Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2018, 21 (5), 152-163
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan
ISSN 1311-0489 (Print)
ISSN 2367-8364 (Online)

Наличие на несъвместими поленови тръбички в стълбчето на сливов сорт "Позна Плава"

Милена Джорджевич[1]*, Радосав Церович[2], Саня Радичевич[1], Ивана Глишич[1], Небойша Милошевич[1], Сладжана Марич[1], Милан Лукич[1]

[1]Изследователски институт по овощарство, ул. "Краля Петра I" 9, 3200 Чачак, Република Сърбия
[2]Белградски университет, Център по иновации към Факултет по технология и металургия, "Карнегиева" 4, 11120 Белград, Република Сърбия

Occurrence of the incompatible pollen tubes in the style of plum cultivar ‘Pozna Plava’

Milena Đorđević[1]*, Radosav Cerović[2], Sanja Radičević[1], Ivana Glišić[1], Nebojša Milošević[1], Slađana Marić[1], Milan Lukić[1]

[1]Fruit Research Institute, Kralja Petra I/9, 32000 Čačak, Republic of Serbia
[2]University of Belgrade, Innovation Centre at Faculty of Technology and Metallurgy, Karnegijeva 4, 11120 Belgrade, Republic of Serbia
**Email: mdjordjevic@institut-cacak.org*

Received: 30.04.2018 *Accepted:* 17.12.2018 *Published:* 21.12.2018

РЕЗЮМЕ

Самостерилността, чрез разпознаване и отхвърляне на собствен или генетично идентичен полен, при овощните култури, не позволява самоопрашване. Появата на гаметофитна несъвместимост е придружена от неравномерно нарастване на поленовата тръба с обилно натрупване на калус в нея. За период от три години е проучена несъвместимостта на поленовата тръба в стълбчето на сливов сорт "Позна Плава" при три варианта на опрашване, като се използва анилиново синьо оцветяване за наблюдение под флуоресцентен микроскоп. Вариантите на опрашване са свободно, кръстосано с "Чачанска найболя", "Презента", "Ханита" и самоопрашване.

Във всички изследвани варианти

SUMMARY

Self-incompatibility in fruits prevents self-fertilization by recognition and rejection of its own or genetically identical pollen. Occurrence of gametophyte incompatibility is accompanied by irregular pollen tube growth with an abundant accumulation of callose in it.

In a three-year period, pollen tube incompatibility in the style of the plum cultivar ‘Pozna Plava’ in three pollination variants was analysed using fluorescent microscopic aniline blue staining method. Pollination variants were open, cross-(‘Čačanska Najbolja’, ‘Presenta’, ‘Hanita’) and self-pollination.

In all the analysed variants, the

е установено наличие на поленови тръби с типични признаци на несъвместимост. В повечето случаи несъвместимите поленови тръби спират растежа си в горната третина на стълбчето. При кръстосаното опрашване със сортовете "Ханита" и "Чачанска найболя" са наблюдавани несъвместими поленови тръби във втората третина на стълбчето. Най-висок процент на несъвместими поленови тръби 4.84% е отчетен във варианта на самоопрашване.

По-нисък процент на несъвместими поленови тръби е отчетен във варианта на кръстосано опрашване със сорт "Чачанска найболя" (3.06), което може да се обясни с това, че е родител на сорта "Позна Плава". Най-ниският процент (по-малко от 1.3%) на несъвместими поленови тръби е открит при варианта на кръстосано опрашване със сортовете "Презента" и "Ханита".

Ключови думи: сливи, стълбче, флуоресцентен микроскоп, несъвместими поленови тръби

presence of pollen tubes with typical signs of incompatibility was found. In most cases, incompatible pollen tubes stopped their growth in the upper third of the style. In a cross-pollination with the cultivars ‘Hanita’ and ‘Čačanska Najbolja’ incompatible pollen tubes in the second third of the style were seen as well. The highest percentage of incompatible pollen tubes 4,84% was found in a self-pollination variant.

Somewhat lower percentage of incompatible pollen tubes was found in a cross-pollination variant with the cultivar ‘Čačanska Najbolja’ (3,06%), which can be explained by being a parent of the cultivar ‘Pozna Plava’. The lowest percentage (less than 1,3%) of incompatible pollen tubes was found in a cross-pollination variant with the cultivars ‘Presenta’ and ‘Hanita’.

Key words: plum, style, fluorescent microscope, incompatible pollen tubes

УВОД

При видовете от род *Prunus*, стълбчето на цвета принадлежи към т.н. влажен тип, с клетъчни секреторни продукти върху близалцето, което дава възможност за кълняемост на полена и за проникване на поленовата тръба в тъканта на близалцето (Nasrallah et al., 1991). Проводящият канал е в центъра на стълбчето, съставен от удължени клетки, които отделят пектиназната извънклетъчна матрица (Crawford and Yanofski, 2008). След като поленът полепне по близалцето, по-нататъшни процеси, включващи хидратация, кълняемост, растеж през проводящата тъкан на стълбчето, насочване към микропила и в крайна сметка взаимодействие с женските гаметофити, се ръководят и регулират от женския спорофит (Higashiyama and Hamamura, 2008; Palanivelu and Tsukamoto, 2011).

Изследвайки растежа на поленовите тръби при черешите, Radičević

INTRODUCTION

In the genus *Prunus*, the style belongs to the wet type with secretory cell exudates on the stigma which enabling pollen germination and pollen tube penetration into the tissue of the stigma (Nasrallah et al., 1991).

Conductive channel is in the centre of the style composed of elongated cells which excreting the pectinase extracellular matrix (Crawford and Yanofski, 2008). After pollen adhesion on the stigma, further events including hydration, germination, growth through the conductive tissue of the style, guidance to micropyle and in the end, interaction with female gametophyte are guided and regulated by the female sporophyte (Higashiyama and Hamamura, 2008; Palanivelu and Tsukamoto, 2011).

By examining the growth of pollen tubes in cherries, Radičević (2013) points

(2013) посочва по-бърз растеж на поленовите тръби в стълбчето, отколкото в яйчника, което показва зависимостта на броя на поленовите тръби и скоростта на растежа на използваните опрашители на спорофитите на майчиното растение. Намаляването на броя на поленовите тръби в стълбчето е свързано с намаляване на проводимия канал и следователно наличието на хранителни вещества (Herrero, 1992).

Самостерилността е един от най-важните механизми на растенията, за недопускане на самоопрашване и за стимулиране на кръстосано опрашване (Frankling-Tong and Franklin, 2003). При растенията има два вида самостерилност – спорофитна и гаметофитна. Спорофитината се среща при малък брой растения от семейства *Brassicaceae*, *Asteraceae u Convolvulaceae*, докато гаметофитичният тип е по-разпространен (Igic and Kohn, 2001).

За разлика от други видове от род *Prunus*, при които има гаметофитна самостерилност, при домашната слива се наблюдават и двата вида. (Botu et al., 2002). Спорофитната самостерилност се обуславя от локусна мутация, отговорна за образуването на полен и цитоплазмения стерилитет (Kota and Lacis, 2013). Гаметофитната система се основава на алелния полиморфизъм на *S*-RNase на кодиращия ген или *S*-гена и въз основа на неговата проява, сортовете се класифицират в три групи: самофертилни, частично самофертилни и самостерилни (Botu et al., 2002).

Традиционният подход за тестване на самосъвместимостта при овощните дървета е определен чрез проследяване на процента на плодния завръз при полски условия. Друг метод е да се изследва растежа на поленови тръби в стълбчето и да се открият несъвместимите, използвайки флуоресцентен микроскоп (Kho i Baër, 1971). Напоследък се използват два молекулярни метода за тестване на стерил-

to a faster growth of pollen tubes in the style than in the ovary, indicating the dependence of pollen tubes numbers and the growth rate of used pollinators of the sporophytes of the mother plant. Reduction in the numbers of pollen tubes along the style is associated with the reduction of the conductive channel, and therefore the availability of nutrients (Herrero, 1992).

Self-incompatibility is one of the most important mechanisms of plants to prevent self-pollination and enhance cross-pollination (Frankling-Tong and Franklin, 2003). In plants, there are two types of self-incompatibility, sporophytic and gametophytic. The sporophytic type is found in a small number of plants from the families *Brassicaceae*, *Asteraceae and Convolvulaceae*, while the gametophytic type is more prevalent (Igic and Kohn, 2001).

Unlike other species of the genus *Prunus*, in which there is a gametophytic system of incompatibility, both types of self-incompatibility are seen in domestic plum (Botu et al., 2002). Sporophytic incompatibility is conditioned by locus mutation, responsible for pollen formation and cytoplasmic sterility (Kota and Lācis, 2013). The gametophytic system is based on the allelic polymorphism of the *S*-RNase of the coding gene or *S*-gene, and based on its manifestation, cultivars are classified into three groups: self-compatible, partially self-compatible and self-incompatible (Botu et al., 2002).

A traditional approach to test self-compatibility in fruit trees have been determinated by monitoring the fruit set percentage under field conditions. Another method is to examine the growth of pollen tubes in the style and to detect incompatible pollen tubes using a fluorescence microscope (Kho i Baër, 1971). More recently, two molecular methods for testing self-incompatibility have been used: determination of style

ността: определяне вида на рибонуклеазата (S-RNase) и ДНК амплификация и идентификация чрез PCR анализ (Halász et al., 2010).

Изследванията в настоящата статия целят да определят наличието на несъвместими поленови тръби в стълбчето на "Позна Плава" в три варианта на опрашване: свободно, кръстосано и самоопрашване.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

По време на тригодишния период (2008 г., 2010 г. и 2011 г.) са проведени изследвания в насаждение от сливи в база "Любич" на Изследователски институт по овощарство. Овощната градина е създадена през 2002 г. със сортове, присадени върху подложка джанка (*Prunus cerasifera* L.), при схема 6,0×5,0 m. Като тестов материал е използван сорт "Позна Плава", създаден през 1980 г. в Изследователски институт по овощарство, чрез самоопрашване на сорт "Чачанска найболя", признат е за сорт през 2008 г. В сътрудничество с г-н Klaus Ganter (насаждения на Klaus Ganter Markenbaumschule, Wyhl, Германия) този сливов сорт е защитен в Европейския съюз под името "Čačak Späthe".

Експериментът е заложен при полски условия, по време на фазата на пълен цъфтеж, с три начина на опрашване: свободно, кръстосано (с полен от сорт "Чачанска найболя", "Презента" и "Ханита") и самоопрашване. Поставянето на полен върху плодника на близалцето се прави в момента, когато се наблюдава секрецията върху близалцето. При опрашването, опрашените плодници са подложени на тройно последователно фиксиране – 72, 144, 240 часа. За да се фиксират пробите, плодниците веднага се накисват в разтвор на FPA (70% етанол, пропионова киселина и формалдехид, 90:5:5) и се съхраняват при 4°C. За изследване растежа на поленовите тръби в стълбчето е използван флуоресцентно-

ribonuclease (S-RNase) and DNA amplification and identification by PCR analysis (Halász et al., 2010).

The research in this paper was aimed at determining the presence of incompatible pollen tubes in the style of ‘Pozna Plava’ in three variants of pollination: open, cross- and self-pollination.

MATERIAL AND METHODS

Investigations were carried out during the three-year period (2008, 2010 and 2011) within the plum plantation at the Ljubic facility of the Fruit Research Institute Čačak. The orchard was established in 2002, with cultivars grafted on a myrobalan (*Prunus cerasifera* L.) rootstock, with a spacing of 6.0×5.0 m. The plum cultivar ‘Pozna Plava’ was used as a test material, created in 1980 at the Fruit Research Institute from the self-pollination of the cultivar ‘Čačanska Najbolja’, recognized as a cultivar in 2008. In cooperation with Mr. Klaus Ganter (plantations of Klaus Ganter Markenbaumschule, Wyhl, Germany) this plum cultivar has been protected in the European Union under the name ‘Čačak Späthe’.

Under field conditions, during the full flowering sub-phase, experiment was set with three pollination vartiant: open, cross- (pollen of the ‘Čačanska Najbolja’, ‘Presenta’ and ‘Hanita’ cultivars) and self-pollination. The application of pollen on the pistil stigma was made at the time when the secretion on the stigma was observed. Upon the pollination, pollinated pistils were subjected to the triple successive fixation – 72, 144, 240 hours.

To fix the samples, pistils were immediately soaked in FPA solution (70% ethanol, propionic acid and formaldehyde, 90:5:5 percentages by volume) and stored at 4°C. A fluorescence-microscopic method with aniline-blue as a fluorochrome (Preil, 1970; Kho and Baër,

микроскопският метод с анилиново синьо като флуорохром (Preil, 1970; Kho and Baër, 1971) .

Появата на несъвместими поленови тръби в стълбчето е установена чрез флуоресцентен микроскоп (Olympus BX61) с ултравиолетова светлина, като се използва софтуер Multiple Image Analysis in AnalySIS.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Появата на гаметофитна несъвместимост е съпроводена с неправилен растеж на поленовите тръби, с изобилно натрупване на калус. Във всички изследвани варианти е установено наличие на поленови тръби с типични признаци на несъвместимост (Фигура 1).

В повечето случаи, несъвместимите поленови тръби спират растежа си в горната третина на стълбчето (Фигура 1a, 1b). Най-голям брой несъвместими поленови тръби са характеризирани с удължен връх, който е повече или по-малко флуоресцентен. Наблюдавани са поленови тръби, удебелени по цялата си дължина, които също така са по-флуоресциращи от други. Малък брой несъвместими поленови тръби се наблюдават в зоната точно под близалцето (Фигура 1c) или във втората третина на стълбчето.

Само през 2010 г. се наблюдава наличие на несъвместими поленови тръби във втората третина на стълбчето, при варианта на кръстосано опрашване със сорт "Ханита" (60%) и със сорт "Чачанска найболя" (17%) .

Върхчето на несъвместимата поленова тръба е най-често кръгло, но също така са наблюдавани несъвместими поленови тръби с неправилно оформени върхове (Фигура 1d, 1e). Освен типичните признаци на несъвместимост, са наблюдавани поленови тръби с по-силни или по-слаби разклонения, по-малко на брой, (Фигура 1f, 1g).

1971) was used to examine the growth of pollen tubes in the style.

The occurrence of incompatible pollen tubes in the style was done on the fluorescent microscope (Olympus BX61) under ultraviolet light, using Multiple Image Analysis in AnalySIS software.

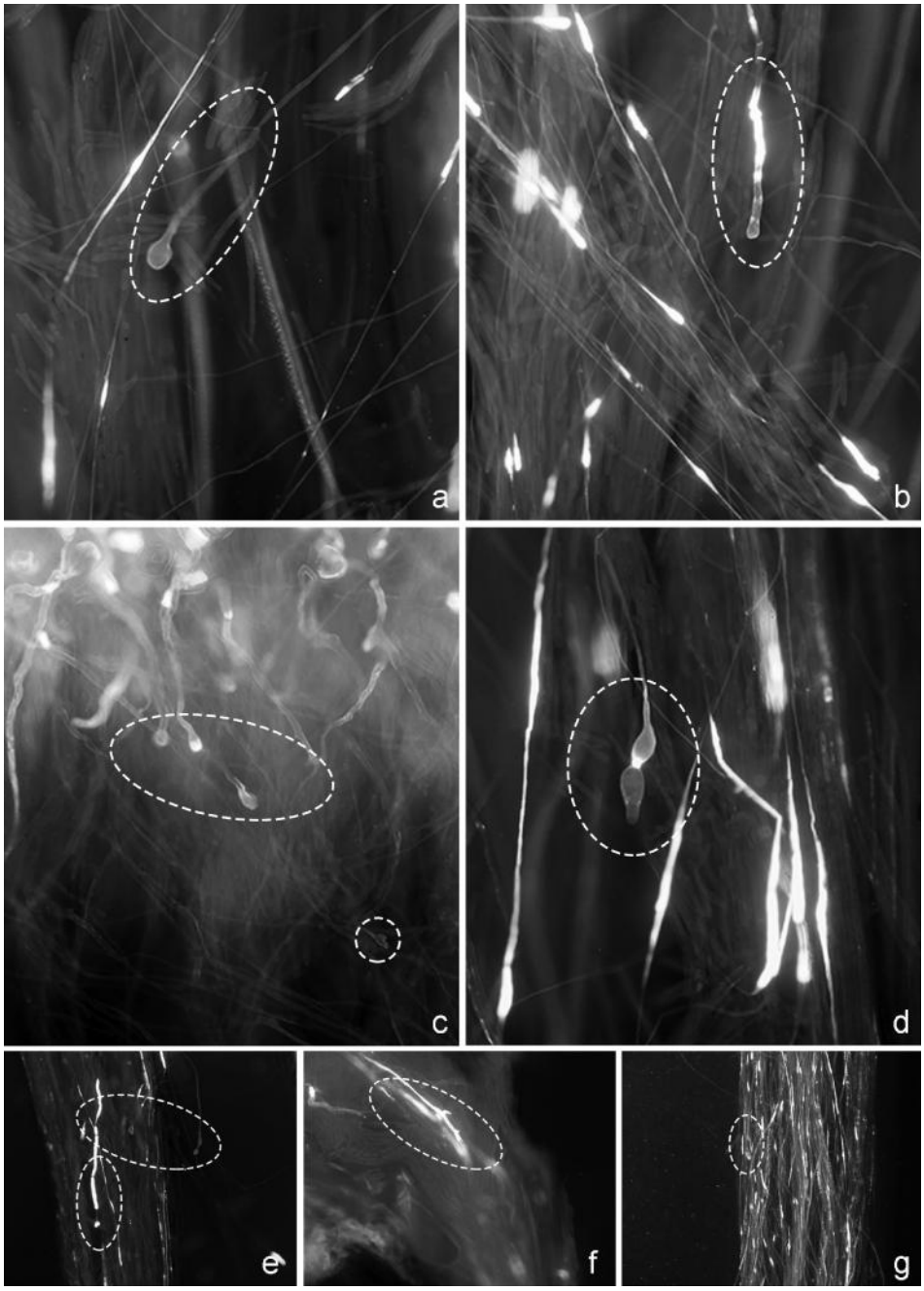
RESULTS AND DISCUSSION

The occurrence of gametophytic incompatibility was accompanied by irregular growth of pollen tubes, with an abundant accumulation of callosis in it. In all pollination variants, the presence of pollen tubes with typical signs of incompatibility was found (Figure 1).

In the majority of cases, incompatible pollen tubes stopped their growth in the upper third of the style (Figure 1a, 1b). The largest number of incompatible pollen tubes was characterized by an extended tip, which was more or less fluorescence. Pollen tubes that were thickened all over their length were also observed and more fluoresced than other pollen tubes. In a small number, incompatible pollen tubes were observed in the region just below the stigma (Figure 1c) or in the second third of the style.

Only in 2010, the presence of incompatible pollen tubes was observed in the second third of the style, in the cross-pollination variant with the cultivar ‘Hanita’ (60% of the total number of incompatible pollen tubes was in the second third of the style) and with the cultivar ‘Čačanska Najbolja’ (17% of the total number of incompatible pollen tubes were in the second third of the style).

Tip of the incompatible pollen tube was most often round, but incompatible pollen tubes with an irregularly shaped tip were also observed (Figure 1d, 1e). Apart from the typical signs of incompatibility, pollen tubes that have had stronger or weaker branches were seen in smaller number as well (Figure 1f, 1g).



Фиг. 1. Несъвместими поленови тръби: а-б) типичен удължен връх на поленова тръба; в) тяхното присъствие в близалцето; г-е) неправилен връх на поленовата тръба; f-g) разклоняване на несъвместима поленова тръба
Fig. 1. Incompatible pollen tubes: a–b) typical extended tip of pollen tube; c) their presence in the stigma; d–e) irregular tip of pollen tube; f–g) branching of incompatible pollen tube

През трите опитни години, най-големият брой несъвместими поленови тръби средно са открити във варианта на самоопрашване (4,84%), докато най-малък брой е открит във вариантите на кръстосано опрашване с "Презента" и "Ханита" (1,10% и 1,25%) (Таблица 1).

През 2010 г. е установен най-голям брой несъвместими поленови тръби във вариантите със самоопрашване и кръстосано опрашване, а при варианта на свободно опрашване през 2008 г.

For all three years, the highest number of incompatible pollen tubes, on average, was found in the self-pollination variant (4.84%), while the smallest number was found in the cross-pollination variants with the cultivars 'Presenta' and 'Hanita' (1.10% and 1.25%) (Table 1).

Observed by the year of study, the largest number of incompatible pollen tubes in the self- and cross- pollination variants was found in 2010, while in the open pollination variant, in 2008.

Таблица 1. Присъствие на несъвместими поленови тръби (%) в стълбчето на сливов сорт "Позна Плава", по варианти и по години
Table 1. Presence of incompatible pollen tubes (%) in the style of the plum cultivar Pozna Plava, in variants of pollination, by years

Вариант на опрашване Pollination variant	Зона на стълбчето Style region	Година Year 2008	Година Year 2010	Година Year 2011	Общо Total
'Pozna Plava'	1/3	2,65	6,75	5,11	4,84
'Čačanska Najbolja'	1/3	1,92	5,64	3,46	3,06
	2/3	/	1,15	/	
'Hanita'	1/3	1,82	1,29	0,10	1,25
	2/3	/	1,77	/	
'Presenta'	1/3	–	1,70	0,49	1,10
Свободно опрашване Open pollination	1/3	4,56	3,42	4,33	4,10

Във варианта със самоопрашване, през годините на изследването, броят на несъвместимите поленови тръби варира от 2,65% до 5,11%. При вариантите с кръстосано опрашване, броят на несъвместими поленови тръби е в диапазона 1,92-6,79% при сорта "Чачанска найболя"; 0,10-3,06% с "Ханита" и 0,49-1,79% със сорт "Презента". При варианта със свободно опрашване, броят варира от 3,42 до 4,56%.

Генетичният контрол на стерилността се регулира от многоалелен *S*-локус, при който съвместимостта при кръстосване се определя от хаплоидния поленов геном и от диплоидния геном на плодника. Растежът на поленовата тръба спира ако *S*-алелът,

In a self-pollination variant by the years of study, the number of incompatible pollen tubes ranged from 2,65% to 5,11%. In cross-pollination variants, the number of incompatible pollen tubes was in the range 1,92–6,79% with the cultivar 'Čačanska Najbolja'; 0,10–3,06% with 'Hanita' and 0,49–1,79% with the cultivar 'Presenta'. In an open-pollination variant, the number ranged from 3,42 to 4,56%.

Genetic control of self-incompatibility is regulated by a multialellic *S*-locus, where the compatibility of crossing is determined by the haploid pollen genome and the diploid genome of the pistil. Stopping of the pollen tube growth occurs if the *S*-allele

съдържащ се в поленовото зърно, е взаимен с един от двата *S*-алела на плодника. Два напълно различни *S*-локусни гена участват в идентифицирането и отхвърлянето на техния собствен полен: *S*-RNase (гликопротеин с рибонуклеат) като *S*-компонент на плодника и F-box gene, *SLF* (S-локус F-box) (kod *Prunus mume*) и *SFB* S-хаплотип-specific *F*-box gene) (при *Prunus dulcis*, *Punus avium* и *Prunus cerasus*), като *S*-компонент на полена, чиято функция в несъвместимата реакция все още не е установена (Hauck et al., 2006).

Поради факта, че гаметофитната несъвместимост пречи на самооплождането, водещо до намаляване на плодния завръз, опрашването със съвместим полен е изключително важно. Проявата на самостерилност при овощните култури изключва едносортово засаждане и изисква наличие на два или три съвместими сорта – опрашители (Dicenta et al., 2002). Изследването на самооплождането, както и ползите от някои опрашители, най-често се определят от плодния завръз или чрез изследване на растежа на поленовите тръби в стълбчето след опрашването. Идентифицирането на S-RNase *и SFB* гена дава възможност за характеризиране на *S*-хаплотипа в представителите на семейство *Rosaceae* чрез PCR анализ. Този метод е независим от времето и сезона на цъфтеж, тъй като за аналитичен материал се използва вегетативна тъкан (Kitasiba et al., 2007).

Използвайки флуоресцентния микроскопски метод на оцветяване с анилиново синьо, броят на несъвместимите поленови тръби варира от 1.10% при варианта на кръстосано опрашване със сорт "Презента" до 4.84% при самоопрашване. В повечето случаи несъвместимите поленови тръби спират растежа си в горната третина на стълбчето. През 2010 г. във варианта с кръстосано опрашване със

possessing a pollen grain is mutual with one of the two *S*-alleles of the pistil. Two completely different *S*-locus genes are involved in identifying and rejecting their own pollen: *S*-RNase (glycoprotein with ribonucleate) as an *S*-component of the pistil and *F*-box gene, *SLF* (*S*-lokus *F*-box) (kod *Prunus mume*) and *SFB* S-haplotype-specific *F*-box gene) (in *Prunus dulcis*, *Punus avium* and *Prunus cerasus*), as an *S*-component of the pollen, whose function in the incompatible reaction haven't been established yet (Hauck et al., 2006).

The fact that the gametophytic incompatibility system prevents self-fertilization, leading to reduced fruit set, pollination with compatible pollen is extremely important. In fruits, the occurrence of self-incompatibility excludes one varietal planting and requires the presence of two or three compatible pollinators (Dicenta et al., 2002). Examination of self-fertility, as well as the benefits of certain pollinators, have been most often defined by fruit set or by examination of pollen tubes growth in the style after pollination.

Identification of *S*-RNase and *SFB* gene enabled the characterization of *S*-haplotype in the representatives of *Rosaceae* family using PCR analysis. This method is independent of flowering time and season, because vegetative tissue is used as the analysis material (Kitasiba et al., 2007).

Using fluorescence microscopic method of aniline blue staining, the number of incompatible pollen tubes ranged from 1.10% in the variant of cross pollination with the cultivar 'Presenta', up to 4.84% in self-pollination.

In most cases incompatible pollen tubes stopped their growth in the upper third of the style. In 2010, in the cross pollination variant with the cultivars 'Hanita' and

сортове "Ханита" и "Чачанска найболя" се наблюдават несъвместими поленови тръби във втората третина на стълбчето. Приблизително същия брой несъвместими поленови тръби е установен във варианта на самостоятелно и свободно опрашване през всичките три години на изследването, което вероятно се обуславя, наред с други условия, от наличието на собствен полен върху близалцето, във варианта със свободно опрашване. По-малкият брой несъвместими поленови тръби във варианта на кръстосано опрашване със сорт "Чачанска найболя" (3.06%) може да се обясни с това, че е родител на сорт "Позна Плава". Най-малкият брой (по-малко от 1,3%) несъвместими поленови тръби е определен във варианта на кръстосано опрашване със сортовете "Презента" и "Ханита".

Гаметофитната стерилност включва неправилно функциониране на поленовите тръби и голямо отлагане на калус в тях (Ünal et al., 2013). При нея, реакцията на отхвърляне на полена е най-често срещана в горната третина на стълбчето и е придружена от силно отлагане на калус по стените на поленовите тръби и утаяването му в горния край води до образуване на характерно разширение на върха на поленовата тръбичка.

Получените резултати съответстват на резултати от проучвания на други видове от род *Prunus*: кайсия (Milatović и Nikolić, 2007), синя слива (Milošević, 2013; Djorđević et al., 2014), при които наличието на несъвместими поленови тръби е свързано главно със зоната в горната третина на стълбчето. Чрез тестване на самоопрашването при 37 сорта кайсии, Milatović and Nikolić (2007) посочват наличието на несъвместими поленови тръби, които спират растежа в долните части на яйчника. Същите резултати за наличие на несъвместими поленови тръби в долните части на яйчника се

'Čačanska Najbolja', incompatible pollen tubes were observed in the second third of the style. Approximately the same number of incompatible pollen tubes was established in the variant of self- and open pollination in all three years of study, which is probably conditioned, among others, by the presence of their own pollen on the stigma in the open pollination variant.

A somewhat smaller number of incompatible pollen tubes in the variant of cross pollination with the cultivar 'Čačanska Najbolja' (3.06) can be explained by it being a parent of the 'Pozna Plava' cultivar. The lowest number (less than 1.3%) of incompatible pollen tubes was determined in the cross pollination variant with the cultivars 'Presenta' and 'Hanita'.

Gametophytic incompatibility system involves irregular behavior of pollen tubes and a large callose deposition in them (Ünal et al., 2013). In this incompatibility system, reaction of pollen rejection is most common in the upper third of the style and is accompanied by a strong callose deposition in the pollen tubes walls and its sedimentation at the very top leading to the formation of a characteristic extension of the pollen tube tip.

The results obtained agree with the results of the study with larger number of species of the genus *Prunus*: apricot (Milatović and Nikolić, 2007), plum (Milošević, 2013; Đorđević et al., 2014) in which the occurrence of incompatible pollen tubes is mainly related to the region of the upper third of the style.

By testing self-fertility in 37 cultivars of apricot, Milatović and Nikolić (2007) state the presence of incompatible pollen tubes that stop growth in lower parts of the ovary. The same results of incompatible pollen tubes occurrence in lower parts of the ovary were observed in eight apricot

наблюдават в осем сорта кайсии, анализирани при вариантите със самоопрашване и кръстосано опрашване (Milatović et al., 2010).

Анализирайки растежа на поленовата тръба в стълбчето на сорт „Чачанска лепотица“ в три варианта на опрашване (свободно опрашване, кръстосано и самоопрашване), Kuzmanović (2008) открива наличие на несъвместими поленови тръби в горната третина от стълбчето от 12.1 до 17%. Изследвайки растежа на поленовата тръба в стълбчето на три сорта сливи, Milosevic (2013) установява наличие на несъвместими поленови тръби в 3,70-23,81% от плодниците.

Поради трите компонента на генома е трудно да се намери алелна формула или структура за два сорта домашни сливи, тъй като всеки геном има свой собствен *S*-ген с множество алели. Поради тази причина всеки сливов сорт с поленова кълняемост може да бъде опрашител на друг сливов сорт, но в различна степен (Selesses and Bonnet, 1994). Поради полиплоидната и сложна структура на генома, домашната слива е последният изследван вид от подсемейство *Prunoideae* (Tao and Iezzoni, 2010). Поради тази причина съвместимите групи при сините сливи не са определени и няма надеждна информация за генетичното разнообразие на стерилни алели (Kota and Lacis, 2013).

cultivars analysed in the variants of self- and cross pollination (Milatović et al., 2010).

Analyzing the pollen tube growth in the style of the plum cultivar ‘Čačanska Lepotica’ in three variants of pollination (open pollination, cross- and self-pollination), Kuzmanović (2008), finds the presence of incompatible pollen tubes in the upper third of the style from 12.1 to 17%. By examining the pollen tube growth in the style of three plum cultivars, Milosevic (2013) found the presence of incompatible pollen tubes in 3.70-23.81% of pistils.

Because of genome’s three-components, it is difficult to find the same allelic formula or structure for two domestic plums, since each genome has its own *S*-gene with multiple alleles. For this reason, each plum cultivar with pollen fertility can be a pollenizer to another plum cultivar but in varying degrees (Selesses and Bonnet, 1994). Due to the polyploidy and complex structure of the genome, domestic plum is the last studied species from the subfamily *Prunoid*eae (Tao and Iezzoni, 2010). For this reason, compatible groups in plums have not been defined yet and there are no reliable information on the genetic diversity of self-incompatible alleles (Kota and Lācis, 2013).

ИЗВОДИ

Тъй като това са несъвместими поленови тръби, чийто брой спрямо общия брой поленови тръби в горната третина от стълбчето е по-малък от 5%, влиянието им е незначително, дори и върху броя на поленовите тръби, които проникват в яйчника, следователно те могат да имат значение само от гледна точка на описанието на различни морфологични форми на несъвместимост.

CONCLUSIONS

Since these are incompatible pollen tubes whose counts in relation to the total number of pollen tubes in the upper third of the style was less than 5%, their influence is insignificant, even on the number of pollen tubes that penetrate into the ovary, therefore they can only be of significance here in terms of description of (the incidence of) different morphological forms of incompatible pollen tubes.

БЛАГОДАРНОСТИ

Настоящето изследване е проведено по Проект TR–31064: Развитие и запазване на генетичния потенциал на овощни видове от умерени климатични зони, подкрепен от Министерството на образованието, науката и технологичното развитие на Република Сърбия.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was conducted under Research Project TR–31064: Development and preservation of genetic potential of temperate zone fruits, supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Botu, M., C. Şarpe and S. Cosmulescu**, 2002. The genetic control of pollen fertility, pollenizing and fruit set for the *Prunus domestica* L. plum cultivars. *Acta Horticulturae*, 577, 139-145.
2. **Crawford, B.C.W. and M.F. Yanofsky**, 2008. The formation and function of the female reproductive tract in flowering plants. *Current Biology*, 18(20), R972-R978.
3. **Dicenta, F., E. Ortega, J.A. Canovas and J. Egea**, 2002. Self-pollination vs. Cross-pollination in almond: pollen tube growth, fruit set and fruit characteristics. *Plant Breeding*, 121, 163-167.
4. **Đorđević, M., R. Cerović, S. Radičević and D. Nikolić**, 2014. Incompatible pollen tubes in the plum style and their impact on fertilization success. *Genetika*, 46(2), 411-418.
5. **Franklin-Tong, N.V. and F.C.H. Franklin**, 2003. Gametophytic self-incompatibility inhibits pollen tube growth using different mechanisms. *Trends Plant Sci,* 8(12), 598-605.
6. **Halász, J., A. Pedryc, S. Ercisli, K.U. Yilmaz and A. Hegedus**, 2010. *S*-genotyping supports the genetic relationships between Turkish and Hungarian apricot germplasm. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 135(5), 410-417.
7. **Hauck, N.R., H. Yamane, R. Tao and A.F. Iezzoni**, 2006. Accumulation of nonfunctional *S*-haplotypes results in the breakdown of gametophytic self-incompatibility in tetraploid *Prunus*. *Genetics*, 172(2), 1191-1198.
8. **Herrero, M.**, 1992. From pollination to fertilization in fruit trees. *Plant Growth Regulation*, 11(1), 27-32.
9. **Higashiyama, T. and Y. Hamamura**, 2008. Gametophytic pollen tube guidance. *Sexual Plant Reproduction*, 21(1), 17-26.
10. **Igic, B. and J.R. Kohn**, 2001. Evolutionary relationships among self-incompatibility RNases*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(23), 13167-13171.
11. **Kho, Y.O. and J. Baër**, 1971: Fluorescence microscopy in botanical research. *Zeiss information*, 76, 54-57.
12. **Kitashiba, H., S.L. Zhang, J. Wu, K. Shirasawa and T. Nishio**, 2007. *S* genotiping and *S* screening utilizing *SFB* gene polymorphism in Japanese plum and sweet cherry by dot-blot analysis. *Molecular breeding*, 21(3), 339-349.
13. **Kota, D.I. and G. Lācis**, 2013. Evaluation of self-incompatibility locus diversity of domestic plum (*Prunus domestica* L.) using DNA-based *S*-genotyping. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences*, Section B, 67(2), 109-115.
14. **Kuzmanović, M.**, 2008. Biology of fertilization of plum cv Čačanska Lepotica (*Prunus domestica* L.). MSc, University of Belgrade, Faculty of Agriculture, Belgrade, Serbia.

15. **Milatović, D. and D. Nikolić**, 2007. Analysis of self-(in)compatibility in apricot cultivars using fluorescence microscopy. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 82(2), 170-174.
16. **Milatović, D., D. Nikolić, V. Rakonjac and M. Fotirić-Akšić**, 2010. Cross-(in)compatibility in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 85(5), 394-398.
17. **Milošević, N.T.**, 2013. Degree of fertilization and biological traits of new plum cultivars (*Prunus domestica* L.). Dissertation, University of Belgrade, Faculty of Agriculture, Belgrade, Serbia.
18. **Nasrallah, J.B., T. Nishio and M.E. Nasrallah**, 1991. The self incompatibility genes of *Brassica*: expression and use in genetic ablation of floral tissues. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42, 393-422.
19. **Palanivelu, R. and T. Tsukamoto**, 2011. Pathfinding in angiosperm reproduction: pollen tube guidance by pistils ensures successful double fertilization. *WIREs Developmental Biology*, 1, 96-113.
20. **Preil, W.**, 1970. Observing the growth of pollen tubes in pistil and ovarian tissue by means of fluorescence microscopy. *Zeiss Information*, 75, 24-25.
21. **Radičević, S.**, 2013. Fertilization biology and pomological properties of newly introduced sweet cherry (*Prunus avium* L) cultivars. Dissertation, University of Belgrade, Faculty of Agriculture, Belgrade, Serbia.
22. **Salesses, G. and A. Bonnet**, 1994. Citological studies of tetra-, hepta-, and octoploid interspecific hybrids between *P. cerasifera*, *P. spinosa* and *P. domestica*. *Acta Horticulturae*, 359, 26-32.
23. **Tao, R. and A. Iezzony**, 2010. The *S*-RNase-based gametophytic self-incompatibility system in *Prunus* exhibits distinct genetic and molecular features. *Scientia Horticulturae*, 124(4), 423-433.
24. **Ünal, M., F. Vardar and Ö. Ayturk**, 2013. Current Progress in Biological Research, Chapter 14: Callose in plant sexual reproduction, doi: 10.5772/53001.

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2018, 21 (5), 164-171 ISSN 1311-0489 (Print)
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan ISSN 2367-8364 (Online)

Вегетативни и репродуктивни прояви на сливови дървета от сорт "Тегера", след приложение на конвенционални и биологични торове

Деница Христова[1]*, Диян Георгиев[1], Евлоги Марков[2], Северина Вълева[1]

[1]Институт по планинско животновъдство и земеделие, ул. „Васил Левски" № 281, 5600 Троян, България
[2]Институт по почвознание, агротехнологии и защита на растенията „Никола Пушкаров", ул. „Шосе Банкя", № 7, 1331 София, България

Vegetative and reproductive characteristic of plum trees of 'Tegera' cultivar after the application of conventional and biofertilizers

Denitsa Hristova[1]*, Diyan Georgiev[1], Evlogi Markov[2], Severina Valeva[1]

[1]Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, 281 Vasil Levski Str., 5600 Troyan, Bulgaria
[2]Institute of Soil Science Agrotechnologies and Plant Protection "Nikola Pushkarov", 7 Shose Bankya Str., 1331 Sofia, Bulgaria
**E-mail: den_1986@abv.bg*

Received: 05.06.04.2018 *Accepted:* 11.09.2018 *Published:* 21.12.2018

РЕЗЮМЕ

За периода 2016-2017г. в Институт по планинско животновъдство и земеделие - Троян са проследени вегетативните и репродуктивни показатели на сливови дървета от сорт "Тегера", след приложение на конвенционални и биологични торове.

От получените данни е установено, че в резултат на проведеното торене, нарастването на стволовете е най-силно изразено при конвенционалното торене – 49,18 cm (2016г.) и 50,25 cm (2017г.).

През първата опитна година, с най-голям обем са короните на дърветата от варианта с био торене - 26,59 m^3, а през следващата при пилешкия

SUMMARY

The vegetative and reproductive characteristics of plum trees of 'Tegera' cultivar were followed after the application of conventional and biofertilizers in the period of 2016-2017 in the Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture - Troyan.

The most pronounced growth of tree trunk was found after the application of conventional fertilizer – 49.18 cm (2016 g) and 50.25 cm (2017).

The biggest volume of tree crowns was found in the first experimental year in the application of biofertilizer - 26.59 m^3, and during the next year in the application

тор – 23,81 m^3. За сравнение, резултатите от контролния вариант са съответно 14,25 m^3 и 8,99 m^3.

Вариантите на конвенционално торене и торенето с пилешки тор през двугодишния опитен период се отличават и с по-високи добиви на плодове (kg/дърво).

Ключови думи: слива, сорт, торене, тегло на плода, добив

of chicken manure - 23.81 m^3. For comparison, the control results were 14.25 m^3 and 8.99 m^3.

The variants with conventional fertilizer and chicken manure were characterized by higher average fruit yields - kg/tree over the two-year experimental period.

Key words: plum, cultivar, fertilization, indicators, yield

УВОД

Сливата е важна и широко отглеждана плодова култура в регионите на умерения климат (Kumar et al., 2018). Заема първо място по стопанско значение за планинските райони на България (Mondeshka et al., 2002; Vitanova et al., 2006). Тя формира овощно дърво с добра растежна сила, въздействие върху която оказват сорта, подложката и условията на местоположение (Lichev et al., 2004). Сливовите сортове са разнообразни по отношение на плодовите си характеристики, като размер, форма, цвят, текстура, аромат и др. (Baden and Byren, 2012).

За получаването на висока, ежегодна и качествена плодова реколта е необходимо извършваната резитба да е съобразена конкретно с всеки сорт, в зависимост от типа и възрастта на плододаваща дървесина (Dzhuvinov et al., 2014).

Културните растения във фазите си на растеж имат особено големи нужди от хранителни вещества. Подхранващото торене в такъв момент води до получаването на по-високи добиви, чрез използване на подходящи такива, в оптималната форма и концентрация (Todorova and Boteva, 2015).

Целта на изследването е проследяване влиянието на биологично, конвенционално и органично торене, върху вегетативните и репродуктивни прояви на дърветата от сорт “Тегера”.

INTRODUCTION

Plum is an important and widespread fruit tree in temperate climates (Kumar et al., 2018). It takes the first place of economic significance for the mountainous regions of Bulgaria (Mondeshka et al., 2002; Vitanova et al., 2006). Its tree has good growth power, which is influenced by the cultivar, rootstock and the habitat conditions (Lichev et al., 2004). Plum cultivars are varied in terms of their fruit characteristics such as size, shape, color, texture, aroma, etc. (Baden and Byren, 2012).

In order to obtain a high, annual and quality fruit harvest, the pruning should be conducted specifically to each cultivar, depending on the type and age of the fruit-bearing wood (Dzhuvinov et al., 2014).

Crops have particularly high nutrient needs in their growth phases. Nourishing fertilization at such a time results in higher yields, using suitable ones, in the optimal form and concentration (Todorova and Boteva, 2015).

The aim of the study is to follow the influence of biological, conventional and organic fertilization on the vegetative and reproductive characteristics of ’Tegera’ cultivar trees.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

В ИПЖЗ - Троян, сливовото насаждение от немския сорт “Тегера” е създадено през пролетта на 2001 г. Дърветата са засадени в траншеи със запасяващо органично торене с оборски тор (130 kg/1 m^2) при разстояния на засаждане 4/2,5 m. Междуредовото разстояние е затревено с тръстиковидна власатка, а вътрередовото се поддържа в черна угар. Културата се отглежда съобразно агротехническите ú изисквания.

През пролетта на 2016г. в сливовото насаждение е заложен опит със следните варианти на торене:

- **I вариант** – Био торене – включващо торовете: Агрифул (почвено) – 5l/da, Текамин Флауър (листно) – 0,3%, Текнокел Амино Са (листно) – 0,4%;
- **II вариант** – Конвенционално – Yara Mila Complex (почвено) – 0.500 kg/дърво, YaraVita Frutrel (листно) – 0.500 ml/da, Yara Vita Universal Bio (листно) – 0.500 ml/da;
- **III вариант** – Гранулиран Пилешки тор – 0.500 kg/дърво;
- **IV вариант** – Контрола.

Периоди на внасяне на торовете:

- Агрифул – приложен петкратно от началото на вегетацията през период от 15-20 дни;
- Текамин Флауър – внесен двукратно. Прилаган преди цъфтеж и по време на образуване на завръз;
- Текнокел Амино Са – внесен двукратно. Прилаган след цъфтеж и месец преди прибиране на реколтата;
- Yara Mila Complex – внесен еднократно през 2016г;
- Амониева селитра – внесена еднократно през 2017г – 0.220 kg/дърво;
- YaraVita Frutrel – внесен четирикратно. Първо във фаза зимни пъпки, във фаза бял бутон, по време на образуване на завръз и месец преди прибиране на реколтата;

MATERIAL AND METHODS

RIMSA-Troyan, the plum plantation of the German cultivar ’Tegera’ was created in the spring of 2001. The trees are planted in trenches with organic stockpile fertilizing with manure (130 kg/1 m^2) at planting distances of 4/2.5 m.

The row spacing is grassed with tall fescue and the intra row spacing is kept in black fallow. The cultivar is grown according to its agro-technical requirements.

The experiment with the following fertilization variants was set in the spring of 2016:

- **I variant** – Bio-fertilization – including fertilizers: Agriful (soil) – 5 l/da, Tecamin Flower (leaf) – 0.3%, Tecnocel Amino Ca (leaf) – 0.4%;
- **II variant** – Conventional – Yara Mila Complex (soil) – 0.500 kg/tree, YaraVita Frutrel (leaf) – 0.500 ml/da, Yara Vita Universal Bio (leaf) – 0.500 ml/da;
- **III variant** – Granulated Chicken Manure - 0.500 kg/tree;
- **IV variant** – Control.

Fertilization periods:

- Agriful – applied five times from the beginning of the vegetation for a period of 15-20 days;
- Tecamin Flower – 2 applications. Applied before blossoming and during the formation of a fruit-set;
- Tecnocel Amino Ca – 2 applications. Applied after blossoming and a month before harvesting;
- Yara Mila Complex – 1 application in 2016;
- ammonium nitrate – 1 application in 2017 - 0.220 kg/tree;
- YaraVita Frutrel – four applications. The first application was at the phase of winter buds, at the phase of white button, at the fruit-set formation and a month after the harvest.

• Yara Vita Universal Bio - внесен трикратно. Прилаган преди и след цъфтеж и след прибиране на реколтата;

• Гранулиран пилешки тор – внесен еднократно през 2016г.

Всеки вариант на торене включва по четири дървета.

Съгласно методиката за изучаване на растителните ресурси (Nedev et al., 1979) са отчетени вегетативните и репродуктивни показатели на овощните дървета:

• Обиколка на ствола (cm)
• Височина на короните (m);
• Ширина на короните по реда (m);
• Ширина на короните към междуредие (m);
• Обем на короните (m3);
• Дължина на едногод. прираст (cm);
• Сумарен едногод. прираст (cm)
• Маса на плода (g)
• Добив от дърво (kg)

• Yara Vita Universal Bio – 3 applications. Applied before and after bloom and after harvest;

• Granulated chicken manure – one application in 2016.

Each fertilizer variant includes four trees.

According to the methodology for study of plant resources (Nedev et al., 1979) the vegetative and reproductive indicators of the fruit trees are taken into account:

• Trunk diameter (cm)
• Crown height (m);
• Crown width in the row (m);
• Crown width in the row spacing (m);
• Crown volume (m3);
• Annual shoot length growth (cm);
• Total annual shoot length growth (cm)
• Fruit weight (g)
• Yield per tree (kg)

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Проследените вегетативни показатели при сливов сорт “Тегера” са посочени в Таблица 1. От резултатите се вижда, че през двете години на вегетация, след проведеното торене, в различните варианти се наблюдава нарастване на стволовете, най-силно изразено при конвенционалното торене – 49,18 cm (2016г.) и 50,25 cm (2017г).

В периода на първата опитна година короните на сливовите дървета са с най-голяма средна височина при био торенето – 5,42 m. За сравнение дърветата от контролния вариант са със средна стойност от 4,11 m. За 2017г. с най-високи резултати по отношение на височина, ширина по реда и към междуредието се отличава вариантът на торене с пилешки тор.

RESULTS AND DISCUSSION

The following vegetative indicators for ’Tegera’ are shown in Table 1. The trunk grew in both years in the vegetation period, after the fertilization.

The most pronounced was the variant of conventional fertilization – 49.18 cm (2016 g) and 50.25 cm (2017).

During the first experimental year, the plum tree crowns have the highest average height in the variant of organic fertilization – 5.42 m. For comparison, the trees of the control variant have an average of 4.11 m. In 2017, the variant of chicken manure showed the highest results in terms of height, width in the row and in the row-spacing.

Таблица 1. Вегетативни показатели при сорт “Тегера” за периода 2016-2017г.
Table 1. Vegetative indicators of ’Tegera’ cultivar for the period 2016-2017

Показатели Indicators Вариант/Variant	Обиколка на ствола Trunk diameter cm	Височина на короните Crown height m	Ширина на короните по реда Crown width in the row m	Ширина на короните към междуредие Crown width in the row spacing m	Обем на короните Crown volume m^3	Дължина на едногод. прираст Annual shoot length growth cm	Сумарен едногод. прираст Total annual shoot length growth cm
2016							
I Био торене Bio-fertilization	45,95	5,42	3,78	4,88	26,59	9,24	36,97
II Конвенц. торене Conventional	49,18	5,05	3,73	3,95	19,49	7,50	30,01
III Пилешки тор Chicken manure	44,55	4,57	3,75	3,86	17,31	10,03	40,12
IV Контрола Control	42,60	4,11	3,87	3,41	14,25	7,90	31,61
St error	1,38	0,28	0,03	0,31	2,62	0,59	2,35
St Dev	2,77	0,57	0,06	0,62	5,25	1,17	4,69
CV %	6,08	11,91	1,63	15,33	27,03	13,55	13,53
$LSD_{0.05}$	ns	0,74	ns	0,62	7,78	1,84	-
2017							
I Био торене Bio-fertilization	47,00	5,27	3,32	4,01	18,52	10,28	41,12
II Конвенц. торене Conventional	50,25	5,16	3,56	3,96	19,09	9,21	36,86
III Пилешки тор/ Chicken manure	45,95	5,40	3,89	4,32	23,81	8,55	34,19
IV Контрола Control	42,48	3,83	2,86	3,13	8,99	10,48	41,93
St error	1,60	0,36	0,22	0,25	3,10	0,45	1,82
St Dev	3,20	0,73	0,43	0,51	6,21	0,91	3,64
CV %	6,88	14,85	12,72	13,20	35,29	9,46	9,46
$LSD_{0.05}$	ns	ns	0,94	ns	9,59	ns	-

Получените резултати за обем на короните значително варират през периода на отчитане и поради това са с по-висок коефициент на вариация, спрямо останалите показатели. През първата година с най-голям обем са короните на дърветата от варианта с био торенето – 26,59 m^3, а през следваща 2017г. при тези от пилешкия тор – 23,81 m^3. И през двете години овощните дървета от контролния вариант са с най-ниски резултати, съответно 14,25 m^3 и 8,99 m^3.

По отношение на едногодишния прираст може да се отчете, че той е сравнително малък. През първата 2016 г. най-голяма средна дължина е измерена при варианта с пилешкия тор – 10,03 cm, следвани в низходящ ред от тези на био торенето, контролата и конвенционалното торене (CV-13,55%). Средният сума-

The results of the crown volume significantly fluctuate during the reporting period due to a higher coefficient of variation compared to other indicators.

In the first year, the trees with the bio-fertilization variant have the largest volume – 26.59 m^3, and in 2017 those with the chicken manure – 23.81 m^3. In both years, the fruit trees from the control variant have the lowest results, respectively 14.25 m^3 and 8.99 m^3.

The annual shoot length growth is relatively small. In the first year (2016), the largest average length was measured in the chicken manure variant – 10.03 cm, followed in descending order of bio-fertilization, control and conventional fertilization (CV-13.55%). The average total annual shoot length growth follows

рен едногодишен прираст следва същата последователност. За 2017г., най-висок среден и сумарен едногодишен прираст е отчетен при дърветата от контролния вариант – 41,93 cm, а най-малък е от варианта с пилешкия тор – 34,19 cm. Вероятна причина за по-ниските стойности на показателя от вариантите с конвенционалното торене и на пилешкия тор е полученият по-висок добив на плодове от тях.

Отчетените репродуктивни прояви за изпитвания период са представени в Таблица 2.

the same sequence. For 2017, the highest average and total annual shoot length growth was recorded for the trees of the control variant – 41.93 cm, and the smallest in the chicken manure variant - 34.19 cm. The probable cause for the inferior values of the conventional fertilization and chicken fertilizer variant is their higher fruit yield.

The reported reproductive performance for the experimented period is presented in Table 2.

Таблица 2. Репродуктивни прояви на сорт "Тегера" за периода 2016-2017г.
Table 2. Reproductive manifestations of 'Tegera' cultivar for the period 2016-2017

Показатели / Indicators Вариант / Variant	Маса плод Fruit weight g	Добив от дърво Yield per tree kg
2016		
I Био торене/Bio-fertilization	30.00	1.05
II Конвенц.торене/Conventional fertilization	32.40	2,01
III Пилешки тор/Chicken manure	31.20	2,81
IV Контрола/Control	29,20	1,47
St error	0,70	0,38
St Dev	1,40	0,76
CV %	4,56	41,39
$LSD_{0.05}$	ns	ns
2017		
I Био торене/ Bio-fertilization	31,16	14,30
II Конвенц. торене/ Conventional fertilization	28,12	33,92
III Пилешки тор/ Chicken manure	29,96	21,55
IV Контрола/ Control	24,48	17,42
St error	1,46	4,30
St Dev	2,91	8,61
CV %	10,25	39,50
$LSD_{0.05}$	1,82	13,67

За 2016г. средната маса на един плод е най-висока при конвенционалното торене – 32,40 g, следвана от варианта с пилешкия тор, био торене и контролата. През следващата година, най-висока статистически доказана средна стойност за едрина на плода е отчетена при варианта на третиране с био торовете от първи вариант, с

For 2016, the highest average weight of one fruit was found in conventional fertilization – 32.40 g, followed by the chicken manure, bio-fertilizer and control. In the following year, the highest statistically proven mean value for fruit size was recorded in the variant of bio-fertilizers of the first variant, with a result of 31.16 g, compared to the

резултат от 31,16 g, спрямо отчетената при контролата 24,48 g.

Средният добив на плодове за 2016г. е най-висок при трети вариант (пилешки тор) – 2,81 kg/дърво и най-нисък при първи вариант (био торене) – 1,05 kg/дърво. Като цяло малкото количество плодове при всички варианти през съответната година е в резултат на ниските температури по време на цъфтежа, водещи до измръзване и изсъхване на плодници и близалца. Отчетеният добив от вариантите през следващата 2017г. е значително по-висок. Най-много сливови плодове са получени от варианта с конвенционалното торене – 33,92 kg/дърво, а най-малко при този на био торене – 14,30 kg/дърво. Значително вариращият добив и през двете опитни години между различните варианти на торене определят високия вариационен коефициент от 41,39% за 2016г. и 39,50% за 2017г. Разликите са математически доказани.

24.48 g control.

The average fruit yield in 2016 is the highest in the third variant (chicken manure) – 2.81 kg/tree and the lowest in the first variant (bio fertilization) – 1.05 kg/tree. In general, the small amount of fruit in all variants during the year is the result of low temperatures during blossoming, resulting in frost and drying of ovary and stigma. Reported yield from variants in the next 2017 is significantly higher. The highest amount of plum fruits are obtained from conventional fertilization – 33.92 kg/tree, and at least from organic fertilizers – 14.30 kg/tree. The high variation coefficient of 41.39% in 2016 and 39.50% in 2017 was determined by the significantly variable yield over both experimental years among the different fertilization variants. Differences are mathematically proven.

ИЗВОДИ

Въз основа на получените двугодишни данни, можем да обобщим, че при сливов сорт “Тегера”, приложеното конвенционално торене оказва положително въздействие върху по-високите стойности на обиколката на стволовете на овощните дървета. През опитната 2016г. с най-голям обем на короните са дърветата от варианта на био торенето, а през 2017г. при пилешкия тор. Средният едногодишен и сумарен прираст през първата година е най-висок при пилешкия тор, като през следващата с най-високи стойности е при контролния вариант.

Независимо от ниския добив, в резултат от понижението на температурата на въздуха по време на цъфтежа, довела до измръзване и изсъхване на плодници и близалца през 2016г. и значително по-високото количество получени плодове за 2017г., вариантите на конвенционално торене и пилешки тор и през двете години се отличават с най-висок добив.

CONCLUSIONS

The conventional fertilization has a positive impact on the higher values of trunk diameter in ’Tegera’ plum cultivar.

The greatest crown volume was found in bio-fertilization variant in 2016, and in 2017 in the variant with chicken manure.

The highest average annual shoot length and total growth was in the first year in the chicken manure variant, as in the next year the highest values were found in the control variant.

Despite the low yield, resulting from the decrease in air temperature at the time of blossoming, leading to freezing and drying of ovary and stigmas in 2016, and the significantly higher quantity of fruit produced in 2017, the conventional fertilization options and the chicken fertilizer have the highest yield over both years.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Baden, M. L. and D. H. Byren**, 2012. Fruit breeding: Handbook of Plant Breeding, 8, 521-621.
2. **Dzhuvinov, V., K. Kolev, V. Bozhkova and S. Gandev**, 2014. Architecture of the fruit tree in apple, cherry and plum. *Plant science*, 1, 21-26.
3. **Kumar, M., D. D. Sharma, N. Singh and B. Shylla**, 2018. Evaluation of newly introduced plum (*Prunus salicina* Lindl.) cultivars under mid-hills of Himachal Pradesh. *International Journal of Chemical Studies*, 6(2), 2925-2930.
4. **Lichev, V., G. Govedarov, S. Tabakov and A. Yordanov**, 2004. First results of testing of standard and newly introduced plum varieties. *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans*, 7(3), 292-301.
5. **Mondeshka, P., H. Dinkova, I. Minev and K. Dragoyski**, 2002. Characterization of the fruits of some plum varieties from the collections of RIMSA, Troyan. In: 120 years of Agricultural science in Sadovo, 3, 134-138 (Bg).
6. **Nedev, N. Yo. Grigorov, Hr. Baev, S. Serafimov, Al. Strandzhev, L. Kavardzhikov, Kr. Lazarov, N. Nikolov, V. Dzhuvinov, L. Popov, N. Slavov, R. Iliev, D. Stoyanov, Il. Kanev, H. Hrinkov, Yo. Vishanska, M. Topchiyska and L. Petrova**, 1979. Methodology for the Study of Plant Resources in Orchard plants. Plovdiv (Bg).
7. **Todorova, D. and H. Boteva**, 2015. Effect of Feeding with Organic Poultry Manure during Vegetation on Yield and Quality of Cabbage. *Plant Science*, LII(3), 52-56.
8. **Vitanova, I., D. Ivanova, S. Dimkova and N. Marinova**, 2006. The Plum Garden. Zemizdat, pp. 3-92 (Bg).

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2018, 21 (5), 172-181 ISSN 1311-0489 (Print)
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan ISSN 2367-8364 (Online)

Управление на напояването в трайни насаждения чрез определяне водния статус на растенията

Куман Куманов[1]*, Александър Матев[2], Георги Корнов[1], Даниела Германова[1]

[1]Институт по овощарство, 4004 Пловдив, България
[2]Аграрарен университет, 4000 Пловдив, България

Irrigation management in perennial crops by sensing the plant water status

Kouman Koumanov[1]*, Alexander Matev[2], Georgi Kornov[1], Daniela Germanova[1]

[1]Fruit Growing Institute, 4004 Plovdiv, Bulgaria
[2]Agricultural University, 4000 Plovdiv, Bulgaria
**E-mail: kskoumanov@hotmail.com*

Received: 08.05.2018 *Accepted:* 04.12.2018 *Published:* 21.12.2018

РЕЗЮМЕ

Управлението на поливния процес се основава на разнообразни методи за оценка на атмосферни, почвени и растителни параметри. Счита се, че възможността за измерване на едни или други растителни показатели е предимство, доколкото осигурява непосредствена информация за водния статус на културните растения. Така например *барокамерата (pressure bomb)* измерва потенциала на водата в листата или стъблото, който директно се свързва с растежа или евентуално с нивото на водния стрес в растенията. *ZIM сондата* е безразрушителен сензор, който отчита измененията в тургора на листата при оводняване или воден стрес. *Дендрометрите* измерват изменения от порядъка на микрони в размера на вегетативните органи (плодове, клони, стъбло) при оводняване или воден стрес, доколкото съответните изменения във водния запас на тъканите причиняват тяхното разширя-

SUMMARY

The irrigation management is based on various methods for estimation of atmospheric, soil and plant characteristics. The possibility to measure one or another plant characteristic is considered to be advantageous, because it provides immediate information about the crop-plants water status.

Thus, for instance, the *pressure chamber* measures the leaf/stem water potential, which is directly related to the growth or, eventually, to the level of water stress in plants. The *ZIM-probe* is a non-destructive sensor measuring the changes in leaf turgor caused by their watering or by water stress.

Dendrometers measure changes of the order of microns in the size of vegetative organs (fruit, branches, stem), as far as the respective changes in the tissue water storage make them to swell/shrink.

вание или свиване. *Методите на топлинния баланс/импулс* служат за измерване на траспирационния поток в стъблата на растенията и изразходваната от тях вода. *Инфрачервената термометрия* измерва без директен физически контакт разликата между температурата на растителната покривка и тази на околния въздух, чрез която разлика се съди за водния статус на растенията. *Порометрите* и *инфрачервените газови анализатори* измерват устичната проводимост, която е индикатор за водния стрес в растенията. Повечето от изброените методи позволяват висока честота и автоматизиране на измерванията, което ги прави подходящи за една информационно-съветваща система за управление на напояването, свеждаща в реално време информация и инструкции до мобилно устройство (телефон) на производителите. Предмет на допълнителна оптимизация е броят на сензорите на единица площ, така че да се гарантира необходимата представителност на измерванията.

Ключови думи: барокамера, ZIM-сонда, дендрометър, топлинен баланс и импулс, инфрачервена термометрия, порометър, инфрачервен газов анализатор

The *heat balance/pulse methods* are used to measure the transpiration flow in the stems, which is indicative of the water used by plants.

The *infrared thermometry* measures, without direct physical contact, the difference between the ambient and the canopy temperature which is indicative of the plant water status.

The porometers and the infrared gas analyzers measure stomatal conductivity, which is related to the water stress levels.

Most of the listed methods enable high frequency and automation of the measurements suitable for an irrigation management information system, bringing in real time information and instructions to a farmer's mobile device (telephone).

The number of sensors per unit area is subject of additional optimization against the necessary representativeness of the measurements.

Key words: pressure chamber, ZIM probe, dendrometer, heat balance and pulse, infrared thermometry, porometer, infrared gas analyzer

УВОД

Овощните култури се развиват нормално и проявяват в максимална степен своите продуктивни възможности, ако са задоволени потребностите им от вода през цялата вегетация. Основни източници на вода за овощните растения са водният запас в почвата от предшестващи вегетацията валежи, вегетационните валежи и напояването. При един технологично издържан поливен режим графикът на поливките и размерът на поливните норми трябва да бъде съобразен с особеностите на културата и характеристиките на климата и почвата. Планирането и управлението на поливния процес се основава на разнообразни методи за

INTRODUCTION

Fruit crops grow normally and exhibit their maximum productive potential if their water requirements are met throughout the vegetation season. Water for the fruit plants is provided mainly by the storage accumulated in the soil prior to vegetation, rainfalls during the growing season and irrigation.

The regime of irrigation is technologically consistent when both the timing of applications and the application rates conform with the crop specificity and the climate and soil characteristics.

The irrigation scheduling and management is based on various

оценка на атмосферни, почвени и растителни параметри (Boyer, 1995; NEH 15-1, 1991). Счита се, че възможността за определяне/измерване на едни или други растителни показатели е предимство, доколкото осигурява непосредствена информация за водния статус на културните растения (Smith and Allen, 1996; Jones, 2007; Fernández, 2017).

Визуално определяне на водния статус

Повечето видими симптоми се откриват първо по листата и се изразяват в забавен растеж, променена форма и промяна в позицията спрямо слънцето. Обикновено визуалните симптоми се проявяват след като растенията вече са достигнали високи нива на воден стрес, които понижават необратимо добива и качеството на плодовете. Тези нежелани ефекти могат да бъдат избегнати с използването на индикаторни растения, които са по-чувствителни на почвено засушаване и сигнализират за необходимостта от напояване преди водният стрес в културните растения да достигне критични стойности. Няколко от културните растения също могат да бъдат превърнати в индикаторни, като кореновата им система бива ограничена чрез механични бариери или пък водозадържащата способност на почвата в обхвата на кореновата система бъде намалена чрез смесване на почвата с пясък (NEH 15-1, 1991).

Измерване на водния потенциал

Водният потенциал директно се свързва с растежа или евентуално, с нивото на изпитвания от растенията воден стрес. Потенциалът на водата в листата и стъблата на растенията се измерва с барокамера (Scholander et al., 1965). Основни елементи на барокамерата са камера, манометър, спирателен кран и бутилка с азот под налягане. При измерване откъснат лист от растението се поставя в барокамерата, като част от дръжката се оставя да стърчи навън през уплътняваща тапа. По презумпция, с откъсването на листа, съдържащата се

methods for assessment of atmospheric, soil and plant parameters (Boyer, 1995; NEH 15-1, 1991). The opportunity to determine/measure one or the other plant parameter is considered advantageous, because it provides firsthand information about the water status of the crop (Smith and Allen, 1996; Jones, 2007; Fernández, 2017).

Visual estimation of the water status

Most visual symptoms are firstly detected on leaves and are expressed by retarded growth, changed shape and altered position in relation to the sun. Usually, the visual symptoms become visible when the plants have already reached high levels of water stress, which cause irreversible reduction of the yield and the fruit quality. These undesired effects can be avoided using indicator plants that are naturally more susceptible to soil water deficits and provide a visual signal for a needed irrigation before the plant water stress reaches critical values.

Some of the crop plants can be turned into test plants as well, either by restriction of their root systems using mechanical barriers or by planting them in a soil that is mixed with sand to reduce its available water storage (NEH 15-1, 1991).

Measuring the water potential

The water potential is directly related to the plant growth and, eventually, to the level of the water stress developed in plants. The water potential in leaves and stems is measured using a pressure chamber. The primary features of the pressure chamber are the chamber, pressure gauge, control valve, and a small nitrogen-gas tank to serve as a pressure source. To start the measurement, a leaf is cut from the plant and placed into the chamber leaving sufficient petiole length to extend through a sealed stopper. Presumably, once the

в ксилема вода бива засмукана навътре поради разликата между по-високото атмосферно налягане и ниския воден потенциал в проводящите елементи на ксилема. С постепенно развиване на крана азотният газ навлиза в камерата, увеличавайки постепенно налягането върху листа, което изтласква водата в ксилема обратно към отреза на дръжката. Приема се, че в момента, когато в края на дръжката се образува капка от изтласканата от ксилема вода, налягането в камерата съответства на водния потенциал в ксилема на листа преди откъсването му.

За определяне на стъблений воден потенциал се избира лист, разположен близо до стъблото или до скелетен клон. Един-два часа преди измерването листът трябва да се завие с непрозрачен непропусклив материал (подплатен с фолио книжен плик), така че да се предизвика затваряне на устицата и спиране на транспирацията. Счита се, че при тези условия водният потенциал в листа е еднакъв с този в съблото. Трябва да се отбележи обаче, че отчетите от барокамерата се променят значително през деня: стойностите на водния потенциал са най високи преди изгрев слънце и най-ниски по обед. Това са и най-подходящите моменти от денонощието за измервания с цел управление на напояването, защото тогава отчетите се стабилизират. Някои растителни видове обаче успяват да поддържат относително постоянен водния си статус, чрез затваряне на устицата при появата на воден стрес или чрез осморегулация, което изкривява отчетите на барокамерата при обедните измервания на водния потенциал. В тези случаи измерванията преди изгрев слънце се считат за по-надеждни. Общоприето е също така, че стъбленият воден потенциал е по-адекватният индикатор за водния статус на растенията. Процедурата на измерване не подлежи на автоматизация. Методът се използва главно за изследователски цели (Boyer, 1995; UC-ANR, 2014; Fernández, 2017).

petiole or spur is severed, water withdraws within the xylem vessels, because of the pressure difference between the higher external (atmospheric) pressure and the water potential inside the conducting tissue. Through unwinding the valve, the nitrogen gas is let to enter the chamber pressurizing the leaf and forcing the water in the xylem back to the cut petiole surface. It is presumed that the positive chamber pressure in this moment matches the negative potential of the xylem water before cutting the leaf.

The stem water potential is measured using a leaf located close to the stem or to a limb. One-two hours before the measurement, the leaf has to be wrapped in an opaque water/vapor impermeable material (foil lined paper bag) in order to induce stomatal closure and prevent transpiration. It is presumed that under these conditions the leaf water potential is identical with the stem water potential. It should be noted, however, that the pressure chamber readings change drastically during the day: The water potential values are highest just before sunrise and lowest at approximately solar noon. These are the most suitable periods of the day for measurements related to irrigation-management, because the readings remain relatively stable. Some crops may have rather erratic midday readings due to their ability to maintain relatively constant water stress, either closing the stomata or through osmoregulation. In such cases, the predawn readings are considered more reliable. The stem water potential is regarded as the more adequate indicator of the water stress in plants. The measurement procedure cannot be automated. The method is applicable mainly for research purposes (Boyer, 1995; UC-ANR, 2014; Fernández, 2017).

Измерване на устичната проводимост

Чрез отваряне и затваряне на устицата растенията регулират листния газообмен и в частност загубата на вода под формата на водни пари (транспирацията), която се обуславя от устичната проводимост. Доколкото нормата на транспирация е обратно пропорционална на водния стрес, устичната проводимост се използва като индикатор за водния статус на растенията. За измерването ѝ се използват порометри или инфрачервени газови анализатори. И двата инструмента са съоръжени с камера, в която се изолира, без да се отделя от растението, цял лист или част от него. Методът се основава на баланса на масата на водата във въздушния поток, протичащ през камерата. В случай че листната кутикула е пропусклива, апаратът измерва листната проводимост. Процедурата на измерване не подлежи на автоматизация. Методът се използва главно за изследователски цели (Pearcy et al., 2000; Fernández, 2017).

Инфрачервена термометрия

При този метод без директен физически контакт се измерва разликата между температурата на растителната покривка ($T_{листа}$) и тази на околния въздух ($T_{въздух}$), чрез която се съди за водния статус на дърветата. Презумпцията е, че температурата на добре водоснабдените растения е сравнително по-ниска в следствие на интензивната транспирация, докато със засушаването и развитието на воден стрес в растенията тяхната температура се повишава. Въз основа на температурната разлика са разработени индекси на водния стрес (WSI) като индикатори за нуждата от напояване. Това са емпирични зависимости от вида $WSI = f(T_{листа} - T_{въздух})$, които освен температурната разлика отчитат и влиянието на други фактори на околната среда. Освен за управление на напояването, инфрачервената термометрия може да се използва и като индиректен показател за водния запас в активния почвен обем или за устичната проводимост на листата. Измерванията

Measuring the stomatal conductance

Plants use stomatal opening and closure to regulate the leaf gas exchange and, particularly, the water loss in vapor state (transpiration), which is governed by the stomatal conductance. Because the transpiration rate is in inverse proportion to the water stress, stomatal conductance is used as an indicator for the water status of plants. The stomatal conductance is measured using porometers and infrared gas analyzers. Both instruments have a chamber in which an intact leaf or part of it is isolated without detaching it from the plant. The method is based on the mass balance of the water contained in the air flowing through the chamber. When the leaf cuticle is permeable, the apparatus measures the leaf conductance. The measurement procedure cannot be automated. The method is applicable mainly for research purposes (Pearcy et al., 2000; Fernández, 2017).

Infrared thermometry

This method relates plant water status to the difference between the canopy (T_{leaf}) and the ambient-air (T_{air}) temperatures, which are measured without direct physical contact. It is presumed that the temperature of well watered plants is relatively lower, due to the intensive transpiration, while the development of drought-induced water stress increases plant temperature. The need of irrigation is determined by water stress indices (WSI) developed on the basis of the temperature difference.

These are empirical relationships of the type $WSI = f(T_{leaf} - T_{air})$, which may also account for other environmental factors. Besides irrigation management, the infrared thermometry can serve as an indirect indicator for both the water storage in the root zone and the stomatal conductance. Readings are taken between 11:00 and 14:00 hours in a clear

се извършват между 11:00 и 14:00 часа в ясно време. За целта се използват ръчни инфрачервени термометри или термални камери, монтирани на нивото на културата, но също така на мачти, дронове, самолети, и сателити. Изображенията, получени от дистанционните измервания осигуряват информация и за пространственото вариране във водния статус на насаждението. Инфрачервената термометрия подлежи на автоматизация, но е ненадеждна при вятър или облачност, което ограничава приложението й (Jackson, 1982; Martin, 2001).

Дендрометрия

Дендрометрите измерват изменения от порядъка на микрони в размера на различни органи на културните растения – стъбла, клони, листа, корени или плодовете – предизвикани от вариации във водния им статус. При воден стрес недостигът от вода се компенсира от водния запас в тъканите, което предизвиква свиването им. Свиването обаче е обратимо при последващо оводняване на растението. Поради разликите в нормата на транспирация през деня и нощта, в размерите на наблюдавания орган се наблюдават вариации, които са с денонощна цикличност. Индикатори, използвани за управление на напояването са максималното дневно свиване и нормата на нарастване на съответния орган. И двата индикатора обаче се влияят от характеристики на културата като възраст, сорт, сила на растеж, натоварване с плодове, фенофази и др. Необходимостта от текуща експертна преценка обаче ограничава възможностите за автоматизация на поливния процес. Самите дендрометри са здрави, прецизни, подходящи за автоматично отчитане, съхраняване и трансфер на данните. С тези устройства водният недостиг и съответно необходимостта от напояване се установяват значително преди появата на видимите симптоми на водния стрес и дори преди появата на измерими промени в стойностите на водния потенциал. Основният проблем е, че понякога растенията реагират по същия начин и при излишък на вода в

day using either infrared handheld thermometers or thermal cameras mounted at the crop level, but also on booms, drones, planes and satellites.

The images captured by the thermal infrared remote sensing provide information about the spatial variation in plant water status. The infrared thermometry can be automated but yields unreliable data in windy or cloudy weather, which limits its application (Jackson, 1982; Martin, 2001).

Dendrometry

Dendrometers measure small changes, of the order of microns, in the size of various plant organs (stems, branches, leaves, roots, or fruit) caused by variations in their water status. Under water stress, the water shortage is compensated by the water stored in plant tissues, which makes them shrink. The shrinking is, however, reversible at subsequent plant rehydration. The differences between the daily and the nocturnal transpiration rates cause fluctuations with daily recurrence in the size of the surveyed organ. The maximum daily shrinkage and the stem growth rate are the most widely used indicators in irrigation scheduling. However, both indicators are highly dependent on parameters of the crop as age, cultivar, vigor, crop load, phenological phase etc. The need of regular expert interpretation limits the potentialities of the irrigation process automation. The dendrometers themselves are robust and precise, suitable for automatic reading, recording and data transmission under field conditions. These devices enable detection of the water deficit, respectively the need for irrigation, well before the appearance of the water stress symptoms and even before the appearance of measurable changes in the values of the water potential. The main problem encountered is that, sometimes, the same response is

почвата (Bormann and Kozlowski, 1962; Clark et al., 2000; Fernández, 2017).

Методи на топлинния баланс/импулс

Топлината се използва като трасьор при определяне нормата на транспирация или с други думи количеството на възходящия воден ток в ксилема на растенията (Sakuratani, 1981; Smith and Allen, 1996; Green et al., 2003; Fernández, 2017).

При метода на топлинния баланс, в определен участък по дължина на стъблото температурата на водата в ксилема се повишава, чрез постоянен топлинен поток, приложен равномерно по обиколката на стъблото. За целта се използва полугъвкава лента-нагревател с широчина няколко сантиметра, увита окоро ствола и покрита с термоизолационен и водонепропусклив материал. Количеството на възходящия воден ток се определя въз основа на изнесеното с него количество топлина – разходен елемент в баланса на топлинните потоци, насочени навътре и навън от загрявания участък на стъблото. Характерна за този метод е необходимостта от периодично преместване на сензора, при продължителни измервания, обусловена от нарастването на стъблото. При дебели стъбла се увеличават както размерите на сензора, така и мощността на нагряващата лента, а определянето на елементите на топлинния баланс е по-трудно. Ето защо в практиката методът на топлинния поток рядко се използа при стъбла с диаметър над 10-12 cm.

При метода на топлинния импулс нормата на транспирация се определя в зависимост от скоростта на кратък (1-2 s) топлинен импулс, пренасян от възходящия воден ток в ксилема на растенията. Топлинният импулс се създава от нагряваща сонда (игла от неръждаема стомана с вградена нагряваща жичка), инсталирана радиално в ствола на дървото. На разстояние от порядъка на 10-20 mm над нагряващата сонда радиално е инсталирана сензорна сонда – игла от неръждаема стомана с вградени по дължината й един или няколко термистори,

obtained with an excess of water in the soil (Bormann and Kozlowski, 1962; Clark et al., 2000; Fernández, 2017).

Methods of heat balance/puls

Heat is used as a tracer for estimation of the transpiration rate or, in other words, the upward sap flux in the plant xylem (Sakuratani, 1981; Smith and Allen, 1996; Green et al., 2003; Fernández, 2017).

With the stem heat-balance method, the xylem-water temperature is increased applying heat to the entire circumference of a stem section, typically a few centimeters long. A constant heat flux is provided by a semi-flexible heating band which is wrapped around the stem and enclosed in thermo-insulation and water-proof materials.

The sap flow is determined as a function of the heat uptake by the moving sap stream, which is a loss term in the stem heat balance. In long-term studies, the sensor positions must be periodically changed because of the stem growth.

In large stem sizes both the heater band and the energy requirements becomes too large, and the calculation of the heat-balance terms becomes difficult.

That is why, in the practice these methods are rarely used for stem diameters larger than 10-12 cm.

With the heat-pulse method, the sap flux is calculated by the velocity of a short (1-2 s) pulse of heat carried by the sap stream in the plant xylem. The pulse of heat is released from a heater probe (needle of stainless steel housing a resistance wire) installed radially into the stem. A sensor probe is installed above the heating one, at a distance of 10-20 mm. It is a needle of stainless steel housing one or several thermistors set at a distance of 8-15 mm.

разположени през 8-15 mm. Диаметърът на сондите е от порядъка на 1.5-2.0 mm, а дължината им и броят на вградените термистори? зависи от дебелината на проводящата дървесина. Скоростта, съответно количеството на възходящия воден ток в точките на измерване, се изчислява в зависимост от времето за достигане на топлинния импулс до съответния термистор. Нормата на транспирация се определя като интеграл на елементарните водни количества върху площта на напречното сечение на проводящата дървесина. Накрая нормата на транспирация се коригира за ефекта от съпътстващите процеси на разсейване на топлината при преноса й през стъбленатa матрицата от дървесни фибри, вода и газ. За отчитане на тези ефекти, на разстояние 5-10 mm под нагряващата сонда се инсталира втора сензорна сонда. В практиката за едно растение се използват четири комплекти сонди – по един за всеки квадрант от напречното сечение на стъблото. По разбираеми причини методът на топлинния импулс е приложим само при дървесните видове и при диаметър на ствола над 30 mm. Измерванията могат да бъдат напълно автоматизирани.

Измерване на листния тургор (ZIM-сонда)

Водният статус на растенията се определя в зависимост от тургора на листата. Това е автоматизиран безразрушителен метод, при който част от повърхността на лист, който не се отделя от растението, бива притисната между два кръгли магнита. За нивата на водния стрес се съди по разликата между индуцираното от магнитното поле налягане, върху зоната между магнитите и тургора (налягането на водата в клетките на листа), която е право пропорционална на водния стрес. Разликата в налягането се измерва чрез сензор, монтиран в единия от магнитите, а кабел осигурява преноса на данните към записващо устройство или радиопредавател. Разстоянието между магнитите (съответно силата на натиск) може да се регулира в зависимост от твърдостта и елас-

The heating probes are usually 1.8-2.0 mm in diameter; their length and the number of the thermistors depend on the thickness of the sapwood. The velocity, respectively the sap flux is determined by the time required for the sap stream to move the peak of the heat pulse from the heater to the respective thermistor.

The transpiration rate is calculated from the integral of the sap flux profile over the sapwood cross-sectional area. Finally, the transpiration rate is compensated for the dissipation of heat by conduction through the matrix of wood fibers, water and gas within the stem.

In order to account for these effects, a second sensor probe is installed 5-10 mm below the heating one. In practice, four sets of heat-pulse probes per tree are typically used to measure sap flow, one installed in each quadrant of the stem.

Because of practical reasons, the heat pulse method can be used on stems with diameters larger than 30 mm. The measurements can be fully automated.

Measuring the leaf turgor (ZIM-probe)

Plant water status is related to the leaf turgor. This is an automated non-destructive method. Part of the leaf surface is placed between two toric magnets and subjected to the magnetic-field-induced pressure.

The plant water stress is assumed to be proportional to the difference between the magnetic pressure and the turgor (the water pressure in the leaf cells). The pressure difference is measured by a sensor integrated in one of the magnets and connected by a cable to a data-logger or to a radio transmitter.

The distance between the magnets (respectively the pressing force) can be regulated for providing close contact

тичността на листа с оглед осигуряването на плътен контакт. Измерванията със ZIM-сонда са надеждни при добре и средно оводнени листа (Fernández et al., 2012; Zimmermann et al., 2013; Fernández, 2017).

according to leaf rigidity and elasticity. The ZIM probe works well with hydrated and moderately hydrated leaves (Fernández et al., 2012; Zimmermann et al., 2013; Fernández, 2017).

ИЗВОДИ

Особеност на всички, използващи водния статус на растенията, методи за управление на напояването е, че те директно определят нуждата от напояване, но не и размера на поливната норма. Ето защо тези методи трябва да се съчетават с определяне/измерване на водния статус на почвата или прилагането им да се предшества от калибриране, което да обвърже индикаторите на воден стрес с конкретните почвено-климатични условия.

Повечето от изброените методи позволяват висока честота и автоматизиране на измерванията, което ги прави подходящи за една информационно-съветваща система за управление на напояването, свеждаща в реално време информация и инструкции до мобилно устройство (напр. телефон) на производителя.

Предмет на допълнителна оптимизация е броят на сензорите на единица площ, така че да се гарантира необходимата представителност на измерванията.

CONCLUSIONS

Peculiarity of all methods involving plant water status in irrigation management is their ability to directly estimate the time for irrigation but not the water application rate. Therefore, the use of plant sensing methods have to be combined with estimation/measurement of the soil water status or preceded by calibration relating the water stress indicators to the specific soil and climatic conditions.

Most of the presented methods allow for a high frequency and automation of the measurements, which make them appropriate for an irrigation management information system bringing in real time information and instructions to the producer's mobile device (e.g. telephone).

Additionally, the number of the sensors per unit area has to be optimized in order to guarantee the needed representativeness of the measurements.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Bormann, F.H. and T.T. Kozlowski**, 1962. Measurement of tree growth with dial gauge dendrometers and vernier tree ring bands. *Ecology*, 43: 289-294.

2. **Boyer, J.S.**, 1995. Measuring the water status of plants and soils. Academic Press, San Diego, pp. 178.

3. **Clark, N.A., R.H. Wynne and D.L. Schmoldt**, 2000. A Review of Past Research on Dendrometers. *Forest Science*, 46(4), 570–576.

4. **Fernández, J.E.**, 2017, Plant-based methods for irrigation scheduling of woody crops, *Horticulturae*, 3(35), 37.

5. **Fernández, J.E., M.V. Cuevas, C.M. Rodriguez-Dominguez, A. Perez-Martin, J.M. Torres-Ruiz, S. Elsayed-Farag, A. Diaz-Espejo and M.J. Martín-Palomo**, 2012, Sap flow response to olive water stress: a comparative study with trunk diameter variations and leaf turgor pressure. *Acta Hortic.*, 951, 101-110.

6. **Green, S.R., B.E. Clothier and B. Jardine**, 2003. Theory and practical application of heat-pulse to measure sap flow. *Agron J*, 95: 1371-1379.

7. **Jackson, R.D.**, 1982. Canopy temperature and crop water stress. *Advances in Agronomy*, 1: 43-85.
8. **Jones, H.G.**, 2007. Monitoring plant and soil water status: established and novel methods revisited and their relevance to studies of drought tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 58(2), 119-130.
9. **Martin, E.C.**, 2001. Methods of determining when to irrigate. The University of Arizona Cooperative Extension, Arizona Water Series 30, pp. 7.
10. NEH 15-1. Chapter 1: Soil-Plant-Water Relationships, 1991, In Section 15: Irrigation, National Engineering Handbook, USDA-SCS, pp. 56
11. **Pearcy, R.W., E.-D. Schulze and R. Zimmermann**, 2000. Measurement of transpiration and leaf conductance. In Pearci, R.W., Ehleringer, J.R., Mooney, H,A., Rundel, P.W. eds, Plant Physiological Ecology, Kluwer Academic Publishers, pp. 137-160.
12. **Sakuratani, T.**, 1981. A heat balance method for measuring water flux in the stem of intact plants. *J. Agric. Meteorol.*, 37: 9-17.
13. **Scholander P.F., H.T. Hammel, E.D. Bradstreet and E.A. Hemmingsen**, 1965. Sap pressure in vascular plants. *Science*, 148: 339-346.
14. **Smith, D.M. and S.J. Allen**, 1996. Measurement of sap flow in plant stems. *Journal of Experimental Botany*, 47(305), 1833-1844.
15. UC-ANR Using the pressure chamber for irrigation management in walnut, almond, and prune, 2014, University of California ANR Publication 8503, pp. 27.
16. **Zimmermann, U., R. Bitter, P.E.R. Marchiori, S. Rüger, W. Ehrenberger, V.L. Sukhorukov, A. Schüttler and R.V. Ribeiro**, 2013. A non-invasive plant-based probe for continuous monitoring of water stress in real time: a new tool for irrigation scheduling and deeper insight into drought and salinity stress physiology. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 25(1), 2-11.

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2018, 21 (5), 182-192 ISSN 1311-0489 (Print)
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan ISSN 2367-8364 (Online)

Управление на напояването в трайни насаждения чрез определяне водния статус на почвата

Куман Куманов[1]*, Александър Матев[2], Георги Корнов[1], Даниела Германова[1]

[1]*Институт по овощарство, 4004 Пловдив, България*
[2]*Аграрарен университет, 4000 Пловдив, България*

Irrigation management in perennial crops by sensing the soil water status

Kouman Koumanov[1]*, Alexander Matev[2], Georgi Kornov[1], Daniela Germanova[1]

[1]*Fruit Growing Institute, 4004 Plovdiv, Bulgaria*
[2]*Agricultural University, 4000 Plovdiv, Bulgaria*
**E-mail: kskoumanov@hotmail.com*

Received: 08.05.2018 *Accepted:* 14.12.2018 *Published:* 21.12.2018

РЕЗЮМЕ

Управлението на поливния процес се основава на разнообразни методи за оценка на атмосферни, почвени и растителни параметри. Най-разпространените са свързаните с водния статус на почвата поради контролиращия ефект на почвената вода върху водния статус на растенията. *Субективното възприятие* при стискане и мачкане на почвена проба *с ръка* е вероятно най-старият и най-прост метод за определяне на почвената влажност. *Тегловно-термостатният метод* определя директно почвената влажност чрез проби, взети от избрани места и дълбочини в поливния участък и се използва за калибриране на индиректните методи. *Неутронният влагомер* е здрав и прецизен, а с един инструмент могат да се направят неограничен брой измервания на различни места и дълбочини, както и многократни измервания в една и съща точка. *Диелектричните методи (TDR, FDR)* се основават на връзка-

SUMMARY

The irrigation management is based on various methods for estimation of atmospheric, soil and plant characteristics. The most common ones are related to soil water status because of the soil-water controlling effect on the plant water status. The *feel and appearance* of soil when squeezed and pressed in hand is probably the oldest and the simplest method for soil moisture determination.

The *gravimetric method* directly determines the soil moisture of samples taken from predefined locations and depths in the irrigation plot; it is used, as well, for calibration of the indirect methods. The *neutron probe* is a robust and precise instrument which can be used for taking unlimited number of readings in different locations and depths, as well as for multiple readings in one and the same point. D*ielectric methods* (TDR, FDR) are based on the relationship between the

та между водното съдържание и диелектричната константа на почвата; сондите изискват плътен контакт между електродите и околната почва, и се нуждаят от по-сложно калибриране. *Тензиометрите* директно измерват матричния потенциал на почвата, но могат да бъдат използвани само в условия на висока почвена влажност. *Електросъпротивителните датчици* определят матричния потенциал на водата в почвата в по-голям диапазон от стойности като измерват електрическото съпротивление между два електрода, вградени в сензора; те са температурно зависими и неточни в засолени почви или при концентрирано внасяне на торове. *Методът на топлинното разсейване* се основава на връзката между топлинната проводимост на почвата и нейния воден потенциал; използват се датчици/блокчета от порьозен материал, в които са вградени източник на топлина и прецизен топлинен сензор. *Почвеният психрометър* определя водния потенциал на почвата в зависимост от измерената относителната влажност на въздуха в порьозна камера; необходимо е специално оборудване за привеждане на сензора в работно състояние и извършването на отчети. Предмет на допълнителна оптимизация е броят на сензорите на единица площ, така че да се гарантира необходимата представителност на измерванията.

Ключови думи: гравиметричен метод, неутронен влагомер, TDR, FDR, тензиометър, електросъпротивителен датчик, топлинното разсейване, психрометър

water content and the dielectric constant of the soil; the probes require immediate contact with the soil and soil specific calibration.

Tensiometers directly measure the matric potential of the soil water, but they can be used only in conditions of high soil water content. *Resistance blocks* determine the matric soil water potential in a larger range of values measuring the electrical resistance between two electrodes embedded in the sensor; they are temperature dependent and inaccurate under either high soil salinity or concentrated fertilizer application.

The *heat dissipation* method is based on the relationship between the heat conductivity of the soil and its water content; a thermal heat probe consists of a porous block containing a heat source and an accurate temperature sensor.

The *soil psychrometer* determines the matric soil water potential depending on the measured relative humidity of the air in a porous camera; specialized equipment is required for the sensor's excitation and reading.

The number of sensors per unit area is subject of additional optimization against the necessary representativeness of the measurements.

Key words: gravimetric method, neutron probe, TDR, FDR, tensiometer, resistance sensor, heat dissipation, psychrometer

УВОД

Овощните култури се развиват нормално и проявяват в максимална степен своите продуктивни възможности, ако са задоволени потребностите им от вода през цялата вегетация. Основни източници на вода за овощните растения са водният запас в почвата от

INTRODUCTION

Fruit crops grow normally and exhibit their maximum productive potential if the crop water requirements are met throughout the vegetation season. Water for the fruit plants is provided mainly by the storage accumulated in the soil prior to vegetation, rainfalls during the growing

предшестващи вегетацията валежи, вегетационните валежи и напояването. При един технологично издържан поливен режим графикът на поливките и размерът на поливните норми трябва да бъде съобразен с особеностите на културата и характеристиките на климата и почвата. Планирането и управлението на поливния процес се основава на разнообразни методи за оценка на атмосферни, почвени и растителни параметри (Boyer, 1995; NEH 15-1, 1991). Най-разпространените са свързаните с водния статус на почвата поради контролиращия ефект на почвената вода върху водния статус на растенията. Нещо повече, данните за водния режим на почвата се използват за калибриране на всички други методи за планиране и управление на напояването. Водният статус на почвата може да бъде характеризиран чрез почвената влажност (водно съдържание) или чрез потенциала (енергията) на почвената вода. По правило, измерващите водния потенциал инструменти могат да се калибрират и за определяне на почвената влажност.

Определяне на почвената влажност

Субективното възприятие при стискане и мачкане на почвена проба с ръка е вероятно най-старият и най-прост метод за определяне на почвената влажност. Точността на метода не е голяма и зависи от опита и индивидуалната преценка на поливача. При продължително практикуване грешката може да бъде сведена до 10-15% от действителната почвена важност (Klocke and Fischbach,1984; Niederholzer and Long, 1998; Storlie, 2004).

Тегловно-термостатният метод определя директно почвената влажност чрез проби, взети от избрани места и дълбочини в поливния участък. Масата на водата в почвената проба е разликата между масата на свежата почвена проба и масата на пробата

season, and irrigation.

The regime of irrigation is technologically consistent when both the timing of applications and the application rates conform with the crop specificity and the climate and soil characteristics. The irrigation scheduling and management are based on various methods for assessment of atmospheric, soil, and plant parameters (Boyer, 1995; NEH 15-1, 1991).

The commonest ones are related to soil water status because of the soil-water controlling effect on the plant water status. Moreover, the soil water regime data are used to calibrate all other methods of irrigation scheduling and management.

The soil water status can be characterized by either soil moisture (content) or soil-water potential (energy).

As a rule, the water-potential measuring instruments can be used for soil moisture estimation as well.

Soil moisture estimation

The feel and appearance of soil when squeezed and pressed in hand is probably the oldest and the simplest method for soil moisture determination. The accuracy of the method is not high; it depends on the experience and the individual judgment of the irrigator. After long practicing, the error can be reduced to 10-15% of the actual soil moisture (Klocke and Fischbach, 1984; Niederholzer and Long, 1998; Storlie, 2004).

The gravimetric method directly determines the soil moisture of samples taken from predefined locations and depths in the irrigation plot. The mass of the water in the soil sample is obtained by subtracting the mass of the dry sample (after drying it at 105°C till reaching

след изсушаване при 105°C до постоянна маса. Масата на водата се разделя на масата на сухата почвена проба, за да се получи тегловната почвената влажност. Обемната почвена влажност се получава като тегловната почвената влажност се умножи по обемната плътност на почвата. Предимствата на метода са, че е директен, еднакво надежден в целия диапазон от стойностите на почвената влажност, няма нужда от калибриране и е евтин. Методът се използва за калибриране на индиректните методи. Основен недостатък е невъзможността да се определи почвената влажност два пъти в една и съща точка (Itier et al., 1996; Pitts and Zazueta, 2001; Top and Ferré, 2002).

Неутронният влагомер измерва относително бързо и лесно почвената влажност. Състои се от две основни части – сонда със защитен екран и електронен блок. В сондата са вградени източник на бързи неутрони и детектор-брояч на бавни (термални) неутрони. По време на измерванията сондата се спуска на желаната дълбочина в почвата през предварително инсталирани обсадни тръби. Излъчените от източника бързи неутрони се разпръскват в следствие на множество хаотични сблъсъци с водородните атоми на водните молекули в почвата и губят енергия, превръщайки се в бавни неутрони. Детекторът брои бавните неутрони, а процесор преобразува суровите данни в брой за единица време. Чрез калибриране броят на бавните неутрони се преобразува в стойности на почвената влажност. При правилно използване неутронният влагомер е отлично средство за измерване на почвената влажност. Той е здрав и прецизен, детекторът обхваща сравнително голям почвен обем, което допринася за представителността на единичните измервания, и отчетите не се влияят от почвено засоляване. С един инструмент могат да се направят неограничен брой измервания на различни

constant readings) from the mass of the fresh sample. The gravimetric soil moisture is calculated dividing the mass of the water by the mass of the dry soil. The volumetric soil moisture is calculated multiplying the gravimetric soil moisture by the bulk density of the soil.

Advantages of the method: direct, equally reliable throughout the whole range of soil moisture values, cheap, and there is no need of calibration. The method is used for calibration of the indirect methods. The main disadvantage is its inability to estimate soil moisture twice in one and the same point (Itier et al., 1996; Pitts and Zazueta, 2001; Top and Ferré, 2002).

The neutron probe provides comparatively rapid and easy measurement of soil moisture. It consists of two main parts: the probe with a shield, and the electronic block. The probe contains a source of fast neutrons and a slow (thermalized) neutron detector/counter. During measurements, the probe is lowered to the desired depth in the soil inside a previously installed access tube. The fast neutrons emitted by the source are scattered through multiple chaotic collisions with the hydrogen nuclei in the soil water and loose energy turning into slow neutrons. The detector counts the slow neutrons and the microprocessor converts the row counts data into counts per unit of time.

After calibration, the counts of slow neutrons are converted into soil moisture values. When used correctly, the neutron probe is an excellent mean for measuring soil moisture. It is robust and precise, the detector ranges over relatively large soil volume which contributes to the representativeness of the single measurements, and the readings are not influenced by soil salinity.

One instrument can be used for taking unlimited number of readings in different

места и дълбочини, както и многократни измервания в една и съща точка. Работата с иструмента обаче не подлежи на автоматизиране. Приложението му се ограничава от факта, че съдържа източник на йонизиращо лъчение, изискващ лицензия за използването му и квалификация на оператора, както и от относително високата му цена (Hignett and Evett, 2002; and Bacchi et al., 2003).

Диелектричните методи се основават на връзката между водното съдържание и диелектричната константа на почвата (Ley et al, 1994; Ferré and Topp, 2002; Starr and Paltineanu, 2002; Evett, 2003; Topp et al., 2003; 2008). *Рефлектометрията във времевата област* (Time Domain Reflectometry, TDR) използва факта, че скоростта на разпространение на електромагнитен импулс (вълна) по дължината на метални електроди, забити в почвата, зависи от диелектричната константа на почвата, която се доминира предимно от диелектричната константа на водата (≈ 81), доколкото тези на въздуха (= 1) и минералната част (= 3 до 5) са много по-ниски. В началото на електродите се подава високочестотен импулс (0.6-1.2 GHz) и се измерва времето, за което сигналът изминава разстоянието до края на електрода и се връща обратно след отразяването му. *Рефлектометрията в честотната област* (Frequency Domain Reflectometry, FDR) измерва почвената влажност като функция на работната честота на електрическа верига, в която почвата се използва като диелектрична среда на кондензатор, представляващ инсталирани в почвата метални плочки или електроди. Най-често това е резонансна верига на високочестотен (5-150 MHz) транзисторен осцилатор. FDR сондите се произвеждат в различни варианти: преносими, постоянно инсталирани в почвата или спускани в обсадни тръби. TDR и FDR сондите изискват плътен контакт между електродите и околната почва, и

locations and depths, as well as for multiple readings in one and the same point. The measurement process, however, cannot be automated. The neutron probe application is complicated by the presence of a radiation source, which requires both a license to use and a qualified operator. Another limiting factor is the comparably high price (Hignett and Evett, 2002; and Bacchi et al., 2003).

The dielectric methods are based on the relationship between the soil water content and the dielectric constant of the soil (Ley et al, 1994; Ferré and Topp, 2002; Starr and Paltineanu, 2002; Evett, 2003; Topp et al., 2003; 2008). The *Time Domain Reflectometry* (TDR) makes use of the fact that the propagation velocity of an electromagnetic pulse (wave) along metal rods that are inserted into the soil depends on the soil dielectric constant, which is mainly dominated by the dielectric constant of the water (≈ 81), while those of the air (= 1) and soil minerals (= 3 to 5) are much lower.

After applying a high frequency pulse (0.6-1.2 GHz) at the beginning of the metal rods, the soil dielectric constant is estimated as a function of the time it takes for the electromagnetic pulse (wave) to propagate back and forth along the rods.

The *Frequency Domain Reflectometry* (FDR) estimates the soil moisture as a function of the operating frequency of an electrical circuit, in which the soil is used as a dielectric of a capacitor made of metal plates or rods embedded in the soil. Usually, this is a resonance circuit of a high-frequency (5-150 MHz) transistor oscillator.

The FDR probes are made in different variants: portable, permanently embedded in the soil or lowered into access tubes. TDR and FDR probes require immediate contact between the electrodes and the surrounding soil. They can yield

може да покажат съществени отклонения в измерванията при наличието на кухини и пукнатини, образувани по време на инсталирането или вследствие свиването на почвата при изсъхването ѝ. Единичното измерване обхваща малък почвен обем, а отчетите са температурно зависими и чувствителни към съдържанието на соли в почвения разтвор. Връзката между измерваните величини и водното съдържание не е линейна и зависи от почвения тип, което предполага едно по-сложно калибриране. Инструментите са сравнително скъпи поради сложната електроника.

Определяне потенциала на почвената вода

Тензиометрите измерват матричния потенциал на водата в почвата или, с други думи, смукателната сила, с която почвената матрица задържа водата, изразена чрез единици за налягане. Тензиометърът е цилиндрична тръба с вакуумметър в горната част и порьозен керамичен накрайник в долната. Керамичният накрайник пропуска вода и йони, но е непропусклив за въздуха. По този начин матричният потенциал на почвената вода се изравнява с този в пълното с вода тяло на тензиометъра, която го предава на вакуумметъра. Вместо вакуумметър може да се използва ръчнопреносим електронен преобразувател на налягане, който позволява да се правят отчети на неограничен брой тензиометри. Уредът е снабден с куха игла, която пробива тапата на тензиометъра и предава вакуума на чувствителната мембрана на преобразувателя. За целта под тапата на тензиометъра се осигурява малък обем въздух, който предотвратява директния контакт на иглата с водата. Работният диапазон на тензиометрите е от 0 до 850 HPa, т.е. те могат да бъдат използвани само в условия на висока почвена влажност. Обхванатият почвен обем е с радиус около 10 cm.

significant reading deviations in case of cavities and cracks formed either during their installation or by shrinking of the drying soil.

The sensing soil volume is relatively small; the measurements are temperature dependent and sensitive to high salt concentrations. The non-linear relationship between the sensor output signal and the soil moisture calibration require a more complicated and soil-specific calibration. The instruments are comparably expensive because of the sophisticated electronics.

Estimation of the soil water potential

Tensiometers measure the matric potential of the soil water or, in other words, the retentive force exerted upon the water by soil matrix, expressed in pressure units. The tensiometer is a cylindrical tube with a vacuometer at the upper end and a porous ceramic cup at the lower one. The ceramic cup is permeable to water and ions, but it is impermeable to air. Thus, the matrix potential of soil water is transmitted to the water filling the tensiometer body and, respectively, to the vacuometer.

The vacuometer can be substituted by a portable pressure transducer, which can read unlimited number of tensiometers. The instrument is equipped with a hollow needle, which punches the tensiometer's septum stopper and transmits the vacuum to the sensible membrane of the pressure transducer.

In order to prevent the direct contact of the needle with the water, a small volume of air has to be provided below the septum stopper. The tensiometers range of operation is from 0 to 850 HPa, i.e. they can be used only in the conditions of high soil water content. The sensing soil volume is with a radius of about 10 cm.

Почвеното засоляване не влияе върху точността на измерванията. Не се изисква специална квалификация на оператора. Възможни са многократни измервания в една точка от почвения обем и автоматизиране на измерванията. Тензиометрите се нуждаят от често обслужване и проявяват известна инерционност при реакцията им на промени в почвената влажност (Smajstra and Harrison, 1998; Young and Sisson, 2002; Storlie, 2004).

Електросъпротивителните дат-чици (гипсови блокчета и сензори от други хигроскопични материали) са просто, надеждно и евтино средство за измерване на матричния потенциал на водата в почвата или на почвената влажност. Измерването е индиректно – чрез електрическото съпротивление между два електрода, вградени в сензора, който от своя страна е заровен в почвата на желаната дълбочина. Тези датчици работят най-ефективно в посухия диапазон на почвената влажност, потенциал на водата над 33 KPa. В леки почви обаче отчетите могат да проявят известна инерционност при понижаване на почвената влажност, дължаща са на ретензионния ефект от пофините пори на сензорите. Те са температурно зависими и неточни в засолени почви или при концентрирано внасяне на торове, доколкото йоните на разтворените соли могат да повлияят на електрическото съпротивление (Martin, 2001; Scanlon et al, 2002; Van der Gulik, 2006).

Методът на топлинното разсейване се основава на връзката между топлинната проводимост на почвата и нейния воден потенциал. Използват се датчици/блокчета от порьозен материал, в които са вградени източник на топлина (нагревател) и прецизен топлинен сензор. След постигане на равновесие между стойностите на водния потенциал в блокчето и почвата, температурата на блокчето се отчита преди и след подаването на неколко-

The readings are not influenced by soil salinity. No special qualification of the operator is required. Tensiometer can take multiple readings in one and the same point and there is option for automation of the measurements. Tensiometers require frequent maintenance and their response time is relatively slow (Smajstra and Harrison, 1998; Young and Sisson, 2002; Storlie, 2004).

Resistance sensors (gypsum blocks and sensors of other hygroscopic materials) are simple, robust and cheap means for measuring either soil water potential or soil moisture.

The measurement is indirect, based electric resistance between two electrodes embedded in the sensor, which is buried in the soil at the desired depth.

These sensors are most efficient in the dry range of the soil moisture, water potential over 33 KPa. Because of their very slow reaction time, however, they do not work well in sandy soils, where soil water drains more quickly than the sensor can equilibrate. They are temperature dependent and inaccurate under either high soil salinity or concentrated fertilizer application, as far as the ions of the dissolved salts can affect the electrical resistance (Martin, 2001; Scanlon et al, 2002; Van der Gulik, 2006).

The heat dissipation method is based on the relationship between heat conductivity of the soil and its water potential. A thermal heat probe consists of a porous block containing a heat source and an accurate temperature sensor. After the water potential in the porous block is equilibrated with the soil water potential, the block temperature is measured before and after the application of a few-seconds heat pulse. The soil water potential is estimated as a function

секунден топлинен импулс. Водният потенциал на почвата се изчислява в зависимост от отчетената разлика в температурата на блокчето преди и след топлинния импулс. Уредът работи в диапазона 0.01-3.00 MPa като отчетите в интервала 1.00-3.00 MPa са с по малка прецизност. Обхванатият почвен обем е с радиус около 10 cm. Веднъж инсталирани, датчиците не се нуждаят от поддръжка. Отчетите не се влияят от почвеното засоляване. Процесът на измерване може да бъде автоматизиран. Измерванията обаче изискват сложна електроника. В леки почви отчетите могат да проявят известна инерционност при понижаване на почвената влажност, дължаща са на ретензионния ефект от по-финитe пори на блокчетата. Честите отчитания изискват сравнително висока мощност на захранването (Scanlon et al, 2002; Muñoz-Carpena, 2015).

Почвеният психрометър определя матричния воден потенциал на почвената вода в зависимост от измерената относителната влажност на въздуха в порьозна камера (датчик) при условието за постигнато равновесие между водния потенциал в стените на камерата и водния потенциал на почвата. Стените на камерата могат да бъдат керамични или мрежа от неръждаема стомана, когато солевите концентрации са високи. Физическа основа на метода е пряката връзка между водния потенциал в стените на камерата и наляганeто на водните пари във въздуха, което пък се изчислява от пада на температурата до точката на оросяване, измерен чрез няколко термодвойки. Уредът работи в диапазона 0.05-3.00 MPa като отчетите в интервала 1.00-3.00 MPa са с по малка прецизност. Датчикът е с висока чувствителност в условията на ниска почвена влажност, но при висока влажност точността му е по-ниска. Характеризира се с голяма инерционност поради бавнодостиганото равновесие на водните

of the difference between the temperatures in the sensor before and after the heat pulse application.

The water potential measurement range is 1.00-3.00 MPa, but readings in the interval 1.00-3.00 MPa are less precise. The sensing soil volume is with a radius of about 10 cm. Once installed, the sensors do not need maintenance. The readings are not affected by soil salinity.

There is option for automation of the measurements. However, measurements require sophisticated electronics. The sensors can show slow reaction time in light soils where soil water drains more quickly than the sensor can equilibrate.

The frequent readings require comparably large power consumption (Scanlon et al, 2002; Muñoz-Carpena, 2015).

The soil psychrometer estimates the matric soil water potential from the measured relative humidity of the air in a porous camera (sensor), on condition that the water potential in the camera walls is in equilibrium with the soil water potential.

The camera walls can be either ceramic or screen of stainless steel, in case of high salinity environments. Physical base of the method is the direct relation between the water potential in the camera walls and the vapor pressure in the air inside the camera, which, in turn, is calculated from the dew-point temperature depression measured by several thermocouple junctions.

The water potential measurement range is 0.05-3.00 MPa, but readings in the interval 1.00-3.00 MPa are less accurate. The sensor is highly sensitive when typical moisture conditions are very dry, but its accuracy is much lower in the wet range. It is characterized by a very slow reaction time, because reaching vapor equilibrium takes time.

пари. Необходимо е специално оборудване за привеждане на сензора в работно състояние и извършването на отчети (Andraski and Scanlon, 2002; Muñoz-Carpena, 2015).

Specialized equipment is required for the sensor's excitation and reading (Andraski and Scanlon, 2002; Muñoz-Carpena, 2015).

Общи бележки

Качествената оценка на някои от изброените инструменти за определяне водния статус на почвата е представена в Таблица 1. Крайната оценка е получена след изпитването им върху различни почвени типове и при различни поливни режими.

General notes

The qualitative evaluation of some of the discussed methods for soil water monitoring and the measurement tools is presented in Table 1. The final scores are obtained after tests on different soil types and under different irrigation regimes.

Таблица 1. Качествена оценка на някои от инструментите за измерване на почвената влажност; най-неблагоприятен резултат – 1, най-благоприятен – 10 (по Ley et al., 1994)

Table 1. Qualitative evaluation of some of the soil water monitoring devices; least favorable score – 1, most favorable score – 10 (after Ley et al., 1994)

Устройство / Device Критерий / Criterion	NP	TDR	GM	AP	AQ	TM	GB	WB
Цена Initial cost	3	1	8	2	7	8	8	8
Подготовка на измерването Field site setup requirements	7	3	10	3	10	7	6	6
Сложност на измерването Obtaining a routine reading	8	8	1	8	4	10	8	8
Интерпретиране на отчетите Interpretation of readings	10	10	10	10	3	5	3	5
Точност Accuracy	10	10	10	8	2	7	2	3
Поддръжка Maintenance	9	9	8	9	7	3	9	9
Специални изисквания Special considerations	2	8	5	8	9	7	5	8
Сумарна оценка Composite rating	**49**	**49**	**52**	**48**	**42**	**47**	**41**	**47**

NP – неутронен влагомер / neutron probe
TDR – Time Domain Reflectometry
GM – тегловно-термостатен метод / gravimetric method
AP – FDR (Troxler Sentry 200-AP)
AQ – FDR (Aquaterr Probe)
TM – тензиометър / tensiometer
GB – гипсово блокче (ел. съпрот.) / gypsum block (el. resistance)
WB – блокче Watermark (ел. съпрот.) / Watermark block (el. resistance)

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Andraski, B.J. and B.R. Scanlon**, 2002. Thermocouple psychrometry. In: Dane, J.H. and Top, G.C. eds., Methods of Soil Analysis: Part 4 Physical Methods, SSSA Book Series 5.4, Madison, WI: 609-642.
2. **Bacchi, O.O., K. Reichardt and M. Calvache**, 2003. Neutron and gamma probes: Their use in agronomy. IAEA Training Course Series No. 16, pp. 78.
3. **Boyer, J.S.**, 1995. Measuring the water status of plants and soils. Academic Press, San Diego, pp. 178.
4. **Evett, S.R.**, 2003. Measuring soil water by time domain reflectometry. In: Stewart, B.A., Terry A. Howell (eds.), Encyclopedia of Water Science, Marcel Dekker, Inc. New York, pp. 894-898.
5. **Ferré, P.A. and G.C. Topp**, 2002. Tme domain reflectometry. In: Dane, J.H. and Top, G.C. eds., Methods of Soil Analysis: Part 4 Physical Methods, SSSA Book Series 5.4, Madison, WI: 434-445.
6. **Hignett, C. and S. Evett**, Neutron thermalization. 2002. In: Dane, J.H. and Top, G.C. eds., Methods of Soil Analysis: Part 4 Physical Methods, SSSA Book Series 5.4, Madison, WI: 501-520.
7. **Itier B., F. Maraux, P. Ruelle and J.M. Deumie**, 1996. Applicability and limitations of irrigation scheduling methods and techniques. In: Irrigation Scheduling: From Theory to Practice, FAO Water Reports 8, pp. 13.
8. **Klocke, N.L. and P.E. Fischbach**, 1984. Estimating soil moisture by appearance and feel. Historical Materials from University of Nebraska-Lincoln Extension, pp. 9.
9. **Ley T.W., R.G. Stevens, R.R. Topielec and W.H. Neiblin**, 1994. Soil Water Monitoring & Management. USDA, PNW0475, pp. 5.
10. **Martin, E.C.**, 2001. Methods of determining when to irrigate. The University of Arizona Cooperative Extension, Arizona Water Series 30, pp. 7.
11. **Muñoz-Carpena, R.**, 2015. Field devices for monitoring soil water content. ABED BUL343, UF/IFAS Extension, pp. 15.
12. NEH 15-1. Chapter 1: Soil-Plant-Water Relationships. 1991. In Section 15: Irrigation, National Engineering Handbook, USDA-SCS, pp. 56.
13. **Niederholzer, F. and L. Long**, Simple irrigation scheduling using the “look and feel” method. 1998. Oregon State University Extension Service, EM 8716, pp. 1.
14. **Pitts D. and F. Zazueta**, 2001. Micro irrigation scheduling. SWFREC Report, pp. 17.
15. **Scanlon, B.R., , B.J. Andraski and J. Bilskie**, 2002. Miscellaneous methods for measuring matric. In: Dane, J.H. and Top, G.C. eds., Methods of Soil Analysis: Part 4 Physical Methods, SSSA Book Series 5.4, Madison, WI: 643-670.
16. **Smajstra, A.G. and D.S. Harrison**, 1998. Tensiometers for soil moisture measurement and irrigation schedulind. Circular 487, ABED-FCES, University of Florida, pp. 6.
17. **Starr, J.L. and I.C. Paltineanu**, 2002. Capacitance devices. In:Carter and Gregorich (eds.), Soil Sampling and Methos of Analysis. Canadian Society of Soil Science, CRC Press and Taylor & Francic Group, Oxford, UK, pp. 463-474.
18. **Storlie, C.A.**, 2004. Irrigation scheduling with tensiometers. FS 657, Rutgers Cooperative Research & Extension, The State University of New Jersey, pp. 4.
19. **Storlie, C.A.**, Irrigation scheduling with the field method. 2004. FS 658, Rutgers Cooperative Research & Extension, The State University of New Jersey, pp. 4.
20. **Topp, G.C., J.L. Davis and A.P. Annan**, 2003. The Early Development of TDR for Soil Measurements. *Vadose Zone Journal*, 2: 492-499.

21. **Topp, G.C. and P.A. Ferré**, 2002. Thermogravimetric method using convective oven-drying. In: Dane, J.H. and Top, G.C. eds., Methods of Soil Analysis: Part 4 Physical Methods, SSSA Book Series 5.4, Madison, WI: 422-424.
22. **Topp, G.C., G.W. Parkin and P.A. Ferré**, 2008. Soil water content. In:Carter and Gregorich (eds.), Soil Sampling and Methos of Analysis. Canadian Society of Soil Science, CRC Press and Taylor & Francic Group, Oxford, UK, pp. 939-962.
23. **Van der Gulik T.**, 2006. Irrigation scheduling techniques. BCMAL Water Conservation Factsheet, 577.100-1, pp. 5.
24. **Young, M.H. and J.Y. Sisson**, 2002. Tensiometry. In: J. Dane and Topp, C. (eds.), Methods of Soil Analysis, Part 4, SSSA Book Series: 5. Am. Soc. Agron., Madison, WI. pp. 575-609.

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2018, 21 (5), 193-206 ISSN 1311-0489 (Print)
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan ISSN 2367-8364 (Online)

Изследване на биохимичния състав и радикалоулавящата способност на сушени плодове от японска дюля (*Chaenomeles sp.)*

Теодора Михова[1]*, Петя Иванова[2], Диян Георгиев[1]

[1]*Институт по планинско животновъдство и земеделие, 5600 Троян, България*
[2]*Институт за изследване и развитие на харните, 4003 Пловдив, България*

Study on biochemical composition and antiradical capacity of dried fruits of Japanese quince (*Chaenomeles sp*.)

Teodora Mihova[1]*, Petya Ivanova[2], Diyan Georgiev[1]

[1]*Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, 5600 Troyan, Bulgaria*
[2]*Food Research and Development Institute, 4003 Plovdiv, Bulgaria*
**E-mail: teodora.mihova@gmail.com*

Received: 22.11.2018 *Accepted:* 04.12.2018 *Published:* 21.12.2018

РЕЗЮМЕ

Разработени са продукти – сушени плодове от различни генотипове японска дюля, отгледани и предоставени от Институт по планински животновъдство и земеделие, гр.Троян.

На подбраните форми хеномелес и сушените продукти е изследван биохимичният състав в лаборатория на Институт по планински животновъдство и земеделие, гр. Троян.

Технологичният процес сушене е проведен в термопомпен стенд за сушене, на тънък слой при напречно ориентиран въздушен поток, спрямо слоя продукт при температура 45±2°C и ниска относителна влажност на циркулиращия въздух (средно за процеса 10%). Общият антиоксидантен капацитет е оценен чрез определяне на радикалоулавящата способност (DPPH - тест) и съдържание на общи полифеноли на свежите плодове и

SUMMARY

Products were made, such as dried fruits of different genotypes of Japanese quince (*Chaenomeles* sp.) grown and provided by the Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan.

The biochemical composition of some selected genetic types of chaenomeles and their dried products was studied at the laboratory of the Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture in Troyan.

The technological drying process was carried out in a heat pumping stand for drying, on a thin layer with a crosswise air flow direction towards the layer of the product at a temperature of 45 ± 2°C and a low relative humidity of the circulating air (10% on average for the process). The total antioxidant capacity was assessed by determination of antiradical capacity (DPPH test) and total polyphenols content

сушените продукти в Институт за изследване и развитие на храните, гр. Пловдив.

Ключови думи: японска дюля, *Chaenomeles sp.*, сушени плодове, антиоксидантен капацитет, радикалоулавяща способност

of fresh fruit and dried products at the Food Research and Development Institute, Plovdiv.

Key words: Japanese quince, *Chaenomeles sp*., dried fruit, biochemical composition, antioxidant capacity, antiradical capacity

УВОД

Японската дюля (*Chaenomeles sp.*) наричана още ябълче, планински лимон е широко разпространено декоративно растение у нас. Освен с красиви цветове, хеномелесът привлича вниманието през есента със златисти ароматни плодове. В някои страни те намират приложение в хранителната индурстрия за преработки, поради високото си съдържание на биологично активни вещества: органични киселини, аскорбинова киселина, полифеноли, пектин, ароматни съединения (Lesinska et al., 2006). Съдържанието на витамин С в плодовете варира от 41,2 до 105,8 mg 100 g $^{-1}$, фенолните съединения варират от 523,9 до 1271,7 mg 100 g (Krasnova et al., 2007). Друго свойство от голям интерес е предполагаемият му висок антиоксидантен капацитет, дължащ се на съдържанието на витамин С и фенолни съединения. Съдържанието на витамин С е 45 до 109 mg 100 ml $^{-1}$ и фенолните съединения в сока на *Chaenomeles japonica* са 210-592 mg 100 ml $^{-1}$ (Hellin et al., 2003).

Сушенето е метод, който е приложен като начин за запазване на плодовете. Процесът включва различни варианти на приложение, за да се получи крайният продукт. Важен елемент в различните технологии за сушене е да се изследват промените в биохимичните състави на плодовете (Mezhenskii, 2004; Mondeshka, 2005; Graeme et al., 2007; Rupasova et al, 2008; Figueiredo, 2009; Zhu et al., 2012; Zhang et al., 2014). Сушените плодове под формата на прах са хранителна добавка, използвана за предотвратяване на атеросклероза и има антиоксидантно дей-

INTRODUCTION

Japanese quince (*Chaenomeles sp.*) is a widespread decorative plant in Bulgaria. Besides its beautiful blossoms, Chaenomeles attracts attention in autumn with its golden aromatic fruits.

In some countries, they are used in the food processing industry because of their high content of biologically active substances, such as organic acids, ascorbic acid, polyphenols, pectin, aromatic compounds (Lesinska et al., 2006). Vitamin C content in fruits varies from 41.2 to 105.8 mg 100 g $^{-1}$, phenolic compounds vary from 523.9 to 1271.7 mg 100 g (Krasnova et al., 2007).

Another property of great interest is its supposed high antioxidant capacity due to the content of vitamin C and phenolic compounds. Vitamin C content is 45 to 109 mg 100 ml $^{-1}$ and phenolic compounds in the juice of *Chaenomeles japonica* are 210-592 mg 100 ml $^{-1}$ (Hellin et al., 2003).

Drying is applied as a method to preserve fruits. The process involves different application variants to produce the final product. An important element in the different drying technologies is to study the changes in the biochemical compositions of fruits (Mezhenskii, 2004, Mondeshka, 2005, Graeme et al., 2007; Rupasova et al, 2008, Figueiredo, 2009, Zhu et al. Zhang et al., 2014).

Dried fruit in the form of a powder is a food supplement that prevents atherosclerosis and has an antioxidant effect, improves the health of the

ствие, подобрява здравословното състояние на организма (Tang et al., 2000; Dharmananda, 2005, Malgorzata et al, 2007; Tang et al., 2010).

Сушени плодове от *Chaenomeles sp.* се използват от хиляди години в китайската медицина и заема значителен обем в предписваните от тях рецепти (Chace and Zhang, 1997; Dharmananda, 2005; Sagar et al., 2010; Figueiredo, 2009). Растението успешно се прилага като средство за засилване на имунитета, ставни, чернодробни, при ракови и много други заболявания. Редица съвременни учени доказват ефикасността на плодовете от *Chaenomeles sp*. при лечението на туморни заболявания, СПИН, ревматоиден артрит и др. (Zhao et al., 2008; Graeme, 2007; Zhang et al**.,** 2014; Lim, 2012; Watychowicz et al., 2017).

Целта на настоящата публикация е да се изследва биохимичният състав и общият антиоксидантен капацитет, оценен чрез определяне на радикалоулавящата способност (DPPH - тест) и съдържание на общи полифеноли на свежи плодове и сушените продукти от японската дюля (*Chaenomeles japonica (Thunb.) Lindl. ex Spach*), в зависимост от формите на генотипа и начина на оглеждане на плодовете.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Суровини

Изследваните генотипове са безбодилести, отбрани от колекционни насаждения на ИПЖЗ-Троян. Разстоянията на засаждане са 1,5x2m. Условията на отглеждане са неполивни. Височината на храстите е до 150 cm. Добивите от проучваните форми са в границите от 2 до 5 kg, и средно тегло на плодовете 40-60 g.

Опитна постановка

Обект на настоящото изследване са 4 различни генотипа Японска дюля (*Chaenomeles japonica (Thunb.) Lindl. ex Spach* генотип 3p8h; генотип 2p2h ББД; генотип 4p9h Д и генотип 4p10h ББД.

organism (Tang et al., 2000, Dharmananda, 2005, Malgorzata et al, 2007, Tang et al., 2010).

Dried fruits of *Chaenomeles sp*. have been used for thousands of years in Chinese medicine and occupy a considerable amount of prescriptions (Chace and Zhang, 1997; Dharmananda, 2005; Sagar et al., 2010; Figueiredo, 2009). The plant is successfully used as a means to enhance immunity, for joint, liver, cancer, and many other diseases. A number of contemporary scientists prove the efficacy of *Chaenomeles sp.* fruit in the treatment of tumor diseases, AIDS, rheumatoid arthritis etc. (Zhao et al., 2008, Graeme, 2007, Zhang et al., 2014, Lim, 2012, Watychowicz et al., 2017).

The aim of the paper is to examine the biochemical results of the total antioxidant capacity, assessed by specifying the antiradical capacity (DPPH - test) and total polyphenols content of fresh and dried frruit of Japanese quince (*Chaenomeles japonica (Thunb.) Lindl. ex Spach)* depending on the forms of genotype and the cultivation methods for fruit growing.

MATERIAL AND METHODS

Raw fruit

The studied genetic types are thornless, picked out in the collection plantations of RIMSA, Troyan. The planting distance is 1.5x2m. The plantations are nonirrigated. The bush height is up to 150 cm. The yields of the studied forms are in the range of 2 to 5 kg, and the average fruit weight is 40-60 g.

Experimental design

The object of this study is four different genotypes of Japanese quince (*Chaenomeles japonica (Thunb.) Lindl. ex Spach* genotype 3p8h; genotype 2p2h BBD; genotype 4p9h D and genotype

Приетата форма на нарязване е напречно на филийки.

Предварителната подготовка на суровината е извършена в следната последователност: приемане → измиване с течаща вода → претегляне → нарязване → отцеждане → сушене.

Плодовете за изследване са изпитани в термопомпен стенд за сушене, в тънък слой при напречно ориентиран въздушен поток спрямо слоя продукт. Термопомпеното сушене протича при температура 45±2°C и ниска относителна влажност на циркулиращия въздух (средно за процеса 10%). За край на експеримента на сушене се приема достигане на постоянна маса на пробата. Пробите изсушени и охладени са опаковани в хартиени пликове. Съхранението се извършва при стайна температура в отсъствие на светлина.

Методи:

- Определяне на сухо вещество (тегловно), % - БДС EN 12143-00;
- сухо вещество (рефрактометрично), % - БДС 17257
- обща титруема киселинност, % - БДС 6996-93
- общи захари, % - БДС 7169-89
- определяне на аскорбинова киселина, mg % - БДС 11812-91
- Пектин, % - по метода на Мелитц
- Дъбилни вещества, % – по метода на Левентал-Найбауер

Подготовка на пробите за химични анализи

5 g от всеки вариант на получените проби сушени продукти са поставени в мерителна колба от 50 mL. Съдържанието на колбата е доведено до ~2/3 от обема с подкиселен (2300μL 37% HCl в 1L метанол) метанол. След престой от една нощ в хладилни условия (10°C), съдържанието на колбата е допълнено до марката. Получените метанолни екстракти са филтрувани през нагънат филтър и анализирани.

Всички измервания са извършени

4p10h BBD.

The fruit was sliced across.

Prepreparation of the raw material was done in the following order: accepting → washing with running water → weighing → cutting → draining → drying.

The fruits were tested in a heat pumping stand, in a thin layer, with a crosswise air flow direction towards the product layer. Heat-pumped drying takes place at a temperature of 45 ± 2°C and a low relative humidity of the circulating air (average for the process 10%). The constant sample weight is considered as the end of the drying experiment. Samples, after being dried and chilled, were packed in paper bags. They were stored at a room temperature in the absence of light.

Methods:

- Dry matter assessment (weight), % BDS EN 12143-00;
- dry matter (refractometrically), BDS 17257
- total titratable acidity, % - BDS 6996-93
- total sugars,% - BDS 7169-89
- ascorbic acid assessment, mg % - BDS 11812-91
- pectin, % according to the method of Melitz;
- tanning substances, % - according to Leventhal-Neubaurer.

Preparation of samples for chemical analysis

5 g of each sample of the dried samples obtained were placed in a 50 mL volumetric flask. The content of the flask were adjusted to ~ 2/3 of the volume with acidified (2300μL 37% HCl in 1L methanol) methanol. After staying overnight under refrigeration conditions (10 ° C), the content of the flask were added to the mark. The resulting methanol extracts were filtered through a folded filter and analyzed.

All measurements were performed

с UV-Vis спектрофотометър Helios Omega с инсталиран софтуер VISIONlite (Thermo Fisher Scientific, Madison, WI, USA), използвайки кювети с оптичен път 1 cm.

• **Определяне на общи полифеноли** - Съдържанието на общи полифеноли е определено по метода на Singleton and Rossi (1965) в следната модификация: в мерителна епруветка от 10 mL са отпипетирани последователно 0.1 mL екстракт, ~7 mL дестилирана вода, 0.5 mL FC-реактив (разреден 1:4 с дестилирана вода) и 1.5 mL 7.5% воден разтвор на натриев карбонат. След разклащане на епруветките, обемът е доведен с дестилирана вода до 10 mL. След престояване за 2 h в покой при стайна температура е измерена абсорбцията на реакционната смес при 750 nm. Аналогично е приготвена празна проба с използване на дестилирана вода вместо екстракт. Получените резултати са отчетени спрямо стандартна права и са представени като еквиваленти на галовата киселина (GAE) в mg за 100 g проба.

• **Определяне на общите антоциани** - Количеството на общите мономерни антоциани е определено чрез pH-диференциалния метод (Giusti and Wrolstad, 2001). Метанолният екстракт е разреден паралелно с буфер с pH 1.0 (0.025 M калиев хлорид) и буфер с pH 4.5 (0.4 M натриев ацетат). След престояване в покой за 1 h при стайна температура са измерени абсорбциите при 520 и 700 nm. Резултатите са изчислени чрез използване на коефициент на моларна абсорбция 26900 L/(mol cm) и молекулна маса 449.2 g/mol и са изразени като еквиваленти на цианидин-3-глюкозид (CGE) в mg на 100 g проба.

• **Определяне на общия антиоксидантен капацитет** - Общият антиоксидантен капацитет е оценен чрез определяне на радикалоулавящата способност (DPPH - тест). Trolox, водоразтворим аналог на витамин E, е

with a Helios Omega UV-Vis Spectrophotometer with VISIONlite software installed (Thermo Fisher Scientific, Madison, WI, USA) using 1 cm optical paths.

• **Total polyphenols assessment** - The content of total polyphenols was determined by the method of Singleton and Rossi (1965) in the following modification: 0.1 mL of extract, ~7 mL of distilled water, 0.5 mL of FC reagent (diluted 1: 4 with distilled water) and 1.5 mL of 7.5% aqueous sodium carbonate solution.

After shaking the test-tubes, the volume was brought to distilled water to 10 mL. After staying for 2 h at a room temperature, the absorption of the reaction mixture was measured at 750 nm. An analogous blank sample was prepared using distilled water instead of extract. The results obtained are reported in comparison with the standard straight line and are presented as GAE in mg per 100 g of sample.

• **Assessment of total anthocyanins** - The amount of total monomeric anthocyanins was determined by the pH-differential method (Giusti and Wrolstad, 2001). The methanolic extract was diluted in parallel with buffer pH 1.0 (0.025 M potassium chloride) and buffer pH 4.5 (0.4 M sodium acetate). After staying for 1 hour at room temperature without motion, the absorptions at 520 and 700 nm were measured. The results were calculated using a molar absorption coefficient of 26900 L / mole and a molecular weight of 449.2 g / mol and were expressed as cyanidine-3-glucoside (CGE) equivalents in mg per 100 g sample.

• **Total antioxidant capacity** - The total antioxidant capacity was assessed by the antiradical capacity (DPPH - test). Trolox, a water-soluble vitamin E analogue, was used as a standard and the results were expressed as Trolox

използван като стандарт и резултатите са изразени като еквиваленти на Trolox (TE) в μmol за 100 g проба.

DPPH-тест

Процедурата е базирана на метода на Brand-Williams et al. (1995), приложен в следната модификация: 2250 μL метанолен разтвор на DPPH (6 x 10-5 M) са смесени с 250 μL метанолен екстракт (разреден с дестилирана вода в съотношение 1:3, v/v); абсорбция-та при 515 nm е измерена след 15 min престояване на реакционната смес в затворена кювета на тъмно при стайна температура.

- **Математико-статистическа обработка**

Представените резултати са средноаритметични стойности от най-малко три паралелни определения, като коефициентите на вариация са по-малки от 5%. Статистическата обработка на данните е осъществена с програми ANOVA, Microsoft Excel.

equivalents (TE) in μmol per 100 g sample.

DPPH-test

The procedure is based on the method of Brand-Williams et al. (1995), applied in the following modification: 2250 μL of DPPH methanolic solution (6 x 10-5 M) were mixed with 250 μL of methanol extract (diluted with distilled water in a 1: 3 v / v ratio); the absoprtion at 515 nm was measured after 15 minutes of staying of the reaction mixture in a closed vessel in dark place at a room temperature.

- **Mathematical and statistical processing**

These results are arithmetic mean values of at least three parallel determinations, with coefficients of variation less than 5%. Statistical data processing was performed with ANOVA, Microsoft Excel programs.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

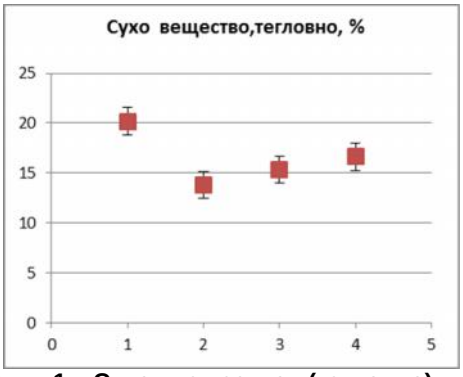
На Фигури от 1 до 16 са представени данните от проведените биохимични анализи и радикалоулавящата способност на пресни и сушени плодове от различни форми на японска дюля.

Биохимичната характеристика на плодовете от хеномелес, отглеждани в гр. Троян показва, че съдържанието на общите сухи вещества определени чрез тегловен метод е от 13,81% при плодове с номер 4р10 h до 20,20% при плодове с номер 3р8h. Стойностите са статистически различими при проба свежи плодове с номер 3р8h, спрямо останалите три форми на японска дюля (Фигури 1 и 2).

RESULTS AND DISCUSSION

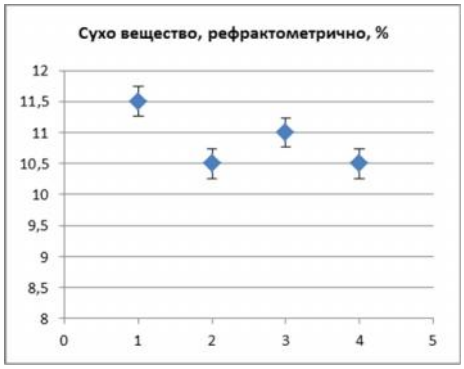
Figures 1 to 16 show the data from biochemical analyzes carried out and the antiradical capacity of fresh and dried fruits of different forms of Japanese quince.

The biochemical characteristics of Chaenomeles fruits grown in the town of Troyan shows that the total dry matter content determined by weighing method is 13.81% for fruits with number 4r10h to 20.20% for fruit with number 3p8h. The values are statistically identifiable in a 3p8h fresh fruit sample versus the other three forms of Japanese quince (Figures 1 and 2).



Фиг. 1. Сухо вещество (тегловно) на пресни плодове от японската дюля (*Chaenomeles japonica (Thunb.) Lindl. ex Spach*)

Fig.1. Dry matter (weight) of fresh fruit of Japanese quince (*Chaenomeles japonica (Thunb.) Lindl. ex Spach*)

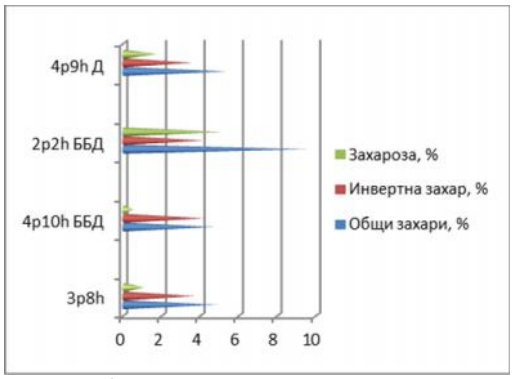


Фиг. 2. Сухо вещество (рефрактометрично) на пресни плодове от японската дюля (*Chaenomeles japonica (Thunb.) Lindl. ex Spach*)

Fig. 2. Dry matter (refractometrically) of fresh fruit of Japanese quince (*Chaenomeles japonica (Thunb.) Lindl. ex Spach*)

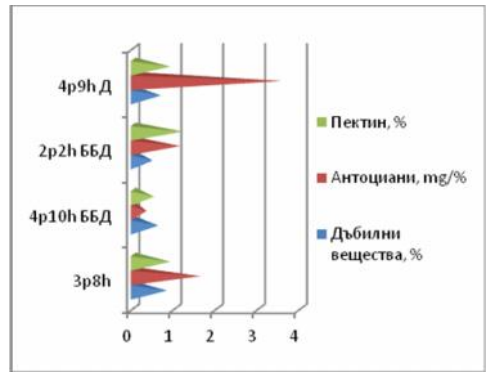
Общото съдържание на въглехидрати е най-високо при плодове с номер 2p2h (9,55%), при останалите плодове е ниско от 4,70 до 5,35%. Определеният процент на инвертна захар в плодовете е статистически неразличима при плодове с номера 2p2h и 4p10h и статистически различима при плодове с номера 3p8h със съдържание – 3,70%. Количеството захароза определено в плодовете е в големи разлики от 0,48% при плодове с номера 4p10h до 5,08% при плодове с номер 2p2h (Фигура 3).

The total carbohydrate content was highest in fruits with number 2p2h (9.55%), as it was lower than 4.70 to 5.35% for the other fruits. The percentage of invert sugar in fruit is statistically indistinguishable in fruit with numbers 2p2h and 4p10h and statistically distinct in fruit with number 3p8h with a content of 3,70%. The sucrose amount in fruits was in large variations of 0.48% for fruits with numbers 4r10h to 5.08% for fruit with number 2p2h (Figure 3).



Фиг. 3.Общи захари на пресни плодове от японската дюля (*Chaenomeles japonica (Thunb.) Lindl. ex Spach*)

Fig. 3. Total sugars of fresh fruit of Japanese quince (*Chaenomeles japonica (Thunb.) Lindl. ex Spach*)



Фиг. 4. Биологично активни вещества на пресни плодове от японската дюля (*Chaenomeles japonica (Thunb.) Lindl. ex Spach*)

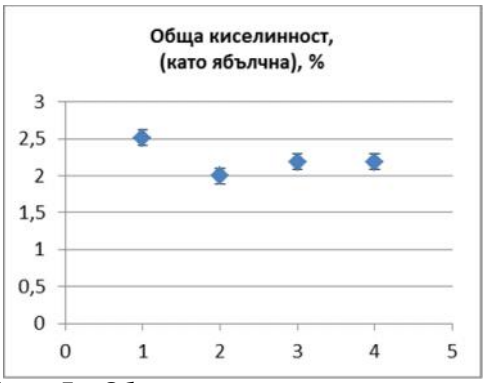
Fig. 4. Biological active substances of fresh fruit of Japanese quince (*Chaenomeles japonica (Thunb.) Lindl. ex Spach)*

Значително високо съдържание на органични киселини, определени като ябълчна (над 2 %) за всички изследвани плодове, прави плода неподходящ за консумация в прясно състояние (Фигура 5).

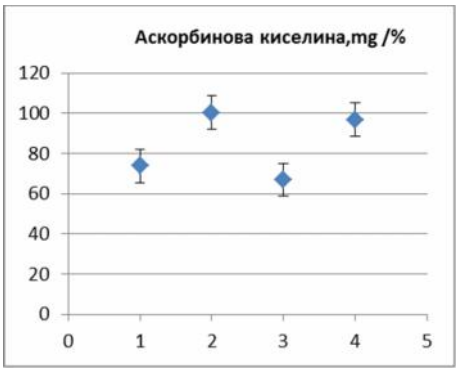
Пресните плодове с номера 3p8h и 4p9h са със статистически неразличими процентни съдържание на аскорбинова киселина, (88,00 mg%), но са с по-висока стойност в сравнение с останалите подбрани форми плодове 2p2h и 4p10h, чиято стойност е 52,00 mg% (Фигура 6).

Significantly high organic acid content, defined as malic (over 2%) for all fruit examined, makes the fruit unsuitable for fresh consumption (Figure 5).

Fresh fruit with numbers 3p8h and 4p9h had a statistically indistinguishable percentage of ascorbic acid (88.00 mg%) but the value is higher in comparison to the other selected fruits 2p2h and 4p10h with a value of 52.00 mg % (Figure 6).



Фиг. 5. Обща киселинност на пресни плодове от японската дюля (*Chaenomeles japonica (Thunb.) Lindl. ex Spach*)
Fig. 5. Total acidity of fresh fruit of Japanese quince (*Chaenomeles japonica (Thunb.) Lindl. ex Spach*)



Фиг. 6. Аскорбинова киселина на пресни плодове от японската дюля (*Chaenomeles japonica (Thunb.) Lindl. ex Spach*)
Fig. 6. Ascorbic acid of fresh fruit of Japanese quince (*Chaenomeles japonica (Thunb.) Lindl. ex Spach*)

Процентното съдържание на дъбилни вещества е високо и варира от 0,475% при плодове 2p2h до 0,810% при плодове с номер 3p8h, което придава тръпчивия вкус на плодовете. Данните са статистически различими, дължащи се на различията на формите на генотипа на плодовете (Фигура 4).

Пектиновите вещества определени в пресните плодове варират от 0,50 % при 4p10h до 1,20 % при плодове 2p2h, като при останалите две проби 3p8h и 4p9h процентното съдържание на пектини е статистически неразличимо 0,89 % (Фигура 5).

The percentage of tanning substances was high and ranged from 0.475% for fruits 2p2h to 0.810% for fruit with number 3p8h, which gives the tart flavour of fruit. Data are statistically significant due to the differences in the forms of the genotype of fruits (Figure 4).

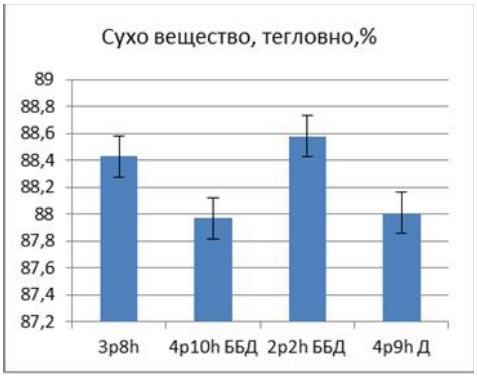
Pectin substances determined in the fresh fruits ranged from 0.50% at 4p10h to 1.20% in fruits 2p2h, while in the other two samples 3p8h and 4p9h the percentage of pectins was statistically indistinguishable 0.89% (Figure 5).

Установи се, че най-подходяща форма за сушене е на генотип от свежите плодове е 3p8h със съдържание на сухи водоразтворими вещества 11,5%, общи захари 4,85%, обща киселинност 2,51%, аскорбинова киселина 88,0 mg %, дъбилни вещества 0,81 %, пектинови вещества 0,89 %.

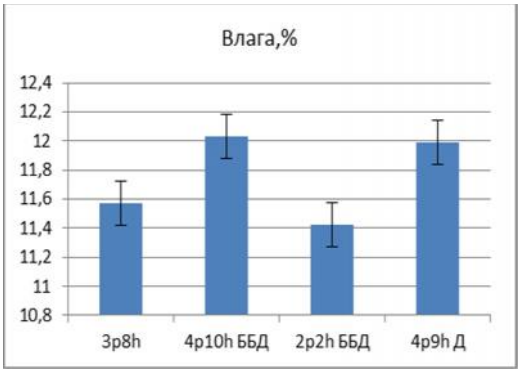
Измерената влага за всички проби е от порядъка на 11,4 до 12 %, като проба с номер 3p8h и 2p2hББД са със статистически не различими проценти, както и проби 4p10h ББД и 4p9h Д (p> 0,05). Аналогични са резултатите при определените тегловно сухи вещества (Фигура 7 и 8).

It has been found that the most suitable form for drying is a genotype 3p8h with a content of dry water-soluble matter of 11.5%, total sugars of 4.85%, total acidity of 2.51%, ascorbic acid 88.0 mg%, tanning substances 0.81%, pectin substances 0.89%.

The measured moisture for all samples ranged from 11.4 to 12%, with sample 3ss8h and 2p2hBBD having statistically non-detectable percentages, as well as samples 4p10h BBD and 4p9hD (p> 0.05). Similar results are given for dry matter weight (Figure 7 and 8).



Фиг. 7. Сухо вещество на сушени плодове от японската дюля (*Chaenomeles japonica (Thunb.) Lindl. ex Spach*)
Fig. 7. Dry matter of dried fruit of Japanese quince (*Chaenomeles japonica (Thunb.) Lindl. ex Spach*)



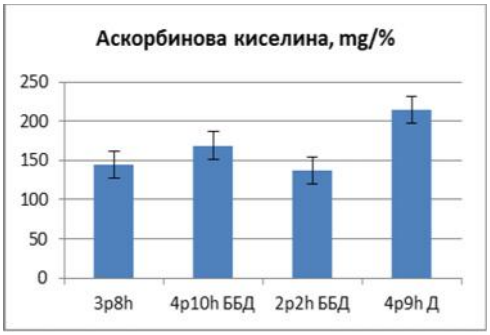
Фиг. 8. Влага на сушени плодове от японската дюля (*Chaenomeles japonica (Thunb.) Lindl. ex Spach*)
Fig. 8. Moisture in dried fruit of Japanese quince (*Chaenomeles japonica (Thunb.) Lindl. ex Spach*)

Анализираните показатели на обща киселинност и съдържание на аскорбинова киселина за всички проби са статистически неразличими и процесът на сушене не оказва влияние върху процентните съдържания (p>0,05) (Фигура 9 и 10).

The analyzes of total acidity and ascorbic acid content for all samples were statistically insignificant and the drying process had no effect on percentages (p>0.05) (Figure 9 and 10).

Фиг. 9. Обща киселинност на сушени плодове от японската дюля (*Chaenomeles japonica (Thunb.) Lindl. ex Spach*)

Fig. 9. Total acidity of dried fruit of Japanese quince (*Chaenomeles japonica (Thunb.) Lindl. ex Spach*)

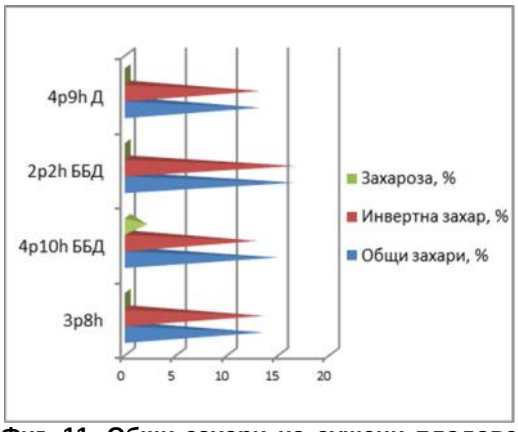


Фиг. 10. Аскорбинова киселина на сушени плодове от японската дюля (*Chaenomeles japonica (Thunb.) Lindl. ex Spach*)

Fig. 10. Ascorbic acid of dried fruit of Japanese quince (*Chaenomeles japonica (Thunb.) Lindl. ex Spach*)

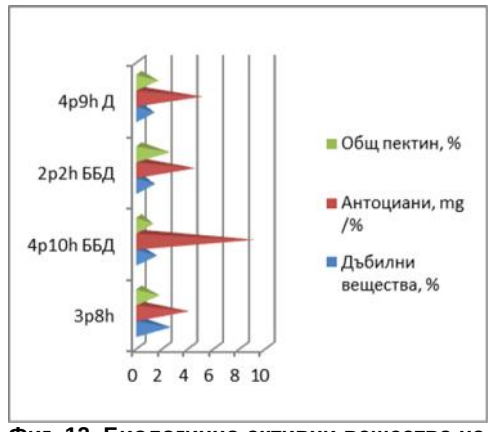
Съдържанието на общи захари, инвертна захар и общ пектин са с най-високи статистически различими стойности при сушените плодове с номер 2p2h ББД, в сравнение с останалите проби сушени плодове ($p<0,05$). Данните са представени на Фигури 11 и 12.

The total sugars, invert sugar and pectin content had the highest statistically distinct values for dried fruit with number 2p2h BBD, compared to other samples of dried fruit ($p<0.05$). Data are presented in Figures 11 and 12.



Фиг. 11. Общи захари на сушени плодове от японската дюля (*Chaenomeles japonica (Thunb.) Lindl. ex Spach*)

Fig. 11. Total sugars of dried fruit of Japanese quince (*Chaenomeles japonica (Thunb.) Lindl. ex Spach*)



Фиг. 12. Биологично активни вещества на сушени плодове от японската дюля (*Chaenomeles japonica (Thunb.) Lindl. ex Spach*)

Fig. 12. Biological active substances of dried fruit of Japanese quince (*Chaenomeles japonica (Thunb.) Lindl. ex Spach*)

Процентното съдържание на дъбилни вещества доминира в проби от плодове с номер 3p8h и след процеса на сушене ($p<0,05$). За останалите три

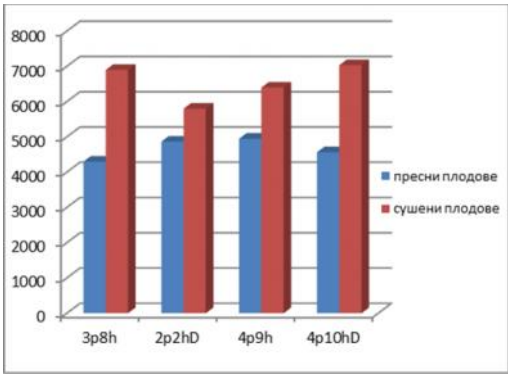
The percentage of tanning substances dominated in samples of fruit with number 3p8h and after the drying process ($p<0.05$). For the other three

проби резултатите по този показател са статистически неразличими (p>0,05).

Определената радикалоулавящата способност за всички анализирани проби е с по-високи стойности, в сравнение с пресните плодове поради по-високото съдържание на сухи вещества, в резултат на процеса сушене и не се дължи на съдържанието на общите полифеноли (Фигури 13 и 14).

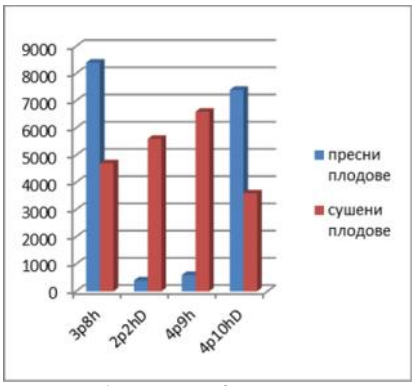
samples, the results were statistically indistinguishable (p>0.05).

Antiradical capacity for all analyzed samples was higher than fresh fruit due to the higher dry matter content resulting from the drying process and was not due to the content of total polyphenols (Figures 13 and 14).



Фиг. 13. Радикалоулавяща способност на пресни и сушени плодове от японската дюля (*Chaenomeles Japonica (Thunb.) Lindl. ex Spach*)

Fig. 13. Antiradical activity of fresh and dried fruit of Japanese quince (*Chaenomeles Japonica (Thunb.) Lindl. ex Spach*)



Фиг. 14. Общи полифеноли на пресни и сушени плодове от японската дюля (*Chaenomeles Japonica (Thunb.) Lindl. ex Spach*)

Fig. 14. Total polyphenols of fresh and dried fruit of Japanese quince (*Chaenomeles Japonica (Thunb.) Lindl. ex Spach*)

С най-висока радикалоулавяща способност са сушените плодове с номера 4p10hББД, следвани от плодове 3p8h, а с най-ниска стойност в резултат на процеса сушене са плодовете с номер 2p2hББД.

Данните са статистически различими дължащи се на технологичния процес сушене (p<0,05).

В резултат на приложения технологичен режим на сушене, съдържанието на общи полифеноли намалява от 1,7 при проби с номер 3p8h до 2 пъти при сушени плодове с номер 4p10h D. С най-високи съдържания на общи полифеноли са сушени плодове с номера 4p9h, следвани от плодове с номер 2p2h D. Данните са статистически различими, дължащи се на приложения технологичен процес – сушене (p<0,05).

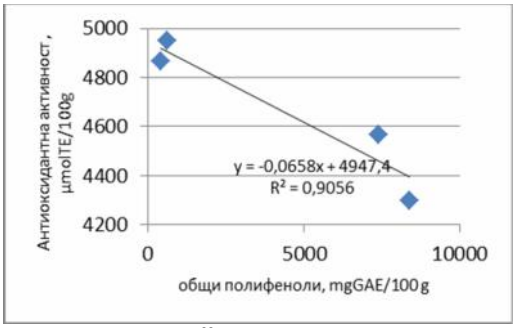
Dried fruits with number 4p10hBBD, followed by 3p8h had the highest antiradical capacity, while fruit with number 2p2hBBD had the lowest value as a result of the drying process.

Data are statistically significant due to the drying process (p<0.05).

As a result of the applied drying regime, the total polyphenols content decreased from 1.7 for samples with number 3p8h to 2 times for dried fruit with number 4p10h D. The highest contents of total polyphenols had dried fruits with number 4p9h, followed by fruits with number 2p2h D. Data are statistically significant due to the applied technological process, i.e. drying (p<0.05).

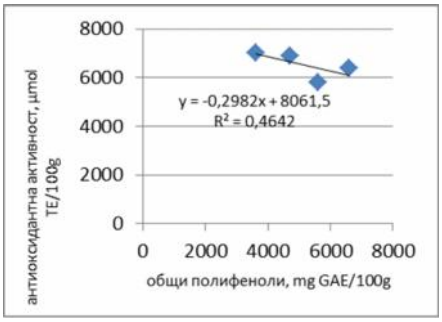
Установена е отрицателна линейна зависимост, с по-висок коефициент на детерминация R^2 = 0,9056, между антиоксидантната активност и съдържанието на общи полифеноли при пресните плодове, в сравнение с анализираните сушени проби (Фигури 15 и 16).

Negative linear dependence, with a higher determination coefficient R^2 = 0.9056, was found between the antioxidant activity and the total polyphenols content in fresh fruit as compared to the analyzed dried samples (Figures 15 and 16).



Фиг. 15. Линейна зависимост между съдържание на общи полифеноли и антиоксидантна активност на пресни плодове от японската дюля (*Chaenomeles japonica (Thunb.) Lindl. ex Spach*)

Fig. 15. Linear dependence between content of total polyphenols and antiradical activity of fresh fruit of Japanese quince (*Chaenomeles japonica (Thunb.) Lindl. ex Spach*)



Фиг. 16. Линейна зависимост между съдържание на общи полифеноли и антиоксидантна активност на сушени плодове от японската дюля (*Chaenomeles japonica (Thunb.) Lindl. ex Spach*)

Fig. 16. Linear dependence between content of total polyphenols and antiradical activity of dried fruit of Japanese quince (*Chaenomeles japonica (Thunb.) Lindl. ex Spach*)

ИЗВОДИ

Проследява се ефектът от процеса на сушене върху отделните биохимични параметри и радикалоулавящата способност на пресни и сушени плодове при различни форми на японска дюля.

Значително високо съдържание на органични киселини, дъбилни вещества за всички изследвани плодове прави плода неподходящ за консумация в прясно състояние.

След процеса на сушене, количеството на аскорбиновата киселина се запазва по-добре в плодовете на генотип 4p9h и 3p8h.

С най-висока радикалоулавяща способност са сушените плодове с номера 4p10hББД, следвани от плодове 3p8h, а с най-ниска стойност в резултат

CONCLUSIONS

The effect of drying process on individual biochemical parameters and antiradical capacity of fresh and dried fruit in different forms of Japanese quince is observed.

Significantly high levels of organic acids, tanning substances for all tested fruits make the fruit unsuitable for fresh consumption.

After the drying process, the amount of ascorbic acid was better preserved in fruits of genotype 4p9h and 3p8h.

Dried fruits with number 4p10hBBD had the highest antiradical capacity, followed by 3p8h fruit, while fruits with number 2p2hBBD had the lowest value as

на процеса сушене са плодовете с номер 2p2hББД.

Генотип 3p8h със съдържание на сухи водоразтворими вещества 11,5%, общи захари 4,85%, обща киселинност 2,51%, аскорбинова киселина 88,0 mg %, дъбилни вещества 0,81 %, пектинови вещества 0,89 % е най-подходящ за сушене.

a result of the drying process.

Genotype 3p8h is suitable for drying with a content of dry water-soluble matter of 11.5%, total sugars of 4.85%, total acidity of 2.51%, ascorbic acid 88.0 mg%, tannins 0.81%, pectin substances 0.89%.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Chace, C. and T. Zhang**, 1997. A Qin Bowei Anthology. Paradigm Publications, Brookline, MA.
2. **Dharmananda, S.**, 2005. *Chaenomeles* A Relaxing and Strengthening Fruit.
3. **Figueiredo, G.**, 2009. Estabelecimento *in vitro* de marmeleiro japonas (Chaenomeles sinensis Koehne) CV Andramig. Universidade Federal de Pelotas.
4. **Graeme E.**, 2007. The Health Benefits of Traditional Chinese Plant Medicines: Weighing the scientific evidence. pp. 38-39.
5. **Hellin, P., R. Vila, M. Jordan, J. Laencina, K. Rumpunen and J. Ros**, 2003. Characteristics and composition of *Chaenomeles* fruit juice. I/In: Japanese quince - Potential fruit crop for Northern Europe. Sid./p. 127-139. Department of Crop Science, Swedish University of Agricultural Sciences ISBN 91-631-3765-8
6. **Krasnova, I., S. Ruisa and D. Seglina**, 2007. Investigations of the Biochemical Composition of Chaenomeles japonica fruits. *Chemine Technologija*, Kaunas, 4(46), 16-20.
7. **Lesinska, E., R. Przybylski and N. Eskin**, 1988. Some volatile and non volatile flavor components of the dwarf quince (*Chaenomeles japonica*). *Journal of Food Science*. Vol. 53, 854-856.
8. **Lim, T.K.**, 2012. Chaenomeles speciosa. In: Lim T.K. (ed) Edible medicinal and non-medicinal plants. Vol. 4, Fruits. New York, Springer.
9. **Malgorzata, S., S. Gorlach, A. Podsedek, D. Sosnowska, M. Koziolkiewicz, Z. Hrabec and E. Hrabec**, 2007. Procyanidin Oligomers from Japanese Quince (*Chaenomeles japonica*) Fruit Inhibit Activity of MMP-2 and MMP-9 Metalloproteinases. *J. Agric. Food Chem.*, 55(16), 6447-6452.
10. **Mezhenskii, V.**, 2004. Storage and use of a collection of non-traditional fruit crops. Chaenomeles (Chaenomeles Lindl.) Genetic plant resources, №1.
11. **Mondeshka, P.**, 2005. Medicinal fruit species. Sofia. Bulgaria (Bg).
12. **Rupasova, Zh., I. Garanovich, T. Vasilevskaya, N. Varavina and R. Rudakovskaya**, 2008. Comparative assessment of new varieties introduced forms of *Chaenomeles maulei* (Mast.) C. K. Schneid. According to accumulation of organic acids and carbohydrates in fruits in the conditions of Belarus. National Academy of Sciences of Belarus. Series of Agrarian Sciences, № 1.
13. **Sagar, V. and P. Suresh Kumar**, 2010. Recent advances in drying and dehydration of fruits and vegetables: a review. *J Food Sci Technol.,* 47(1), 15-26.
14. **Tang, C., Z. Ye, Z. Xiang, Y. Shi and Sh. Ren**, 2000. Nutrients of Chinese flowering quince and its functions. Natural Product Research and Development, vol.4.
15. **Tang, Y., X. Yu, M. Mi, J. Zhao, J. Wang and T. Zhang**, 2010. Antioxidative property and antiatherosclerotic effects of the powder processed from Chaenomeles speciosa in apoe mice. *Journal of Food Biochemistry*, 34(3), 535-548.

16. **Watychowicz, K., K. Janda, K. Jakubczyk and J. Wolska**, 2017. *Chaenomeles* – health promoting benefits. *Rocz Panstw Zakl Hig*, 68(3), 217-227.
17. **Zhang, S., L. Han, H. Zhang and H. Xin**, 2014. Chaenomeles speciosa: a review of chemistry and pharmacology. *Bioscience Reports*, 2(1), 12-18.
18. **Zhu, Q., C. Liao and Y. Liu**, 2012. Ethanolic extract and water-soluble polysaccharide from Chaenomeles speciosa fruit modulate lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW264.7 macrophage cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 144(2), 441-447.