Kurjakov**, 2009. Handbook for apple fruit thining. Faculty of Agriculture, Novi Sad (Sr).
7. **Keserović, Z., Injac M., Magazin N., Milić B. and M. Dorić**, 2012. Integrated and organic apple production. *Contemporary Agriculture*, 61 (3–4), 286–295.
8. **Keserović, Z., Magazin, N., Milić, B., Dorić, M., Bošnjak, B. and J. Gošić**, 2013. High density planting of apple. Faculty of Agriculture, Novi Sad (Sr).
9. **Keserović, Z., Magazin, N., Kurjaković, A., Dorić, M. and J. Gošić**, 2014. Agriculture in the Republic of Serbia, fruit growing. Statistical Office of the Republic of Serbia, Belgrade (Sr).
10. **Keserović, Z., Lukić M., Radivojević D., Magazin N. and B. Milić**, 2017. The modern assortment and growing technology of apple. In: Conference 'Modern fruit growing', 2–3 November 2017, Banja Koviljača, Republic of Serbia (Abstract), 7–10 (Sr).
11. **Lukić, M. and S. Marić**, 2013. Effects of NAA alone and in combination with BA on the fruit thinning of scab-resistant apple trees. *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans*, 16, 1: 280–295.
12. **Lukić, M., Marić, S., Glišić, I. and N. Milošević**, 2012a. Application of NAA and BA in chemical fruit thinning of 'Red Delicious' apple group. *Journal of Pology*, 46 (177–178), 7–15.
13. **Lukić, M., Marić, S., Glišić, I. and N. Milošević**, 2012b. Fruit thinning of 'Čadel' and 'Golden Rainders' apple trees with NAA and BA. *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans*, 5, 4: 857–864.
14. **Lukić, M., Milatović, D., Keserović, Z., Milošević, T., Leposavić, A., Korać, N. and S. Todić**, 2016a. Current situation and perspectives of fruit growing and viticulture in the Republic of Serbia. In: 15th Serbian congress of fruit and grapevine producers with international participation, 21–23 September 2016, Kragujevac, Republic of Serbia (Abstract), 16–21.
15. **Lukić, M., Pešaković, M., Marić, S., Glišić, I., Milošević, N., Radičević, S., Leposavić, A., Đorđević, M., Miletić, R., Karaklajić-Stajić, Ž., et al.**, 2016b. Fruit cultivars developed at Fruit Research Institute, Čačak (1946–2016), Fruit Research Institute, Čačak, Republic of Serbia, pp.182.
16. **Magazin, N. and D. Đurović,** 2017. Modern technologies for storing fresh fruit. In: Conference 'Modern fruit growing', 2–3 November 2017, Banja Koviljača, Republic of Serbia (Abstract), 55–57 (Sr).
17. **Magazin, N., Gvozdenović, D., Keserović, Z. and B. Milić**, 2010. Fruit quality of 'Granny Smith' apples picked at different harvest timea nad treated with 1-MCP. *Fruits*, 65(3), 191–197.
18. **Magazin, N., Keserović, Z., Milić, B., Miodragović, M. and J. Tarlanović**, 2017. The influence of 1-Methylcyclopropene on fruit quality of 'Granny Smith' apple cultivar depending on applied concetration and storage conditions. In: Proceedings of 4th conference 'Fruit innovation', Republic of Serbia, pp. 99–106 (Sr).
19. **Milatović, D.**, 2009. Pear and quince breeding achievements in the world. In: Proceedings of 2nd conference 'Fruit innovation', Republic of Serbia, pp. 25–38 (Sr).
20. **Milić, B., Magazin, N., Keserović, Z. and M. Dorić**, 2011. Flower thinning of apple cultivar Braeburn using ammonium and potassium thiosulfate. *Horticultural Science*, 38(3), 120–124.

21. **Milošević, T. and N. Milošević**, 2015. Apple fruit quality, yield and leaf macronutrients content as affected by fertilizer treatment. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 15 (1), 76–83.
22. **Mišić, P.**, 1994: Apple. Nolit, Belgarde (Sr).
23. **Nikolić, M.**, 2009. Quince industry in Serbia – state and prospects. In: Proceedings of 2nd conference 'Fruit innovation', Republic of Serbia, pp. 169–176 (Sr).
24. **Nikolić, D., Keserović, Z., Magazin, N., Paunović, S., Miletić, R., Nikolić, M. and J. Milivojević**, 2012. Condition and development prospects of fruit growing in Serbia. In: Paper and abstract proceedings of the 14th Serbian congresss of fruit and grapevine producers with international participation, pp. 3–22 (Sr).
25. **Nikolić, M. and M. Mitrović**, 2009. Biological and pomological properties of promising pear hybrids. In: Proceedings of 2nd conference 'Fruit innovation', Republic of Serbia, pp. 123–128.
26. **Palmer, J.W. and I.J. Warrington**, 2000. Underlying principles of successful apple planting systems. *Acta Hortuculturae*, 513, 357–363.
27. **Radivojević, D., Đurović, D., Keserović, Z., Oparnica, Č., Veličković, M. and M. Lukić**, 2017a. Improvement of pear and quince growing in Serbia. In: Conference 'Modern fruit growing', 2–3 November 2017, Banja Koviljača, Republic of Serbia (Abstract), 11–14 (Sr).
28. **Radivojević, D., Milivojević, J., Veličković, M. and Č. Oparnica**, 2017b. The use of plant bioregulators in deciduous fruit trees. In: Proceedings of 4th conference 'Fruit innovation', Republic of Serbia, pp. 5–26 (Sr).
29. Republic Bureau of Statistics, Belgrade, 2017. Statistical Gazette of the Republic of Serbia 2017 (Sr).
30. **Van der Berg A.**, 2003. Certified nursery tree production in Holand. *The Compact Fruit Tree*, 36(2), 43–45.
31. **Veličković, M. and J.M. Golijan**, 2015. Concept of integral protection of aple and pear. *Journal of Agricultural Sciences*, 60(4), 381–393 (Sr).
32. **Guerra, W.**, 2016. Updated information on the most promising apple cultivars and mutants. In: 15th Serbian congress of fruit and grapevine producers with international participation, 21–23 September 2016, Kragujevac, Republic of Serbia (Abstract), 22–25.
33. **Wertheim, S.J., Wagenmakers, P.S., Bootsma, J.H. and M.J. Groot**, 2000. Orchard systems–conditions for success. The Compact Fruit Tree, 33(3), 79–81.
34. World Apple and Pear Association (WAPA), 2016. www.wapa-association.org.
35. **Yuan, R. and J. Li**, 2008. Effect of sprayable 1-MCP, AVG, & NAA on ethylene biosynthesis, preharvest fruit drop, fruit maturiti and quality of apples. *Horticultural Science*, 43(5), 1454–1460.

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2018, 21 (4), 166-182 ISSN 1311-0489 (Print)
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan ISSN 2367-8364 (Online)

Оценка на генетичната идентичност на *in vitro* подложки за круша Pyrodwarf

Татяна Вуйович[1]*, Радосав Церович[2], Джурджина Ружич[1], Татяна Мариянович[1]

[1]Изследователски институт по овощарство, Чачак, Република Сърбия
[2]Център за иновации, Факултет по технология и металургия, 11000 Белград, Сърбия

An assessment of genetic integrity of *in vitro* shoots of Pyrodwarf pear rootstock

Tatjana Vujović[1]*, Radosav Cerović[2], Đurđina Ružić[1], Tatjana Marjanović[1]

[1]Fruit Research Institute, 32000 Čačak, Serbia
[2]Innovation Center, Faculty of Technology and Metallurgy, 11000 Belgrade, Serbia
**E-mail: tvujovic@institut-cacak.org*

Received: 26.04.2018 *Accepted:* 19.11.2018 *Published:* 12.12.2018

РЕЗЮМЕ

Най-важният аспект при *in vitro* размножаването е да се провери генетичната сигурност на тъканните култури. В настоящото изследване са използвани три техники за оценка на генетичната еднаквост на растения получени чрез микроразмножение от подложка за круша Pyrodwarf (*Pyrus communis* L.). *In vitro* летораститe са получени от диференцирани меристеми (с аксиларен произход) и листни експланти (адвентивна издънкова регенерация). Направеният анализ, за оценка нивото на плоидност на ДНК, чрез поточна цитометрия, не показва значими разлики в съдържанието на ядрената ДНК, между летораст от адвентивна издънкова регенерация, *in vitro* летораст от аксиларен произход и *in vivo* контролни растения, отглеждани на открито. Преброяването на хромозоми във върхна коренова меристема също показва нормален брой диплоидни хромозоми (2*n* = 2*x* = 34) и при двата вида *in*

SUMMARY

The most important aspect of *in vitro* propagation technology is to verify genetic fidelity of tissue culture-raised plants. In the present study, three techniques were employed to assess genetic integrity of micropropagated shoots of Pyrodwarf (*Pyrus communis* L.) pear rootstock. *In vitro* shoots derived either from organized meristems (axillary origin) or from leaf explants (adventitious origin). Flow cytometry analysis deployed to estimate the DNA ploidy level revealed no significant differences in nuclear DNA content among adventitious regeneration-derived shoots, *in vitro* shoots of axillary origin and *in vivo* control plants from open field. Chromosome counting in root tip meristems also showed a normal diploid chromosome number (2*n* = 2*x* = 34) in both type of *in vitro* shoots.

vitro летораст. Въпреки това, електрофорезата с полиакриламиден гел на пероксидаза (POX), от листната тъкан, разкрива същите POX модели, като при майчини растения отглеждани на открито и *in vitro* летораст от аксиларен произход, докато летораст с адвентивна издънкова регенерация показват аксиларен полиморфизъм в POX профилите, в зависимост от специфичната цитокинин/ауксинова комбинация, използвана за адвентивна издънкова регенерация. Получените резултати показват, че въпреки че тъканните култури поддържат обща генетична стабилност на цитогенетично ниво, е необходимо допълнително изследване с мощни ДНК маркери, особено при летораст с адвентивна издънкова регенерация.

Ключови думи: аксиларно разклоняване, адвентивен органогенез, цитокинини, ауксини, поточна цитометрия, брой хромозоми, изопероксидаза

However, polyacrylamide gel electrophoresis of peroxidases (POX) extracted from the leaf tissue revealed the same POX banding patterns in open field mother plants and *in vitro* shoots of axillary origin, while adventitious-derived *in vitro* shoots exhibited polymorphism in POX profiles depending on the specific cytokinin/auxin combination used for adventitious regeneration. The obtained results indicate that although tissue culture plants maintained gross genetic stability at cytogenetic level, further investigation using powerful DNA markers is required, especially in adventitious regeneration-derived shoots.

Key words: axillary branching, adventitious organogenesis, cytokinins, auxins, flow cytometry, chromosome number, isoperoxidase

УВОД

Растителната тъканна култура се превърна в основен инструмент за размножаване на много растителни видове, особено за подложки на овощни дървета. Традиционните методи за размножаване и поддържане на обезвирусени подложки в разсадниците са изключително продължителни и трудоемки (Bommineni et al., 2001). Разработването на технологии за тъканни култури, проправи пътя за бързо размножаване и запазване генплазмата на елитни подложки, особено когато се изисква качество на посадъчния материал в голям мащаб и за кратко време. Също така, *in vitro* технологията, в съчетание с рекомбинантна ДНК технология, се използват в момента като мощен инструмент за подобряване на съществуващата генетична плазма и развитие на трансгенни растения.

В края на 70-те години на 20-ти век са публикувани доклади за микроразмножаване, чрез пролиферация на аксиларни летораст на повече от двадесет крушови сорта, включително основните сортове *Pyrus communis* (Bell and Reed,

INTRODUCTION

Plant tissue culture has become a major propagation tool for many plant species, especially for fruit tree rootstocks. Namely, the traditional methods of propagation and maintenance of disease free rootstocks in nursery facilities are extremely time- and labor-consuming processes (Bommineni et al., 2001). Development of tissue culture techniques has paved the way for rapid propagation and conservation of elite rootstock germplasm, especially when the quality of planting material is required on a large scale and for a short time. Also, *in vitro* culture techniques in combination with recombinant DNA technology are currently being used as a powerful tool for improvement of existing germplasm and development of transgenic plants.

Since the late 1970s, micropropagation protocols by axillary shoot proliferation have been published for over twenty cultivars of pear, including the major *Pyrus communis* cultivars (Bell and Reed, 2002). *In vitro* propagation has

2002). *In vitro* размножаването се прилага при някои крушови подложки като например *Pyrus pyrifolia* (Burm F.) (Thakur and Kanwar, 2008), *P betulaefolia* L. (Yeo and Reed, 1995; Hassanen and Gabr, 2012), *P. pashia* (Rehman et al., 2014), *P. calleryana* (Yeo and Reed, 1995; Antunes de et al., 2004), както и различни подложки от *P. communis* (Yeo and Reed, 1995; Mehri-Kamoun et al., 2004; Rahman et al. al., 2007; Ružić et al., 2011; Wang, 2015; Dimitrova et al., 2016). Микроразмножаването чрез адвентивна издънкова регенерация от листни експланти също е установено при крушови подложки, като OHF333 и BP10030 (Zhu and Welander, 2000; Nacheva et al., 2009), Fox11 и Pyrodwarf (Martinelli et al., 2009; Vujović et al., 2014). Повечето изследвания са съсредоточени върху влиянието на растежните регулатори (PGRs), минералния състав на хранителната средата, възраст и вид на експлантите, произход на експлантите, условия на инкубацията (продължителност на субкултурата, фотопериод, интензитет на светлината, температура) регенериращата способност на *in vitro* летораст. Но по време на тъканното култивиране може да се генерира генетична изменчивост, наречена сомаклонално вариране, (Larkin and Scowcroft, 1981). Следователно, клоновата чистота е от голямо значение при микроразмножаването на овощни дървета, които имат дълъг производствен период.

Микроразмножаването чрез аксиларното разклоняване, се счита за подходящо за осигуряване на генетична еднаквост и надеждност на *in vitro* растенията, но растежните регулатори, особено синтетичните, прилагани на суб- и супер-оптимални нива, показват, че са свързани със сомаклоналната изменчивост (Martin et al., 2006). От друга страна, случайната пролиферация на летораст в растителна клетъчна и тъканна култура, особено ако се осъществява индиректно през междинната фаза на калусиране, често води до сомаклонална изменчивост, което прави тази стратегия помалко желана за клоново размножаване в голям мащаб (Thorpe, 1994).

За откриване на сомаклоналната

also been reported in several pear rootstocks like *Pyrus pyrifolia* (Burm F.) (Thakur and Kanwar, 2008), *P betulaefolia* L. (Yeo and Reed, 1995; Hassanen and Gabr, 2012), *P. pashia* (Rehman et al., 2014), *P. calleryana* (Yeo and Reed, 1995; Antunes de et al., 2004) as well as different *P. communis* rootstocks (Yeo and Reed, 1995; Mehri-Kamoun et al, 2004; Rahman et al., 2007; Ružić et al., 2011; Wang, 2015; Dimitrova et al., 2016). Micropropagation via adventitious shoot regeneration from leaf explants has also been established for dwarfing pear rootstocks, such as OHF333 and BP10030 (Zhu and Welander, 2000; Nacheva et al., 2009), Fox11 and Pyrodwarf (Martinelli et al., 2009; Vujović et al., 2014). Most of these studies have concentrated on the influence of plant growth regulators (PGRs), mineral composition of medium, age and type of explants, origin of explants, incubation conditions (duration of subculture, photoperiod, light intensity, temperature), on shoot regeneration capacity *in vitro*. However, genetic variability, termed somaclonal variation, can be generated during tissue culture (Larkin and Scowcroft, 1981). Therefore, clonal fidelity is of major importance in micropropagation of fruit tree species having long generation time.

Micropropagation based on axillary branching is considered adequate in providing genetic uniformity and true-to-typeness of *in vitro* plants, but plant growth regulators especially synthetic ones applied at sub- and super-optimal levels have been shown to be associated with somaclonal variation (Martin et al., 2006). On the other side adventitious shoot proliferation in plant cell and tissue culture, especially if it occurs indirectly via an intermediate callus phase, often results in somaclonal variation, making this strategy less desirable for large scale clonal multiplication (Thorpe, 1994).

Various methods can be used for the detection of somaclonal variation in

изменчивост в тъканните култури, могат да бъдат използвани различни методи.. Те са широко категоризирани като морфологични, физиологично/биохимични, цитологични и ДНК молекулярни техники. Всяка от тях има своите силни страни и ограничения (Bairu et al., 2011) и затова обикновено се изискват различни подходи за правилна оценка на този сложен феномен (Jin et al., 2008).

В настоящото изследване са използвани три техники за оценка на генетичната стабилност на *in vitro* летораст от крушова подложка 'Pyrodwarf' (*Pyrus communis* L.) (изчисляване на хромозомен брой, поточен цитометричен анализ на относителното съдържание на ядрената ДНК и изопероксидазен анализ). *In vitro* леторастите са микроразмножени чрез пролиферация на аксиларни летораст и чрез регенерирани адвентивни летораст, в съответствие с докладите на Vujović et al. (2014).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

In vitro културата е създадена от апикални и странични пъпки, на дървета от крушова подложка 'Pyrodwarf' (*Pyrus communis* L.). Тази подложка е диплоидна ($2n = 2x = 34$) и е избрана като клон BU 5-18 от 800 семеначета, получени от кръстоска на "Old Home" x "Bonne Luise d'Avranches", в Изследователския институт, Газенхайм, Германия (Jacob, 2002).

Стерилната култура на този генотип е установена съгласно процес, описан от Vujović et al. (2014). Микроразмножаването чрез усилено аксиларно разклоняване се извършва в хранителната среда Murashige и Skoog (1962) (MS), допълнена с 1 mg l^{-1} BA, 0,1 mg l^{-1} NAA и 0,1 mg l^{-1} GA_3. Регенерирането на адвентивни летораст се извършва, като се използват млади, напълно развити листа, взети от *in vitro* пролиферирали аксиларни летораст. Дръжките се изрязват, листата се режат три пъти напречно през средната

tissue culture-raised plants. They are broadly categorized as morphological, physiological/biochemical, cytological and DNA-based molecular techniques. Each of these techniques has their particular strengths and limitations (Bairu et al., 2011) and therefore different approaches are usually required for a correct evaluation of this complex phenomenon (Jin et al., 2008).

In the present study, three techniques (chromosomal number counting, flow cytometric analysis of relative nuclear DNA content and isoperoxidase analysis) were employed to assess genetic integrity of *in vitro* shoots of Pyrodwarf (*Pyrus communis* L.) pear rootstock. *In vitro* shoots were micropropagated either by axillary shoot proliferation or by adventitious shoot regeneration according to the protocols previously described by Vujović et al. (2014).

MATERIAL AND METHODS

In vitro stock culture was established from apical and lateral buds taken from mature trees of pear rootstock Pyrodwarf (*Pyrus communis* L.). This rootstock is diploid ($2n = 2x = 34$) and it was singled out as clone BU 5-18 among 800 seedlings obtained from crossings of 'Old Home' × 'Bonne Luise d'Avranches', undertaken at the Geisenheim Research Institute, Germany (Jacob, 2002).

Aseptic culture of this genotype was established according to the procedure previously described by Vujović et al. (2014). Micropropagation through enhanced axillary branching was performed on Murashige and Skoog (1962) medium (MS) supplemented with 1 mg l^{-1} BA, 0,1 mg l^{-1} NAA and 0.1 mg l^{-1} GA_3. Regeneration of adventitious shoots was carried out using young fully expanded leaves sampled from *in vitro* proliferating axillary shoots. Petioles were excised, leaves were cut three times transversely across the mid-vein, placed

жилка, като адаксиалната повърхност докосва регенериращата хранителна среда и са култивирани в продължение на 6 седмици при 23 ± 1 °C и 16-часов фотопериод. Основната среда за регенерация е MS хранителната среда, допълнена с четири комбинации с растежни регулатори PGR: TDZ при 1 mg l^{-1} и 2 mg l^{-1}, всеки комбиниран или с 2 mg l^{-1} IBA или 2 mg l^{-1} NAA (2 повторения x 3 петриеви блюда × 10 експланта за всяка комбинация от растежни регулатори (PGR)). Комбинациите от растежни регулатори (PGR) са избрани въз основа на резултатите от предишни експерименти за регенерация (Vujović et al., 2014).

Адвентивните издънки получени от всички варианти, се изолират поотделно, номерирани като отделни линии и след това се прехвърлят върху MS мултипликационна хранителна среда, съдържаща 1 mg l^{-1} BA, 0.1 mg l^{-1} NAA и 0.1 mg l^{-1} GA_3. След успешната пролиферация, както аксиларните, така и адвентивните издънки са вкорени в MS хранителната среда с минерални соли, редуцирани до 1/2, органичен комплекс непроменен и 1 mg l^{-1} IBA и 0.1 mg l^{-1} GA_3. Експериментите включват наблюдение на различни мултипликационни показатели и показатели за вкореняване (Таблица 1). Данните са анализирани чрез ANOVA тест, последван от теста на Duncan за многократно разделяне (P≤0.05). Преди анализа, данните под формата на проценти са подложени на arcsine трансформация.

Листни проби от 21 ден на *in vitro* аксиларни и адвентивни издънки, произхождащи от различни регенерационни среди са използвани за поточен цитометричен анализ на нивото на плоидност на ДНК. *In vivo* растения отглеждани на открито са използвани като контрола за сравнение на плоидите. Поточният цитометричен анализ е извършен от Gerard Geenen, Plant Cytometry Services (Schijndel,

with adaxial surface touching regeneration medium and cultured for 6 weeks at 23 ± 1 ^{o}C and 16-h photoperiod.

The basal medium for regeneration was MS medium supplemented with four PGR combinations: TDZ at 1 mg l^{-1} and 2 mg l^{-1} each combined with either 2 mg l^{-1} IBA or 2 mg l^{-1} NAA (2 repetitions × 3 petri dishes × 10 explants per each PGR combination).

These PGR combinations were selected based on the results of previous regeneration experiments (Vujović et al., 2014).

Adventitious shoots obtained from all treatments were isolated separately, numbered as individual lines and subsequently transferred on MS multiplication medium containing 1 mg l^{-1} BA, 0.1 mg l^{-1} NAA and 0.1 mg l^{-1} GA_3. After successful proliferation, both axillary and adventitious shoots were rooted on MS medium with mineral salts reduced to 1/2, organic complex unchanged, and 1 mg l^{-1} IBA and 0.1 mg l^{-1} GA_3.

Experiments included monitoring of different multiplication and rooting parameters (Table 1). Data were analyzed by ANOVA followed by Duncan's Multiple Range Test for mean separation (P≤0.05).

Before the analysis, data presented in the form of percentage were subjected to arcsine transformation.

Leaf samples collected from 21-day-old *in vitro* axillary and adventitious shoots originating from different regeneration media were used for flow cytometric analysis of DNA ploidy level. *In vivo* plants from the open field were used as control plants for ploidy comparison.

Flow cytometric analysis was performed by Gerard Geenen, Plant Cytometry Services (Schijndel, The Netherlands).

Холандия). Приготвянето на суспензии от цялостни ядра се извършва по метода на Arumuganathan & Earle (1991). Заедно с всяка листна проба е включен и вътрешен стандарт (*Ilex crenata* "Fastigiata" листна тъкан, 2C = 2,16 pg) и неговият G_0/G_1 пик (2C) е коригиран до около канал 300, зададен в линейна скала на интензитета на флуоресценцията FL2-DAPI). ДНК съотношенията са получени чрез разделяне на средната стойност на господстващия (G_0/G_1) пик на всяка проба, със средната стойност на G_0/G_1 пика на вътрешния стандарт.

За да се определи броят на хромозомите в *in vitro* издънките са събрани пет коренови връхчета от *in vitro* вкоренени аксиларни летораси и адвентивни летораси, произхождащи от различни среди. Активно нарастващите върхове на коренчетата са третирани предварително на тъмно за 48 часа при 4 °C с 2 µM бета-хидроксихинол (Ružić et al., 1991) и след това фиксирани за 24 часа в оцетен алкохол на тъмно при +4 °C Хидролизата отнема 12 минути в 5 N HCl, при стайна температура. Кореновите връхчета се изтеглят по метода на Feulgen и се слагат в капка ацетокармин. Метафазните хромозоми се преброяват в 2-4 клетки от всяка проба.

Екстракцията на протеини от листните проби се извършва съгласно метода на Bošković (1998). Протеинови екстракти се приготвят от млади листа, току що разлистени от *in vivo* растения, *in vitro* издънки от аксиларен произход и произволно получени *in vitro* летораси, произхождащи от различни третирания с растежни регулатори. Най-малко две независими проби от всеки вид генетичен материал са използвани за екстракция на протеин. Електрофорезата с полиакриламиден гел (PAGE) на изоферменти е извършена при 5-12.5% плътност на полиакриламидните гелове, съдържащи TBE буфер pH 8.3 (0.09 M Tris - борна киселина и 0.0024 M Na_2EDTA). Електрофорезата се провеж-

Preparation of suspensions of intact nuclei was performed following the method of Arumuganathan and Earle (1991). Together with each leaf sample an internal standard (*Ilex crenata* 'Fastigiata' leaf tissue, 2C = 2.16 pg) was also included, and its G_0/G_1 peak (2C) was adjusted to around channel 300 set on a linear scale of fluorescence intensity (FL2-DAPI). DNA ratios were obtained by dividing the mean of the dominant (G_0/G_1) peak of each sample by the mean of the G_0/G_1 peak of internal standard.

To determine the chromosome number of *in vitro* shoots, five root apices of *in vitro* rooted axillary and adventitious shoots originated from different regeneration media were randomly collected. Actively growing root tips were pre-treated in the dark for 48 h at 4 ºC with 2 µM beta-hydroxyquinolene (Ružić et al., 1991) and subsequently fixed for 24 h in acetic alcohol in the dark at +4 ºC. Hydrolysis took 12 min in 5 N HCl, at room temperature. Root tips were strained using the Feulgen procedure and squashed in a drop of acetocarmine. Metaphase chromosomes were counted in 2–4 cells from each sample.

The extraction of native proteins from leaf samples was performed according to the method described by Bošković (1998). Protein extracts were prepared from young, recently expanded leaves of *in vivo* plants, *in vitro* shoots of axillary origin and adventitious-derived *in vitro* shoots originating from different PGR treatments. A minimum of two independent samples from each type of genetic material were used for protein extraction. Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) of isozymes was performed on 5–12.5% density gradient polyacrylamide gels containing TBE buffer pH 8.3 (0.09 M Tris-boric acid and 0.0024 M Na_2EDTA). The electrophoresis

да за 1 и 3 часа при 100 и 300 V, съответно, при 4 °C, като се използва TBE буфер като резервоар. Геловете се оцветяват за активност на пероксидазата (POX) като се използва 3,3', 5,5'-тетраметилбензидин (TMBZ) (50 ml 1 M натриев ацетатен буфер pH 4,7, 50 ml метанол, 50 mg TMBZ и 2 ml H202 при 25 °C , на тъмно).

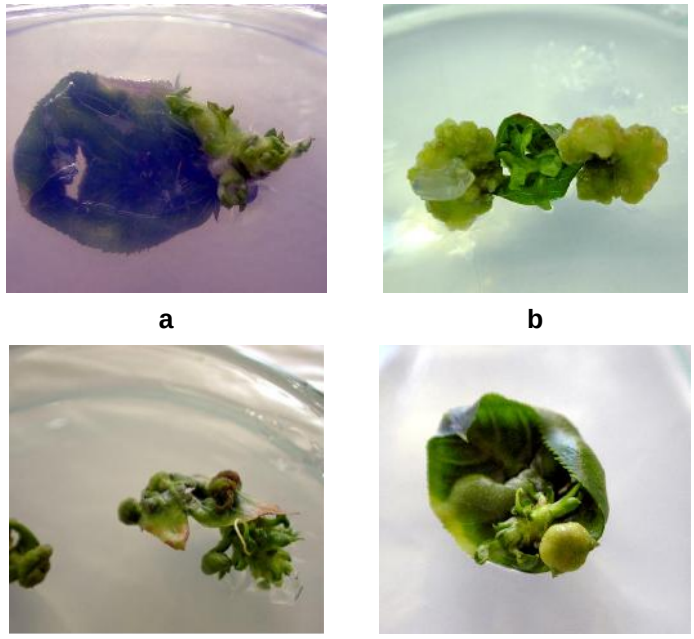
was carried out for 1 and 3 h at 100 and 300 V, respectively, at 4 ºC, using TBE as a tank buffer. Gels were stained for peroxidase (POX) activity using 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMBZ) (50 ml 1 M sodium acetate buffer pH 4.7, 50 ml methanol, 50 mg TMBZ and 2 ml H_2O_2, at 25 ºC, in the dark).

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

След шест седмици на отглеждане, процентът на регенерираните адвентивни летораст в MS хранителната среда, допълнена с различна комбинация от растежни регулатори (PGR) варира между 15-20%. Регенерирането е непряко и се формират клъстери от малки издънки върху абаксиларната страна на листата (Фигура 1 a-d).

RESULTS AND DISCUSSION

After six weeks of culture, rate of adventitious shoot regeneration on MS media supplemented with different PGR combination ranged between 15–20%. Regeneration was indirect and clusters of small shoots were formed on the abaxial side of leaves (Figure 1 a–d).



a **b**

c **d**

Фиг.1 Адвентивни издънки от крушова подложка 'Pyrodwarf' получени на MS хр. среда, допълнена с различни комбинации на растежни регулатори: TDZ 1 и IBA 2 mg l^{-1} (a); TDZ 1 и NAA 2 mg l^{-1} (b); TDZ 2 i IBA 2 mg l^{-1} (c); TDZ 2 i NAA 2 mg l^{-1} (d)

Fig. 1. Adventitious shoots of Pyrodwarf pear rootstock regenerated on MS medium supplemented with different PGR combinations: TDZ 1 and IBA 2 mg l^{-1} (a); TDZ 1 and NAA 2 mg l^{-1} (b); TDZ 2 i IBA 2 mg l^{-1} (c); TDZ 2 i NAA 2 mg l^{-1} (d)

По-високи стойности на регенерация на издънките (20%) са получени в MS хранителната среда, допълнена с IBA, в сравнение с тези, допълнени с NAA (15%). Получените резултати са в съответствие с предишни експерименти за регенерация на този генотип (Vujović et al., 2014), въпреки че процентът на регенерация е малко по-висок от първоначално получените.

След регенерирането, адвентивните издънки са успешно размножени върху MS хранителната среда, съдържаща 1 mg l^{-1} BAP, 0.1 mg l^{-1} NAA и 0.1 mg l^{-1} GA_3. След 5 седмици култивиране се измерват параметрите на мултиплициране и се сравняват с тези на аксиларните летораси (Таблица 1). Към края на периода на вкореняване (4 седмици), показателите за вкореняване също се сравняват по варианти (Таблица 1). Получените резултати не показват значителни разлики за повечето от измерените показатели между издънките с различен произход. Що се отнася до броя на корените на вкоренено растение и дължината на корена, значително по-високи стойности се получават при летораси от адвентивен произход, докато дължината на страничните издънки е по-висока при тези с аксиларен произход. Не са забелязани различия в морфологията между *in vitro* издънките от различен произход.

Higher values of shoot regeneration (20%) were obtained on MS media supplemented with IBA in comparison with those supplemented with NAA (15%). Obtained results are in accordance with previous regeneration experiments in this genotype (Vujović et al., 2014), although the regeneration rates are slightly higher than those obtained initially.

Following regeneration, adventitious shoots were successfully multiplied on MS medium containing 1 mg l^{-1} BAP, 0.1 mg l^{-1} NAA and 0.1 mg l^{-1} GA_3. Upon 5 weeks of cultivation, parameters of multiplication were measured and compared with those of axillary shoots (Table 1). In the rooting stage, towards the end of the rooting period (4 weeks), the rooting parameters were also compared between shoots of different origin (Table 1). The results obtained revealed no significant differences for most of the measured parameters between shoots of different origin. As regards the number of roots per rooted shoot and root length, significantly higher values were obtained in shoots of adventitious origin, while the length of lateral shoots was higher in those of axillary origin. No differences in morphology were noticed between the *in vitro* shoots of different origin.

Таблица 1. Сравнение на показатели за мултиплициране и вкореняване между издънки от ‚Pyrodwarf' с аксиларен и адвентивен произход
Table 1. Comparison of multiplication and rooting parameters between Pyrodwarf shoots of axillary and adventitious origin

Произход на летораси Origin of shoots	Индекс на мултипликация Multiplication index	Дължина аксиални летораси Length of axial shoots (mm)	Дължина аксиларни летораси Length of lateral shoots (mm)	Вкореняване Rooting (%)	Бр. корени No. of roots	Дължина на корените Root length (mm)	Дължина на вкоренени летораси Rooted shoot length (mm)
Аксиларни Axillary shoots	2.28 a*	20.0 a	13.5 a	90.0 a	4.4 b	20.8 b	18.9 a
Адвентивни Adventitious shoots	2.15 a	19.2 a	12.0 b	80.0 a	6.6 a	30.0 a	16.8 a

* Средни стойности за всеки показател следвани от същата буква нямат значими разлики според теста на Дънка (P≤0.05)
*Mean values for each parameter followed by the same letter are not significantly different according to Duncan's Multiple Range Test (P≤0.05)

Несъответствията в хромозомите включват числени (анеуплоидия, полиплоидия) и структурни (заличавания, дублиране, инверсии) промени, които са много често явление в тъканната култура, особено когато размножителната технология включва регенерация чрез образуване на калус. Следователно, цитологичните изследвания, включващи хромозомен анализ, се считат за полезни при оценката на генетичната вярност на растенията, отглеждани като тъканна култура (Chittora and Sukhwal, 2016). Хромозомните вариации често се срещат в растения, регенерирани от клетъчни суспензии и калусни култури (Al-Zahim et al., 1999; Tremblay et al., 1999, Jin et al., 2008). Въпреки това има доклади за цитологични вариации при *in vitro* издънки, получени от диференцирани меристеми и микроразмножаване чрез аксиларни разклоняване (Radić et al., 2005; Devi et al., 2015). За сравнение, резултатите от анализа на плоидното ниво, извършени в нашето изследване с помощта на два допълващи се подхода, предполагат, че не се наблюдават промени в плоидното ниво на летораст на 'Pyrodwarf', произхождащи от диференцирани меристеми (аксиларен произход) или от листни експланти (адвентивен произход).

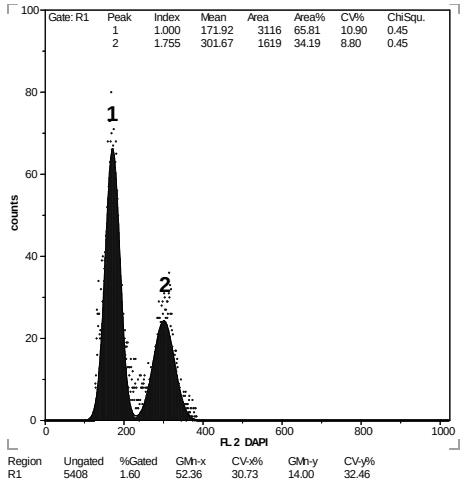
Нивото на плоидност на *in vitro* отгледаните издънки се оценява чрез поточен цитометричен анализ на малки парченца листни проби, взети от летораст с различен произход. Фигура 2a-c показва представителни ДНК хистограми на контролни растения, отглеждани на открито, микроразмножени с аксиларен и адвентивен произход, регенерирани върху MS хранителната среда, съдържаща 1 mg l^{-1} TDZ и 2 mg l^{-1} IBA.

Chromosome instability including numerical (aneuploidy, polyploidy) and structural (deletions, duplications, inversions) chromosome changes is a very common phenomenon in tissue culture especially when propagation technique involves regeneration via callus formation. Therefore, cytological investigations involving chromosome analysis have been considered useful for the evaluation of genetic fidelity of tissue culture-raised plants (Chittora and Sukhwal, 2016).

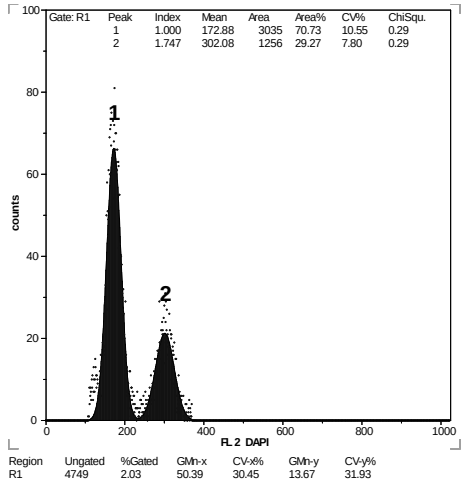
Chromosomal variations were frequently found in plants regenerated from cell suspensions and callus cultures (Al-Zahim et al., 1999; Tremblay et al., 1999; Jin et al., 2008). However there are reports of cytological variation in *in vitro* shoots derived from organized meristems and micropropagated through axillary branching (Radić et al., 2005; Devi et al., 2015).

In contrast, results on ploidy level analysis performed in our study by using two complementary approaches suggest that, no changes in ploidy level occurred in Pyrodwarf shoots derived either from organized meristems (axillary origin) or from leaf explants (adventitious origin).

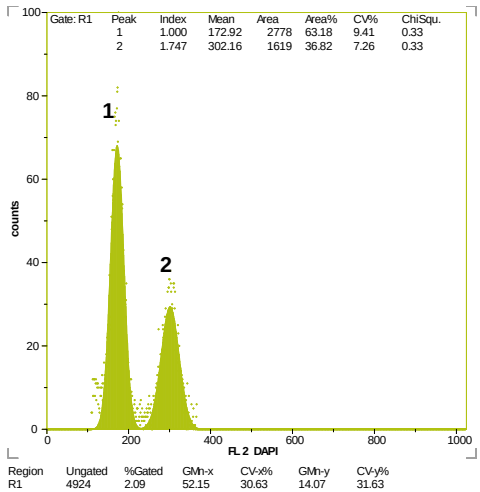
The ploidy level of *in vitro* raised shoots was estimated by flow cytometric analysis of small pieces of leaves sampled from the shoots of different origin. Figure 2a–c shows representative DNA histograms of control plants from open field, micropropagated shoots of axillary origin and adventitious shoots regenerated on MS medium containing 1 mg l^{-1} TDZ and 2 mg l^{-1} IBA.



a



b



c

Фиг. 2. Поточно-цитометрични хистограми от DAPI обагрени ядра изолирани от листна тъкан на крушова подложка 'Pyrodwarf' с различен произход: (a) контрола на открито, (b) микроразмножена издънка с аксиларен произход, (c) адвентивно възникнали леторасти. 1 - G_0/G_1 пик на пробите; 2 − G_0/G_1 пик на вътрешния стандарт

Fig. 2. Representative flow-cytometric histograms of DAPI stained nuclei isolated from leaf tissue of Pyrodwarf pear rootstock plants of different origin: (a) control plant from the open field, (b) micropropagated shoot of axillary origin, (c) adventitious regeneration-derived shoot. 1 − G_0/G_1 peak of samples; 2 − G_0/G_1 peak of an internal standard

Не се наблюдават значителни разлики в относителния дял на ДНК при издънки от адвентивен произход (0.56-0.57), издънки от аксиларен произход (0.57) и *in vivo* контролните растения (0.57) (Таблица 2). Пикът на позиция G_0/G_1 (около 170) и общият брой на пиковете (1), заедно с подобно съдържание на ядрената ДНК на *in vitro* издънки от аксиларен произход и леторасти от адвентивна издънкова регенерация, съответства на тези на *in vivo* растения, взети като диплоидна контрола (2n = 2x = 34). Въпреки че линейните FL2-DAPI хистограми на относителното ядрено ДНК съдържание на листата от всички видове

No significant differences in relative DNA ratios were observed among adventitious regeneration-derived shoots (0.56–0.57), micropropagated shoots of axillary origin (0.57) and *in vivo* control plants (0.57) (Table 2). Channel position (around 170) of the G_0/G_1 peak and the total number of peaks (1), along with similar nuclear DNA content of *in vitro* shoots of axillary origin and adventitious regeneration-derived shoots, corresponded to those of *in vivo* plants taken as diploid control (2*n* = 2*x* = 34). Although linear FL2-DAPI histograms of relative nuclear DNA content of leaves of all types of *in vitro* shoots showed single

in vitro лерасти показват отделни G_0/G_1 пикове, коефициентите на вариация (CV) на тези пикове са високи и варират от 8.2 до 10.9%. Високи CV стойности също са отчетени при други дървесни видове като Eucalyptus spp. (Grattapaglia and Bradshaw, 1994), Prunus spp. (Vujović et al., 2012), Rubus sp. (Vujović et al., 2010).

Според Loureiro et al. (2007), дървесните растителни видове съдържат фенолни съединения, които се отделят по време на екстракцията и могат да повлияят на достъпността на маркера до ядрената ДНК. Тъй като екстракционният буфер може значително да сведе до минимум отрицателните ефекти на някои цитозолни съединения, върху оцветяването на ДНК, трябва да се използва екстракционен буфер, препоръчан от Loureiro et al. (2007) за получаване на хистограми с по-висока резолюция. Високите стойности на вариационния коефициент (CV) биха могли да маскират възможното възникване на анеуплоидия, което предполага необходимост от провеждане на някои допълнителни изследвания, като например броене на хромозоми за оценка на плодидното ниво (Loureiro et al., 2005).

distinct G_0/G_1 peaks, coefficients of variation (CV) of these peaks were high and varied from 8.2 to 10.9%. High CV values were also recorded in other woody species such as *Eucalyptus* spp. (Grattapaglia and Bradshaw, 1994), *Prunus* spp. (Vujović et al., 2012), *Rubus* sp. (Vujović et al., 2010).

According to Loureiro et al. (2007) woody plant species contain phenolic compounds that are released during the nuclear isolation and may affect the accessibility of the dye to nuclear DNA. As nuclear isolation buffer can significantly minimize negative effects of some cytosolic compounds on DNA staining, the isolation buffer recommended by Loureiro et al. (2007) should be used to obtain histograms of higher resolution. High CV values could mask the possible occurrence of aneuploidy, which implies the necessity to conduct some complementary studies, such as chromosome counting for evaluation of ploidy level (Loureiro et al., 2005).

Таблица 2. Относителен дял на ДНК в листни проби на крушови подложки 'Pyrodwarf'с различен произход

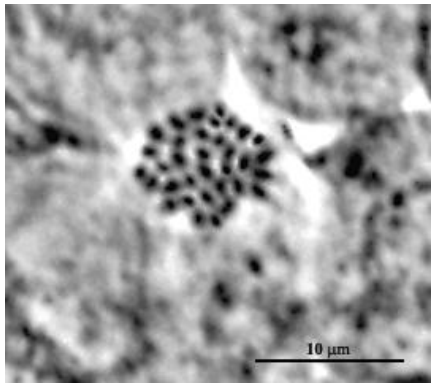
Table 2. Relative DNA ratio in leaf samples of Pyrodwarf pear rootstock plants of different origin

Произход на растенията/Origin of plant	Относителен дял на ДНК Relative DNA ratio*	Плоидно ниво на ДНК DNA ploidy level
Контрола от открито поле (*in vivo*) Control plants from open field (*in vivo* control)	0,57	2*n* = 2*x* = 34
Аксиларна издънка/Axillary shoot	0,57	2*n* = 2*x* = 34
Адвентивна издънка получена на MS хр. среда Adventitious shoot regenerated on MS medium containing 1 mg l^{-1} TDZ and 2 mg l^{-1} IBA	0.56	2*n* = 2*x* = 34
Адвентивна издънка получена на MS хр. среда Adventitious shoot regenerated on MS medium containing 1 mg l^{-1} TDZ and 2 mg l^{-1} NAA	0.57	2*n* = 2*x* = 34
Адвентивна издънка получена на MS хр. среда Adventitious shoot regenerated on MS medium containing 2 mg l^{-1} TDZ and 2 mg l^{-1} IBA	0,57	2*n* = 2*x* = 34
Адвентивна издънка получена на MS хр. среда Adventitious shoot regenerated on MS medium containing 2 mg l^{-1} TDZ and 2 mg l^{-1} NAA	0.56	2*n* = 2*x* = 34

*Ilex crenata 'Fastigiata' was internal standard for determination of relative DNA ratios. Relative DNA ratios are mean values of 3 independent measurements per each type of plant material

При изследване чрез светлинна микроскопия, открихме клетки с нормална морфология и единично ядро в кореновите меристеми при двата вида *in vitro* издънки. Преброяването на хромозомите в активно делящите се меристеми на аксиларните издънки, както и на летораст от адвентивна издънкова регенерация, не са открити нито полиплоидни, нито анеуплоидни клетки. Броят на хромозомите показва нормален брой диплоидни хромозоми (2*n* = 2*x* = 34) (Фигура 3).

By light microscopy examination, we detected cells of normal morphology and single nucleus in the root meristems in both types of *in vitro* shoots. The chromosome counting in actively-dividing meristems of axillary shoots as well as of adventitious regeneration-derived shoots revealed neither polyploid nor aneuploid cells. The chromosome number determination showed a normal diploid chromosome number (2*n* = 2*x* = 34) (Figure 3).



Фиг. 3 Метафазни хромозоми в меристемни клетки на коренови връхчета на адвентивни летораст на крушова подложка от 'Pyrodwarf' (2*n* = 2*x* = 34)
Fig. 3. Metaphase chromosomes in root tip meristem cells of adventitious shoots of pear rootstock Pyrodwarf (2*n* = 2*x* = 34)

Характеризирането на *in vitro* леторастите от различен произход също се извършва чрез електрофореза с полиакриламиден гел на изопероксидази, доказана като полезен биохимичен маркер за откриване на сомаклонална вариабилност (Elmaghrabi and Ochatt, 2006). Фигура 4 показва представителни електрофоретични профили, получени чрез оцветяване с TMBZ за пероксидази, извлечени от листа на растения с различен произход. Всяка ивица е маркирана със съкращение за пероксидаза с главни букви (POX), последвано от номер, движещ се в ред от най-бавната до най-бързо мигриращата форма. Първият ход от ляво на дясно

Characterisation of *in vitro* shoots of different origin was also performed by polyacrylamide gel electrophoresis of isoperoxidases proven to be useful biochemical markers for detecting somaclonal variability (Elmaghrabi and Ochatt, 2006).

Figure 4 shows representative electrophoretic profiles obtained by staining with TMBZ for peroxidases extracted from leaves of plants of different origin. Each band was marked with an abbreviation for peroxidase in capital letters (POX), followed by a number run in order from the slowest- to fastest-migrating form. The first run from left to right is a control plant from the open field,

е контролно растение отгледано на открито, вторият е издънка от аксиларен произход, а третата до шеста серия се отнасят до адвентивни издънки, произхождащи от различни хранителни среди. Анализът на гела се основава на наличието или липсата на ивици, докато разликите в интензитета на ивицата не се считат за отличителна черта. Пет полиморфни ивици са открити в POX профилите на всички анализирани проби, независимо от произхода на растенията (Фигура 4). Ленти определени като POX2 и POX 5 (Rm = 0.12 и Rm = 0.42, съответно) се наблюдават навсякъде. Електрофоретичните профили на *in vivo* контролни растения отглеждани на открито и *in vitro* издънки от аксиларен произход са идентични и имат допълнителна полиморфна ивица POX4 (Rm = 0.25). Тази ивица, но с по-нисък интензитет, също е представена в адвентивните издънки получени от хранителната среда, съдържаща 2 mg l^{-1} TDZ и 2 mg l^{-1} IBA или NAA. Независимо от произхода, всички адвентивни летораст имат полиморфна ивица POX3 (Rm = 0.14), която не е доказана при *in vivo* контролни растения на открито и *in vitro* издънки с аксиларен произход. В допълнение, една най-бавна ивица (POX1, Rm = 0,09) присъства само при адвентивни издънки, получени от хранителни среди, съдържащи 1 mg l^{-1} TDZ и 2 mg l^{-1} IBA или NAA. Резултатите показват, че адвентивните *in vitro* издънките проявяват полиморфизъм в POX профилите, в зависимост от специфичната цитокинин/ауксинова комбинация, използвана за адвентивно регенериране. По подобен начин, някои други доклади показват, че при специфични комбинации и съотношения на цитокинин/ауксин, адвентивната регенерационна система може да предизвика изменчивост (Nehra et al., 1992; Vujović et al., 2010).

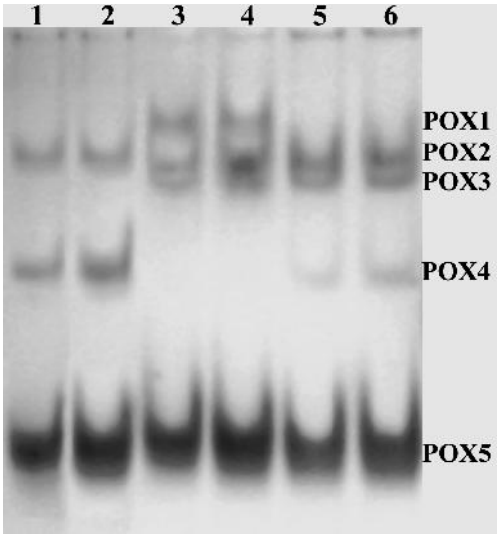
the second one is a shoot of axillary origin and the third to the sixth runs relate to adventitious shoots originating from different regeneration media.

The gel analysis was based on the presence or absence of bands, while differences in band intensity were not considered as a distinctive character. Five polymorphic bands were detected in POX profiles of all analysed samples, regardless of the origin of the plants (Figure 4). Bands designated as POX2 and POX 5 (Rm = 0.12 and Rm = 0.42, respectively) was evidenced everywhere. Electrophoretic profiles of *in vivo* control plants from open field and *in vitro* shoots of axillary origin were identical and they had additional polimorphic band POX4 (Rm = 0.25).

That band, but of lower intensity, was also presented in the adventitious shoots originated from media containing 2 mg l^{-1} TDZ and 2 mg l^{-1} IBA or NAA. Regardless of the origin, all adventitious shoots had polimorphic band POX3 (Rm = 0.14), which was not evidenced in *in vivo* control plants from open field and *in vitro* shoots of axillary origin.

In addition, one slowest band (POX1, Rm = 0.09) was present only in adventitious shoots originated from media containing 1 mg l^{-1} TDZ and 2 mg l^{-1} IBA or NAA. Results obtained indicate that adventitious-derived *in vitro* shoots exhibited polymorphism in POX profiles depending on the specific cytokinin/auxin combination used for adventitious regeneration.

Similarly, some other reports suggested that at specific cytokinin/auxin combinations and ratios, adventitious regeneration system can induce variability (Nehra et al., 1992; Vujović et al., 2010).



Фиг. 4. Изопероксидазни модели на листни проби на 'Pyrodwarf' получени с багрило TMBZ. Контролни растения на открито (1), издънка с аксиларен произход (2), адвентивни издънки получени на хр. среда MS с различни комбинации от растежни регулатори (PGR): 1 mg l^{-1} TDZ + 2 mg l^{-1} IBA (3), 1 mg l^{-1} TDZ + 2 mg l^{-1} NAA (4), 2 mg l^{-1} TDZ + 2 mg l^{-1} IBA (5), 2 mg l^{-1} TDZ + 2 mg l^{-1} NAA (6)
Fig. 4. Isoperoxidase patterns of Pyrodwarf leaf samples obtained by staining with TMBZ. Control plants from open field (1), shoot of axillary origin (2), adventitious shoots regenerated on MS medium with different PGR combinations: 1 mg l^{-1} TDZ + 2 mg l^{-1} IBA (3), 1 mg l^{-1} TDZ + 2 mg l^{-1} NAA (4), 2 mg l^{-1} TDZ + 2 mg l^{-1} IBA (5), 2 mg l^{-1} TDZ + 2 mg l^{-1} NAA (6)

ИЗВОДИ

Получените резултати показват, че въпреки че тъканните култури поддържат обща генетична стабилност на цитогенетично ниво, е необходимо допълнително изследване, особено при летораст от адвентивна издънкова регенерация. Сомаклоналната изменчивост е сложен феномен, който обикновено изисква различни подходи за адекватна оценка. Кариологичният анализ не може да разкрие редуване в специфични гени или малки хромозомни пренареждания. Следователно, в бъдещи изследвания, трябва да бъдат включени молекулярно-базирани маркери. Що се отнася до пероксидазния полиморфизъм, установен при адвентивни издънки, допълнителни изследвания трябва да се съсредоточат върху сравнението на POX

CONCLUSIONS

The obtained results indicate that although tissue culture plants maintained gross genetic stability at cytogenetic level, further investigation is required, especially in adventitious regeneration-derived shoots. Somaclonal variation is a complex phenomenon that usually demands different approaches for adequate evaluation.

Karyological analysis cannot reveal alternation in specific genes or small chromosomal rearrangements. Therefore, molecular-based markers should also be included in any further study.

As regards peroxidase polymorphism detected in adventitious shoots, additional research should focus on comparing of POX profiles among *ex vitro* adapted

профилите при *ex vitro* адаптирани растения с адвентивен, аксиларен произход и *in vivo* контролни растения.

plants of adventitious, axillary origin and *in vivo* control plants.

БЛАГОДАРНОСТИ

Изследването е подкрепено от Министерство на образованието, науката и технологичното развитие на Република Сърбия (проект № TR-31064).

ACKNOWLEDGEMENTS

The research was supported by Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia (project no. TR-31064).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Al-Zahim, M. A., B. V. Ford-Lloyd and H. J. Newbury**, 1999. Detection of somaclonal variation in garlic (*Allium sativum* L.) using RAPD and cytological analysis. *Plant Cell Reports*, 18, 473–477.
2. **Antunes de, M. L. K., F. Claudia, C. Leandro and S. A. Lima da**, 2004. *In vitro* establishment and multiplication of *Pyrus calleryana* D-6 on double-phase culture system. *Brazilian Magazine of Fruit Culture*, 26, 403–405.
3. **Arumuganathan, K. and E. D. Earle**, 1991. Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. *Plant Molecular Biology Reporter*, 9, 229–233.
4. **Bairu, M. W., O. A. Adeyemi and J. Van Staden**, 2011. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regulation*, 63, 147–173.
5. **Bell, R. L. and B. M Reed**, 2002. *In vitro* tissue culture of pear: Advances in techniques for micropropagation and germplasm preservation. *Acta Horticulturae*, 596, 412–418.
6. **Bommineni, V.R., H. Mathews, S. B.Samuel, M. Kramer and D. R. Wagner**, 2001. A new method for rapid *in vitro* propagation of apple and pear. *HortScience*, 36(6), 1102–1106.
7. **Bošković, R.**, 1998. Study of inheritance and linkage of isoenzymes in cherry and of incompatibility of rosaceous tree crops by analysis of stylar ribonucleases. PhD Thesis, University of London.
8. **Chittora, M. and A. Sukhwal**, 2016. Role of cytological markers for evaluation of genetic integrity of *in vitro* regenerated plants. *Asian Journal of Bio Science*, 11(2), 313–316.
9. **Devi, S. P., S. Kumaria, S. R. Rao and P. Tandon**, 2015. Genetic fidelity assessment in micropropagated plants using cytogenetical analysis and heterochromatin distribution: a case study with *Nepenthes khasiana* Hook f. *Protoplasma*, 252, 1305–1312.
10. **Dimitrova, N., L. Nacheva and M. Berova**, 2016. Effect of meta-topolin on the shoot multiplication of pear rootstock OHF-333 (*Pyrus communis L.*). *Acta Scientiarum Polonorum - Hortorum Cultus*, 15(2), 43–53.
11. **Elmaghrabi, A. and S. Ochatt**, 2006. Isoenzymes and flow cytometry for the assessment of true-to-typeness of calluses and cell suspensions of barrel medic prior to regeneration. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 85, 31–43.
12. **Grattapaglia, D. and H. D. Bradshaw**, 1994. Nuclear DNA content of commercially important *Eucalyptus* species and hybrids. *Canadian Journal of Forest Research*, 24, 1074–1078.
13. **Hassanen, S. A. and M. F. Gabr**, 2012. *In vitro* propagation of pear (*Pyrus betulaefolia*) rootstock. *American-Eurasian Journal of Agriculture and Environmental Sciences*, 12(4), 484-489.

14. **Jakob, H.B.**, 2002. New pear rootstock from Geisenheim, Germany. *Acta Horticulturae*, 596, 337–344.
15. **Jin, S., R. Mushke, H. Zhu, L. Tu, Z. Lin, Y. Zhang and X. Zhang**, 2008. Detection of somaclonal variation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using cytogenetics, flow cytometry and molecular markers. *Plant Cell Reports*, 27, 1303–1316.
16. **Larkin, P. J. and W. R. Scowcroft**, 1981. Somaclonal variation: a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics*, 60, 197–214.
17. **Loureiro, J., E. Rodriguez, J. Doležel and C. Santos**, 2007. Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: a test with 37 species. *Annals of Botany*, 100, 875–888.
18. **Loureiro, J., G. Pinto, T. Lopes, J. Doležel and C. Santos**, 2005. Assesment of ploidy stability in the somatic embryogenesis process in Quercus suber L. using flow cytometry. *Planta*, 22, 815–822.
19. **Martin, K. P., S. K. Pachathundikandi, C. L. Zhang, A. Slater and J. Madassery**, 2006. RAPD analysis of a variant of banana (*Musa* sp.) cv. Grande Naine and its propagation via shoot tip culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 42(82), 188–192.
20. **Martinelli, F., M. Busconi, C. Fogher and L. Sebastiani**, 2009. Development of an efficient regeneration protocol for pear rootstock Pyrodwarf and assessment of SSR variability in regeneraing shoots. *Caryologia*, 62(1), 62–68.
21. **Mehri-Kamoun, R., H. Mehri, A. Faïdi and V. Polts**, 2004. Micropropagation of six OHxF (Old Home × Farmingdale) pear rootstocks. *Advances in Horticultural Science,* 18(2), 53–59.
22. **Murashige, T. and F. Skoog**, 1962. A resived medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473–497.
23. **Nacheva, L. R., P. S. Gercheva and V. T. Dzhuvinov**, 2009. Efficient shoot regeneration system of pear rootstock OHF 333 (*Pyrus communis* L.) leaves. *Acta Horticulturae*, 839, 195–201.
24. **Nehra, N. S., K. K. Kartha, C. Stushnoff and K. L. Giles**, 1992. The influence of plant growth regulator concentrations and callus age on somaclonal variation in callus culture regenerants of strawberry. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 29, 257–268.
25. **Radić, S., M. Prolić, M. Pavlica and B. Pevalek-Kozlina**, 2005. Cytogenetic stability of *Centaurea ragusina* long-term culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 82, 343–348.
26. **Rahman, A, E., M. F. Al-Ansary, A. A. Rizkalla and A. M. Badr-Elden**, 2007. Micropropagation and biochemical genetic markers detection for drought and salt tolerance of pear rootstock. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 1, 625–36.
27. **Rehman, H. U., M. I. S. Gill, G. S. Sidhu and H. S. Dhaliwal**, 2014. Micropropagation of Kainth (*Pyrus Pashia*) - an Important rootstock of pear in northern subtropical region of India. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 2(2), 188–196.
28. **Ružić, Đ., R. Cerović and R. Bošković**, 1991. The assessment of somaclonal variation in sour cherry cv Šumadinka regenerated from leaf explants. *Fruit Science Report*, 18, 155–162.
29. **Ružić, Đ., T. Vujović, D. Nikolić and R. Cerović**, 2011. *In vitro* growth responses of the 'Pyrodwarf' pear rootstock to cytokinin types. *Romanian Biotechnological Letters*, 16(5), 6630–6637.

30. **Thakur, A. and J. S. Kanwar**, 2008. Micropropagation of „wild pear" *Pyrus pyrifolia* (Burm F.) Nakai. II. Induction of rooting. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca,* 36, 104–111.
31. **Thorpe, T.A.**, 1994. Morphogenesis and regeneration. In: Plant Cell and Tissue Culture (I. K.Vasil, T. A. Thorpe, eds.). Kluwer, Dordrecht, pp. 17–36.
32. **Tremblay, L., C. Levasseur and F. M. Tremblay**, 1999. Frequency of somaclonal variation in plants of black spruce (*Picea mariana*, Pinaceae) and white spruce (*P. glauca*, Pinaceae) derived from somatic embryogenesis and identification of some factors involved in genetic instability. *American Journal of Botany*, 86, 1373–1381.
33. **Vujović, T., Đ. Ružić, R. Cerović and G. Šurlan Momirović**, 2010. Adventitious regeneration in blackberry (*Rubus fruticosus* L.) and assessment of genetic stability in regenerants. *Plant Growth Regulation*, 61(3), 265–275.
34. **Vujović, T., R. Cerović, Đ. Ružić**, 2012. Ploidy level stability of adventitious shoots of sour cherry 'Čačanski Rubin' and Gisela 5 cherry rootstock. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 111, 323–333.
35. **Vujović, T., Đ. Ružić and R. Cerović**, 2014. Adventitious organogenesis via intermediate callus formation in representatives of *Prunus*, *Pyrus* and *Rubus* genera. *Romanian Biotechnological Letters*, 19(3), 9297–9309.
36. **Wang, Q.**, 2015. The effect of light, darkness and temperature on micropropagation of the pear rootstock BP10030. *Journal of Horticultural Science*, 67(6), 869–876.
37. **Yeo, D.Y. and B. Reed**, 1995. Micropropagation of three *Pyrus* rootstock. *HortScience*, 30(3), 620–623.
38. **Zhu, L. H. and M. Welander**, 2000. Adventitious shoot regeneration of two dwarfing pear rootstocks and the development of a transformation protocol. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 75(6), 745–752.

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2018, 21 (4), 183-191
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan
ISSN 1311-0489 (Print)
ISSN 2367-8364 (Online)

Влияние на защитна система върху репродуктивния потенциал на къпини от сорт „Чачанска бестрна“

Жаклина Караклаич-Стаич*, Йелена Томич, Марияна Пешакович, Светлана М. Паунович, Мира Милинкович

Effects of rain-shield cultivation system on generative potential of blackberries Čačanska Bestrna

Žaklina Karaklajić-Stajić*, Jelena Tomić, Marijana Pešaković, Svetlana M. Paunović, Mira Milinković

Fruit Research Institute, Čačak, Republic of Serbia
**E-mail: zaklinaks@yahoo.com*

Received: 27.04.2018 *Accepted:* 20.11.2018 *Published:* 12.12.2018

РЕЗЮМЕ

Икономическото значение на европейската къпина (*Rubus* subg. *Rubus* Watson) я превръща във важна ягодоплодна култура в Сърбия, непосредствено след малините и ягодите. През последните години (2012-2016 г.), според данни от Държавния статистически отдел, производството на къпини в Република Сърбия е значително променливо. Изследването е проведено в къпинови насаждения от сорт „Чачанска бестрна“, чрез интензивна технология на отглеждане, т.е. защитно покритие. Статията представя резултати от тригодишно проучване (2012-2014) от въздействието на защитна система върху размножителния потенциал на къпините. Повечето изследвани параметри са повлияни от технологията на отглеждане и условията на околната среда в периода на изследване, както и от взаимодействието им. Продуктивните показатели, брой на плододаващи клонки (14.05 ± 0.38), съцветия (123.59), плодове (323.72) и добив от летораст (3,395.81 g) са по-високи при къпини отглеждани под покритие, в

SUMMARY

The economic significance of the European blackberry (*Rubus* subg. *Rubus* Watson) makes it an important berry fruit in Serbia, where it is positioned immediately after raspberry and strawberry. In recent years (2012–2016), according to the data from the Republic Statictic Department, blackberry production in the Republic of Serbia significantly oscillated. The investigation was conducted in ‘Čačanska Bestrna’ blackberry plantings using the intensive cultivation technology, i.e. rain-shield. The paper presents results of a three-year study (2012–2014) into the impact made by rain-shield cultivation system on blackberry generative potential. It was observed that most of the tested parameters were affected by cultivation technology and environmental conditions during the investigation, as well as by their interaction. In terms of the generative potential parameters, number of fruiting branches (14.05±0.38), inflorescence (123.59), fruits (323.72), and yield per cane (3,395.81 g) were higher in blackberries under rain shields than

сравнение със стандартната система за отглеждане (открито поле).

Ключови думи: къпина, защитни системи, добив, Сърбия

УВОД

В групата на ягодоплодните култури, къпините са с икономическо важно значение за Република Сърбия, веднага след малините и ягодите (Nikolic and Milivojevic, 2010), въпреки че производството им се характеризира с непрекъснато намаляване, което се обуславя от ниската цена на плодовете. Според данните от Държавния статистически отдел през 2012 г, поради изключително студения период и крайните засушавания, добивът е значително понижен (15000 t), следван от слабо увеличение на производството през 2016 г. (17991 t) (Државен статистически отдел, 2013). За да се постигне и поддържа продукцията на оптимално ниво за Република Сърбия (25-30.000 t), както и да се регулират промените в добива, качеството на плодовете, цената и търсенето на пазара, е необходимо да се прилага съвременна технология за отглеждане и преработка, както и частична промяна на асортимента (Karaklajić-Stajić, 2016). Сортовата структура е една от причините за забавянето на пускането на къпините на пазара, но и фактът, че Република Сърбия губи годишно повече от 20% от общия добив от къпини, поради неблагоприятното влияние на абиотични фактори (измръзване, дъжд, суша, градушка). Tanović et al. (2009) посочват, че фитопатогените *Botrytis cinerea* Pers. причиняват понижаване на добива от къпини с около 30%.

Съвременното производство на къпини се характеризира с висока рентабилност, дълъг експлоатационен период, висок добив и добро качество на плодовете (Mišić and Nikolić, 2003). Но (1992) заявява, че добивът се определя от взаимодействието на условията на отглеждане, физиологичните и морфологичните особености.

standard cultivation system (open-field cultivation).

Key words: blackberry, rain shields, yield, Serbia

INTRODUCTION

In the group of berries, blackberry is, by economic importance for the Republic of Serbia, positioned next to raspberry and strawberry (Nikolic and Milivojevic, 2010), though its production is characterized by a continuous reduction, which is conditioned by the low price of the fruits. According to the data from the Republic Statistic Department, in 2012, due to the extremely cold period and extreme droughts, the yield was significantly reduced (15,000 t), followed by a slight increase in the production in 2016 (17,991 t) (Republic Statistic Department, 2013). In order to achieve and maintain production at the optimal level for the Republic of Serbia (25–30,000 t), as well as to eliminate the variation of yield, fruit quality, price and demand on the market, it is necessary to apply newer cultivation technologies and technological processing methods as well as to partially change the assortment (Karaklajić-Stajić, 2016). Cultivar structure is one of the reasons for the delay in blackberries placement on the market, but also the fact that the Republic of Serbia loses more than 20% of total blackberry yield annually due to the harmful effects of abiotic factors (frost, rain, drought, hail). Tanović et al. (2009) point out that phytopathogenic fungi *Botrytis cinerea* Pers. causes a decrease in blackberry yield of about 30%.

Modern blackberry production is characterized by high profitability, long exploitation period, high yields and good quality of fruits (Mišić and Nikolić, 2003). Ho (1992) states that the fruit yield is determined by the interaction of cultivation conditions, physiological and morphological traits.

Репродуктивните показатели при къпините са: брой плододаващи клонки, съцветия и добив от летораст т.е. показатели за производителност. Според Strik (2012) диференцирането на плодни пъпки при ягоди, малини, къпини и боровинки е по-силно обусловено от светлинния режим, температурните условия и използваната система на отглеждане. Поради това, интензификацията в технологията за отглеждане на къпини трябва да бъде насочена към подобряване качеството на плодовете и осигуряване прибирането на реколтата и доставяне на плодове. Според вида на конструкцията, отглеждането на къпини в затворени и полузатворени пространства може да се извърши по различни начини. Защитната система е по-улеснена и много печеливша в полузатворени пространства.

Целта на изследването е да се установи, непряко, въздействието на защитната система върху репродуктивния потенциал на къпина сорт „Чачанска бестрна“.

Number of fruiting branches, inflorescence and yield per cane are the parameters of the generative potential of blackberries, i.e. indicators of productivity. According to Strik (2012), the differentiation of generative buds in strawberry, raspberry, blackberry and blueberry is largerly conditioned by light regime, temperature conditions and cultivation system applied. In this regard, intensification of blackberry cultivation technology should be directed towards improving fruit quality and ensuring harvest and delivery of fruits. Depending on the construction type, the cultivation of blackberries in closed and semi-closed area can be realized in different ways. Rain-shields represent simpler and extremely profitable cultivation systems in semi-closed area.

The objective of the investigation is to indirectly examine the impact of the rain-shield cultivation on the generative potential of blackberry ‘Čačanska Bestrna’.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Схема на опита

Изследването е проведено за три години (2012-2014.) в експериментално къпиново насаждение от сорт „Чачанска бестрна“, създадено през 2006 г., разположено в с. Горна Говерница (43 ° 53’N, 20 ° 20 ’ E дължина, 290 m надморска височина) в близост до град Чачак, Западна Сърбия. Това е предимно планинска местност със средна надморска височина около 290 m, характеризираща се с умерен континентален климат. Къпините са засадани при междуредово разстояние от 3,0 m и вътрередово от 1,5 m, на триредова телена конструкция. В къпиновите насаждения са поставени пластмасови арки върху изградената конструкция, покрити от фолио с дебелина 150 μ, което оформя чадър (защитна система). Опитът е проведен чрез рандомизиран блоков метод с четири

MATERIAL AND METHODS

Experimental design

The investigation was conducted over a three-year period (2012–2014) in the experimental trial of blackberry cultivar ‘Čačanska Bestrna’, which was established in 2006 and is located at Gornja Gorevnica (43° 53’N latitude, 20° 20’ E longitude, 290 m altitude) near Čačak city, Western Serbia. This is mainly an upland area, with an average altitude of about 290 m, characterised by the temperate continental climate. The blackberries were planted in rows spaced 3.0 m apart with plants set at 1.5 m apart in the row, and trained as a three-wire trellis. Plastic arches were placed on the existing trellis structure in the blackberry plantings. The arches were covered using 150 μ thick foil, forming the shape of an umbrella (Rain-shield cultivation). The trial was conducted using a randomised block design and it included four replications of

повторения, при всеки вариант. За периода на изследването са прилагани стандартните за района торене и напояване.

Посадъчен материал

Къпиновият сорт „Чачанска бестрна“ е създаден през 1984 от кръстосване на "Диксен Торнлес" х "Блек сатин" в Изследователски институт по овощарство, Чачак. Сортът е силно растящ, с 4-5 здрави, извити по средата стъбла, с къси междувъзлия, със средно късен период на цъфтеж. Самоопрашва се и дава изобилна реколта. Устойчив е на ниски зимни температури. Средно устойчив на жълта ръжда (*Kuehneola uredinis* (Link)) и податлив на септориоза (*Septocyta ruborum* (Lib.) Petrark). Има средно ранен период на узряване в началото на третото десетдневие на юли. Плодовете са едри. Средното тегло на плода е около 9.3 g (теглото на отделни плодове възлиза на 15 g). Притежава продълговато-цилиндрична форма, лъскав черен цвят, сладък, леко кисел вкус и подчертан аромат. Един плод съдържа средно 89 съставни плодчета. „Чачанска бестрна“ е подходящ за прясна консумация, за замразяване, както и за различни форми на преработка. Сортът се представя отлично при различни агроекологични условия по отношение на реколта, устойчивост към болести и ниски зимни температури.

Определяне на репродуктивния потенциал

Репродуктивният потенциал на изследвания къпинов сорт се определя по броя на плододаващите клонки, съцветия, плодове и добив (*g*) от издънка. Репродуктивните показатели се изчисляват чрез преброяване и измерване на плододаващите издънки. Добивът от издънка се определя чрез измерване на теглото на плодовете от всяка реколта, чрез електронна скала ACS System Electronic Ascale (Zhejiang, Китай).

each treatment. Fertilization and irrigation practices standard for the region were provided during the period of investigation.

Plant material

Blackberry cultivar ‘Čačanska Bestrna’ made in 1984 from the cross ‘Dirksen Thornless’ × ‘Black Satin’ in Fruit Research Institute, Čačak. It is highly vigorous cultivar, produces 4-5 strong, in mid-section bent canes, with short internodes. The flowering season is mid-late. It is self-fertile, abundant cropper. Resistant to low winter temperatures. It is medium resistant to yellow rust (*Kuehneola uredinis* (Link)) and susceptibile to purple blotch of blackberry (*Septocyta ruborum* (Lib.) Petrark). Ripening season is mid-early, in the beginning of the third decade of July.The fruit is large. Average fruit weight is around 9.3 g (fruit weight of individual fruits amount to 15 g). It is elongated-cylindrical, glossy black, with sweet-subacid taste and pronounced aroma. It contains 89 drupelets on average. ‘Čačanska Bestrna’ is suitable for both fresh use and freezing and for various forms of processing as well. In different agroecological conditions this cultivar has displayed excellent performance in respect of cropping and resistance to diseases and low winter temperatures.

Determination of generative potential

Determination of the generative potential of the examined blackberry cultivar was performed by establishing the number of number of fruiting branches, inflorescence, fruits, and yield (*g*) per cane. Examinations of the generative potential parameters are performed by counting and measuring at fruiting canes. Yield per cane is determined by measuring of the picked fruit weight from each harvest using electronic scale ACS System Electronic Ascale (Zhejiang, China).

Статистически анализ

Резултатите са представени като средна ± стандартна грешка на средната (SE). Разликите между средните стойности са сравнени чрез LSD тест с двуфакторен дисперсионен анализ (ANOVA), използвайки статистически компютърен пакет MSTAT-C (Michigan State University, East Lansing, MI, САЩ). Разликите с *p* стойности ≤ 0.05 се считат за незначителни.

Statistical analysis

The results are presented as mean ± standard error of mean (SE). Differences between mean values were compared by LSD test in two-way analysis of variance (ANOVA) using MSTAT-C statistical computer package (Michigan State University, East Lansing, MI, USA). Differences with *p* values of ≤ *0.05* were considered insignificant.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

От репродуктивните показатели, броят на плододаващите летораси, съцветия, плодове (Таблица 1) и добив от издънка (Таблица 2) са показани в зависимост от техниките на отглеждане за тригодишен период.

RESULTS AND DISCUSSION

Within the generative parameters of the studied blackberry, the results of examining number of fruiting braches, inflorescence, fruits (Table 1), and yield per cane (Table 2) are shown in the function of the cultivation techniques over the three-year period.

Таблица 1. Влияние на технологията на отглеждане върху показателите на репродуктивния потенциал на къпинов сорт „Чачанска бестрна“
Table 1. Effect of cultivation techniques on parameters of generative potential of blackberry ‘Čačanska Bestrna’

Вариант/Treatment		Бр. плододаващи клонки на летораст Number of fruiting branches per cane	Бр. съцветия на летораст/Number of inflorescence per cane	Бр. плодове от летораст Number of fruits per cane
Технология на отглеждане / Cultivation techniques (A)				
Под покритие Rain shield		14.60 ± 0.51 a	123.59 ± 2.90 a	323.72 ± 10.34 a
Стандартна Standard		14.05 ± 0.38 a	112.61 ± 4.50 b	285.90 ± 13.34 b
Year (B)				
2012		16.28 ± 0.26 a	99.65 ± 2.49 c	362.99 ± 13,67 a
2013		13.89 ± 0.38 b	131.31 ± 3.29 a	281.74 ± 8.88 b
2014		12.81 ± 0.57 c	123.35 ± 4.32 b	269.70 ± 10.86 b
Технология на отглеждане x Година / Cultivation techniques × Year (A × B)				
Под покритие Rain shield	2011.	16.24 ± 0.46 a	98.25 ± 3.91 c	364.32 ± 21.33 a
	2012.	12.91 ± 0.49 c	143.16 ± 4.92 b	304.33 ± 13.27 b
	2013.	14.67 ± 0.46 b	129.37 ± 2.94 a	302.50 ± 8.39 b
Стандартна Standard	2011.	16.33 ± 0.26 a	101.04 ± 3.26 c	361.66 ± 18.58 a
	2012.	14.87 ± 0.33 b	119.46 ± 3.42 b	259.15 ± 4.02 c
	2013.	10.95 ± 0.44 d	117.32 ± 5.57 b	246.90 ± 11.32 d
ANOVA				
A		nz	G	G
B		G	G	G
A × B		G	G	G

Стойностите във всяка колона следвани от същата малка буква имат незначителна разлика при *p≤0.05* според LSD тест; ns – значителни разлики
Values within each column followed by the same small letter are insignificantly different at the *p≤0.05* by LSD test; ns - non significant differences

Дисперсионният анализ посочва, че системата на отглеждане и годи-

Analysis of variance determined that the cultivation system and year of

ната на изследване, както и взаимодействието им, повлияват значително броя на съцветията и плодовете от летораст. Докато броят на плододаващи клонки от една издънка е повлиян от годината и взаимодействието между системата на отглеждане и годината. Средните стойности за броя на плододаващите клонки, съцветия и плодове от издънка варират в интервала от 12.81 до 16.33, от 98.25 до 143.16 и съответно от 246.90 до 364.32.

Прилагането на защитна система по време на тригодишния експериментален период значително повлиява най-важните показатели на репродуктивния потенциал на къпината. Значително увеличение в сравнение със стандартната система на отглеждане се установява в броя на съцветията и плодовете от издънка, докато в броя на плододаващите клонки са установени по-високи незначителни стойности. Освен това, значително по-голям брой съцветия и плодове от издънка са отчетени в защитната система, което вероятно е следствие от значително по-голямата дължина на издънките. Glišić (2004) посочва, че броят на плододаващите клонки от издънка е до голяма степен обусловен от дължината на издънката, броят и дължината на страничните клонки след подрязване на къпината. Значителни разлики в броя на плододаващите клонки и съцветия на издънка също са установени в годините на проучването, докато значителни разлики в броя на плодове от издънка са регистрирани само във връзка с първата година. Най-вероятно, различията в броя на плододаващите клонки и съцветия от издънка възникват в резултат на различните климатични условия в периода на образуване на цветните пъпки, тъй като къпината е вид с късен период на оформяне на цветни пъпки. Цветните пъпки се образуват в

study, as well as their interaction effect, statistically significantly influenced the number of inflorescences and fruits per cane, while the number of fruiting branches per cane in blackberry was significantly influenced by year and interaction of the cultivation system/year was determined. Average values of the number of fruiting branches, inflorescence and fruits per cane ranged in the interval from 12.81 to 16.33, from 98.25 to 143.16 and from 246.90 to 364.32, respectively.

The application of the rain-shield cultivation system during the three-year experiment period significantly influenced the most important parameters of the blackberry generative potential. A significant increase compared to the standard cultivation system was found in the number of inflorescence and fruits per cane, whereas for the fruiting branches number, higher values were also noted, but with no significance. Moreover, significantly higher number of inflorescence and fruits per cane has been recorded in the rain-shield system, which is probably the consequence of the significantly higher length of the canes determined in the mentioned cultivation system. Glišić (2004) states that number of fruiting branches per cane is largely conditioned by the cane length, number and the length of lateral branches after pruning of blackberry. Significant differences in the number of fruiting branches and inflorescence per cane were also found between the years of study, while in terms of number of fruits per cane, the significance of differences was recorded only in relation to the first year. These differences in the number of fruiting branches and inflorescence per cane between the years of study occurred most likely as an outcome of different climatic conditions in the period of flower bud differentiation, since blackberry belongs to the late flower bud differentiation cultivar group. (Namely, flower buds differ in one-year cane leaves' armpit, from the second half of

листната пазва на едногодишния летораст, във втората половина на септември до началото на октомври, в годината преди цъфтежа (Glišić, 2004; Veličković, 2004). Броят на плододаващите клонки показва, че стойността на репродуктивния потенциал е резултат от взаимодействие между системата на отглеждане и условията през годините на изследването. Според Strik (2012), образуването на цветни пъпки при къпини, малини, ягоди и боровинки е обусловено в значителна степен от сложната активност на абиотичните фактори, сред които са температурните условия, светлинния режим, почвената влага, както и системата на отглеждане. Veličković (2004) също посочва, че превъзходството на въглехидратите (фотосинтезни продукти) по отношение на натрупания азот (продукт на активността на кореновата система) в тъканите, води до умерен растеж и изобилно оформяне на цветни пъпки.

September until beginning of October, in a year prior to flowering (Glišić, 2004; Veličković, 2004). If we observe the result tendency related to the number of fruiting branches for each cultivation system in each year of the study, we will notice number of fruiting branches, which indicates that the value of the mentioned generative potential parameter was the result of the interaction effect between cultivation system and cultivation conditions in certain years. According to Strik (2012), the differentiation of flower buds in blackberries, raspberries, strawberries and blueberries is conditioned to a considerable extent by the complex activity of abiotic factors, among which temperature conditions, light regime, soil moisture, and also the applied cultivation technology should be highlighted. Also, Veličković (2004) states that the dominance of carbohydrates (photosynthesis products) in relation to accumulated nitrogen (the product of the root system activity) in tissues, leads to a moderate growth and an abundant flower bud differentiation.

Таблица 2. Влияние на технологията на отглеждане върху показателите на репродуктивния потенциал на къпинов сорт „Чачанска бестрна
Table 2. Effect of cultivation techniques on parameters of generative potential of blackberry 'Čačanska Bestrna'

Вариант/Третиране		Yield per cane (g)/Добив от летораст
Технология на отглеждане/Cultivation techniques (A)		
Под покритие/Rain shield		3,395.81 ± 45.84 a
Стандартна/Standard		2,843.45 ± 46.35 b
Година/Year (B)		
2012		3,199.06 ± 58.29 a
2013		3,109.20 ± 66.64 a
2014		3,072.85 ± 79.35 a
Технология на отглеждане x Година/Cultivation techniques × Year (A × B)		
Под покритие/Rain shield	2012	3,543.37 ± 70.48 a
	2013	3,351.11 ± 61.20 a
	2014	3,292.93 ± 56.33 a
Стандартна/Standard	2012	2,805.56 ± 80.45 a
	2013	2,867.29 ± 51.33 a
	2014	2,852.78 ± 50.84 a
ANOVA		
A		*
B		ns
A × B		ns

Стойностите във всяка колона следвани от същата малка буква имат незначителна разлика при *p≤0.05* според LSD тест; ns – значителни разлики
Values within each column followed by the same small letter are insignificantly different at the *p≤0.05* by LSD test; ns - non significant differences

Добивът проявява значителни различия между различните системи за отглеждане на къпини, според изследванията на Bal and Meesters (1995), Eyduran et al. (2008) и Hanson et al. (2011). Дисперсионният анализ показва, че добивът от издънка при изследвания къпинов сорт е статистически значимо повлиян от системата на отглеждане. Средните стойности на добива от издънка варират от 2,805.56 до 3,395.81 g. Значително по-високи стойности на добива от издънка са открити при отглеждане на къпината в полузатворени условия. Изследванията, проведени върху ремонтантните сортове малини (Privé and Allain, 2000; Burkhart and White, 2003) също потвърждават покачването в добива при отглеждане в затворени пространства. Gaskell (2004) посочва, че отглеждането на малини в затворени пространства е широко разпространено в САЩ. То е предназначено главно за производството на плодове за прясна консумация, тъй като смекчаването и премахването на вредните влияния от абиотичните фактори, най-вече валежите, подобрява качеството на плодовете, а от друга страна, удължава периода за прибиране на реколтата. Взети заедно, увеличават рентабилността на производството.

As an important agronomic feature, yield exhibited significant variation among different blackberry cultivation systems, as highlighted in the works of Bal and Meesters (1995), Eyduran et al. (2008) and Hanson et al. (2011). Analysis of variance determined that yield per cane of the examined blackberry cultivar was statistically significantly influenced by cultivation system. Average yield values per cane ranged from 2,805.56 to 3,395.81 g. Significantly higher values of yield per cane were found in semi-closed conditions of blackberry cultivation system. Research carried out on the remontant raspberry cultivars (Privé and Allain, 2000; Burkhart and White, 2003) also confirmed the increase of yields by cultivation in closed area. Gaskell (2004) states that the cultivation of raspberries in closed area is widespread in the US and is primarily intended for the production of fruits for fresh consumption, since modification and elimination of harmful effects of abiotic factors, primarily precipitation, enables better fruit quality and, on the other hand, extends the harvest period, which all together increases production profitability.

ИЗВОДИ

През тритгодишния период на изследването, защитната система оказа положително въздействие върху репродуктивния потенциал на къпината. Във връзка с това, по предварителните резултати от проучванията върху посъвременната система за отглеждане под покритие, може да се препоръча на производителите, като се дадат насоки за технологията на отглеждане на къпини, която има възможност да повиши рентабилността.

CONCLUSIONS

During the three years of study, the rain-shield cultivation system made a positive impact on the generative potential of blackberry. Regarding this, the preliminary results of studies into the more recent cultivation system, i.e. implementation of the rain-shield system in blackberry production, growers can be advised and given guidelines in the blackberry growing technology with a potential to advance the profitability.

БЛАГОДАРНОСТИ

Настоящото изследване е част от проект № 31 093, финансиран от Министерството на образованието, науката и технологичното развитие на

ACKNOWLEDGEMENTS

This study is the part of the project No. 31 093 financed by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia.

Република Сърбия. С настоящето, ние изразяваме своята искрена благодарност за оказаната подкрепа.

We hereby express our sincere gratitude for the support

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Bal, E. and P. Meesters**, 1995. Year-round production of blackberries. Proceedings of the North American Bramble Growers Association, 49−61.
2. **Burkhart, E.P. and L.D. White**, 2003. The High Tunnel Cropping. In: 'High tunnel production manual for commercial growers'. Nennich T.T., Wold-Burkness S. (eds.), University of Minnesota Extension, Saint Paul, pp. 45–56.
3. **Eyduran, S.P., E. Eyduran, K.M.Khawar and Y.S. Agaoglu**, 2008. Adaptation of eight American blackberry (*Rubus fruticosus* L.) cultivars from central Anatolia. African Journal of Biotechnology, 7 (15), 2600–2604.
4. **Gaskell, M.**, 2004. Field tunnels permit extended season harvest of small fruits in California. Acta Horticulturae, 659, 425–430.
5. **Glišić, I.**, 2004. Influence of organic-mineral fertilizers and Agrozel on vegetative growth and productivity of blackberry. Master thesis, University of Kragujevac, Faculty of Agriculture, Čačak, Republic of Serbia.
6. **Hanson, S., R. Nicholls, N. Ranger, S. Hallegatte, J. Corfee-Morlot, C. Herweijer and J. Chateau**, 2011. A global ranking of port cities with high exposure to climate extremes. Climatic Change, 104 (1), 89–111.
7. **Ho, L.C**. 1992. Fruit growth and sink strength. In: 'Fruit and seed production'. Marshall C., Grace J. (eds.), Press Syndicate of the University of Cambridge, Cambridge, UK, pp. 101–125.
8. **Karaklajić-Stajić, Ž**. 2016. Effect of rain-shield cultivation system on biological and production characteristics and fruit quality of blackberry cv. 'Čačanska Bestrna' (*Rubus* subg. *Rubus* Watson). PhD thesis. University of Belgrade, Faculty of Agriculture, Belgrade, Republic of Serbia.
9. **Mišić, P.D. and M.D. Nikolić**, 2003. Jagodaste voćke. Institut za istraživanja u poljoprivredi SRBIJA.
10. **Nikolić, M. and J.Milivojević**, 2010. Jagodaste voćke–tehnologija gajenja. Naučno voćarsko društvo Srbije, Čačak.
11. **Privé, J.P. and N.Allain**, 2000. Wind reduces growth and yield but not net leaf photosynthesis of primocane-fruiting red raspberries (*Rubus idaeus* L.) in the establishment years. Canadian Journal of Plant Science, 80 (4), 841–847.
12. Republic Statictic Department, 2013. Agriculture in Republic of Serbia, book 1: 118−119.
13. **Strik, B.C.**, 2012. Flowering and fruiting on command in berry crops. Acta Horticulturae, 926, 197–214.
14. **Tanović, B., G. Delibašić, J. Milivojević and J. Nikolić**, 2009. Characterization of *Botrytis cinerea* isolates from small fruits and grapevine in Serbia. Archives of Biological Sciencies, 61, 419−429.
15. **Veličković, M.**, 2004. Opšte voćarstvo I: biologija i ekologija voćaka. Poljoprivredni fakultet, Beograd.