Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2020, 23 (3), 195-203
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan
ISSN 1311-0489 (Print)
ISSN 2367-8364 (Online)

Влияние на мозаечния вирус върху някои характеристики на плодовете на високохрастовидна боровинка сорт "Дюк"

Дарко Йевремович*, Светлана А. Паунович, Александър Лепосавич

Изследователски институт по овощарство, "Краля Петра I" 9, 32000 Чачак, Република Сърбия

Influence of Blueberry Mosaic Associated Virus on Some Fruit Traits of Highbush Blueberry 'Duke'

Darko Jevremović*, Svetlana A. Paunović, Aleksandar Leposavić

Fruit Research Institute, Kralja Petra I 9, 32000 Čačak, Republic of Serbia
**E-mail: darkoj@ftn.kg.ac.rs*

Original scientific paper

РЕЗЮМЕ

Мозаечният вирус по боровинката е описан преди няколко десетилетия, но вирусната природа на заболяването е потвърдена наскоро. Причинителят на заболяването е мозаечният вирус по боровинката (BlMaV), род *Ophiovirus*. BlMaV причинява листни петна и ярко жълти, зелени и розови до червени мозаечни шарки в заразените храсти. Симптомите обикновено се появяват на няколко листа или покриват целия храст, но инфекцията може да е латентна в продължение на няколко години. BlMaV е потвърден на две места в Сърбия при сортове „Дюк", „Блукроб" и „Голдтрауб". Целта на настоящото проучване е да се оцени влиянието на BlMaV върху някои плодови характеристики на висококачествена боровинка „Дюк".

Опитът е проведен през 2019 г. в местност Будожела, Западна Сърбия в овощна градина с потвърденото присъствие на BlMaV. Въз основа на резултатите от RT-PCR анализа са избра-

SUMMARY

Blueberry mosaic has been described several decades ago, but the viral nature of the disease was confirmed recently. The causal agent of the disease is blueberry mosaic associated virus (BlMaV), genus *Ophiovirus*. BlMaV induce leaf mottling and bright yellow, green, and pink to red mosaic patterns in infected bushes.

Symptoms usually appear on several leaves or cover the entire bush, but the infection may be latent for several years.

BlMaV was confirmed in two locations in Serbia in varieties 'Duke', 'Bluecrop' and 'Goldtraub'. The aim of this study was to evaluate the influence of BlMaV on some fruit traits of highbush blueberry 'Duke'.

The trial was conducted in 2019 in locality Budoželja, West Serbia in the orchard with the confirmed BlMaV presence.

Based on the results of RT-PCR analysis,

ни три групи от боровинки „Дюк“: Без зараза BlMaV, BlMaV инфектирани – мозаечни симптоми присъстват само на няколко листа, и BlMaV инфектирани - мозаечни симптоми върху целия храст. Изследвано е влиянието на BlMaV върху помологични променливи (дължина, ширина и височина на плодовете, форма, тегло на плодовете и съдържание на разтворими сухи вещества).

Резултатите показват, че BlMaV не оказва статистически значимо въздействие върху нито една от изследваните плодови характеристики. В момента се извършва оценка на влиянието на вируса върху състава на хранителни и биоактивни съединения.

Ключови думи: боровинка, BlMaV, RT-PCR, помологични характеристики, статистически анализ

three groups of blueberry ‘Duke’ bushes were selected: BlMaV-free, BlMaV infected – mosaic symptoms present on only several leaves, and BlMaV infected – mosaic symptoms on entire bush. The influence of BlMaV on pomological variables (fruit length, width and height, shape, fruit weight, and soluble solids content) was examined.

The results showed that BlMaV did not have statistically significant impact on any of the examined fruit traits. The evaluation of virus influence on the composition of nutritive and bioactive compounds is underway.

Key words: Blueberry, BlMaV, RT-PCR, pomological traits, statistical analysis

УВОД

Смяташе се, че мозаечният вирус има генетичен произход до доклада на Varney (1957), който показва нейната вирусна етиология. В продължение на десетилетия имаше няколко опита за пречистване на вирусни частици от заразена тъкан и изследването им с помощта на електронна микроскопия (Ramsdell and Stretch, 1987). Thekke-Veetil et al. (2014) откриха нов вирус по боровинката, комбинирайки традиционни методи и следващо поколение последователност наречен мозаечен вирус (BlMaV). В заразените растения, BlMaV индуцира листни петна и светлозелени, жълти, розови и тъмночервени мозаечни шарки. Освен това, инфекцията може да е латентна в продължение на няколко години. Присъствието на BlMaV е официално потвърдено в Съединените щати, Канада, Япония, Словения и Турция, но симптомите на мозайката по боровинката са посочени от много други страни. BlMaV е открит в Сърбия на две различни места в сортове "Блукроп", "Голдтрауб" и "Дюк" (Jevremović et al., 2015; Jevremović et al., 2016).

INTRODUCTION

Blueberry mosaic disease was thought to be of genetic origin until the report of Varney (1957) that showed its virus etiology. For a decades, there were several attempts to purify virus particles from infected tissue and to examine them using electronic microscopy (Ramsdell and Stretch, 1987). Combining traditional methods and next generation sequencing Thekke-Veetil et al. (2014) detected a new virus in symptomatic plants tentatively named blueberry mosaic associated virus (BlMaV) in blueberry plants with mosaic symptoms. In infected plants BlMaV induces leaf mottle and light green, yellow, pink and dark red mosaic patterns. Also, the infection may be latent for several years.

BlMaV presence was officially confirmed in the United States, Canada, Japan, Slovenia and Turkey, but the blueberry mosaic symptoms were reported in many other countries. BlMaV was detected in Serbia in two distinct locations in varieties ‘Bluecrop’, ‘Goldtraub’ and ‘Duke’ (Jevremović et al., 2015; Jevremović et al., 2016).

Highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) is one of the most valued small fruit crop in the world. Because of the nutritional value of the fruits, the production of blueberries is in the constant increase. More than 70% of highbush blueberries are produced in the United States, Canada and Chile. Sustained growth of production is evident in Asia (namely China), Europe and South America. The first introduction of highbush blueberries in Serbia was during 1970s, but the production was unnoticeable.

The second, more successful introduction started 15 years ago. Today, blueberries are grown on at least 1,000 hectares across the country.

Orchards are planted with the imported planting material. More than 15 varieties are present in the orchards, from standard to the most recently released. Blueberry 'Duke', that is one of the most economically important variety in the world, is the most prevalent variety in the orchards in Serbia. It was bred in the United States and introduced into the production in 1986 (Retamales and Hancock, 2018). Fruits are medium to large sized, uniform, medium colored, firm, of sweet-acid aroma and taste.

The aim of our study was to evaluate the influence of blueberry mosaic associated virus on some fruit traits of highbush blueberry 'Duke' in a commercial orchard.

MATERIAL AND METHODS

Material

The trial was carried out in 2019 in an orchard in locality Budoželja, Ivanjica (43° 32.262'N 20° 16.568'E) at the altitude 652 m above the sea level. The presence of BlMaV in this orchard was reported in earlier studies (Jevremović et al., 2015, Jevremović et al., 2016). Blueberries are grown at 2.5 x 1.5 m spacing according to the integrate pest and disease

Високохрастовидната боровинка (*Vaccinium corymbosum* L.) е една от най-ценените дребни плодови култури в света. Поради хранителната стойност на плодовете, производството на боровинки постоянно се увеличава. Повече от 70% от високохрастовидните боровинки се произвеждат в САЩ, Канада и Чили. Устойчивият растеж на производството е очевиден в Азия (а именно Китай), Европа и Южна Америка. Първото внасяне на високохрастовидна боровинка в Сърбия е през 70-те години на миналия век, но производството е незабележимо. Второто, по-успешно въвеждане започна преди 15 години. Понастоящем, боровинките се отглеждат на поне 1000 хектара в цялата страна.

Овощните градини се засаждат с внесения посадъчен материал. В овощните градини присъстват над 15 сорта, от стандартните до най-скоро внесените. Високохрастовидна боровинка сорт "Дюк", който е един от икономически най-важните сортове в света, е най-разпространеният в овощните градини на Сърбия. Размножен е в САЩ и въведен в производството през 1986 г. (Retamales and Hancock, 2018). Плодовете са средни до големи по размер, еднакви, равномерно оцветени, твърди, със сладко-кисел аромат и вкус.

Целта на нашето изследване е да се оцени влиянието на мозаечния вирус върху някои плодови характеристики на високохрастовидна боровинка "Дюк" в промишлена овощна градина.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Материал

Опитът е проведен през 2019 г. в овощна градина в местността Будожеля, Иваница (43° 32.262'N 20°16.568'E) на надморска височина 652 m. Наличието на BlMaV в тази овощна градина е посочено в по-ранни проучвания (Jevremović et al., 2015, Jevremović et al., 2016). Боровинките се отглеждат на разстояние 2,5 x 1,5 m според интегри-

раната система за борба с вредителите и болестите.

Опитът включва 15 растения, които са избрани на случаен принцип в овощната градина. Всички растения са разделени в 3 групи/варианти: 5 растения с мозаечна симптоматика върху целия храст (1-инфектиран); 5 растения с леки симптоми на няколко листа (2-заразени); и 5 растения без симптоми (3-здрави).

Обратна транскрипция и полимеразна верижна реакция

Наличието на BlMaV в избраните храсти се изследва с помощта на обратна транскрипция и полимеразна верижна реакция (RT-PCR). Общите нуклеинови киселини (TNA) се екстрахират чрез модифициран CTAB метод (Li et al., 2008). Обратната транскрипция се извършва на два етапа с произволни хексамери и Maxima Reverse Transcriptase (Thermo Scientific, САЩ). PCR се прави със специфични BlMaV праймери, амплифициращи фрагмента от RNA3 на BlMaV генома (Thekke-Veetil et al., 2014). PCR продуктите са анализирани чрез 1,5% електрофореза с агарозен гел, оцветяване с етидиев бромид и визуализирани в Gel Doc EZ System (Biorad laboratories, САЩ).

За да се изключи влиянието на други вируси върху изследваните характеристики, всички растения също са тествани за наличие на други икономически важни вируси. За наличието на blueberry shock virus (BlShV), blueberry mottle virus (BlMoV), blueberry scorch virus (BlScV), blueberry shoestring virus (BSSV), tomato ringspot virus (ToRSV), tobacco ringspot virus (TRSV) and peach rosette mosaic virus (PRMV) растения са тествани чрез тест ELISA съгласно протоколите на производителите (Agdia Inc., САЩ и BIOREBA AG, Швейцария). PCR анализът е проведен на растенията за наличие на blueberry red ringspot virus (BRRV).

management system.

The trial included 15 plants that were randomly selected in the orchard. All plants were divided into 3 groups/variants: 5 plants with mosaic symptoms on entire bush (1-infected); 5 plants with slight symptoms on several leaves (2-infected); and 5 plants without symptoms (3-healthy).

Reverse transcription and polymerase chain reaction

The presence of BlMaV in the selected bushes was investigated using reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR). Total nucleic acids (TNA) were extracted with a modified CTAB method (Li et al., 2008). Reverse transcription was performed in two steps with random hexamers and Maxima Reverse Transcriptase (Thermo Scientific, USA). PCR was done with specific BlMaV primers amplifying the fragment from RNA3 of the BlMaV genome (Thekke-Veetil et al., 2014). PCR products were analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis, ethidium bromide staining and visualized in Gel Doc EZ System (Biorad laboratories, USA).

To exclude the possible effect of other viruses on examined traits, all plants were also tested on the presence on other economically important viruses. For the presence of blueberry shock virus (BlShV), blueberry mottle virus (BlMoV), blueberry scorch virus (BlScV), blueberry shoestring virus (BSSV), tomato ringspot virus (ToRSV), tobacco ringspot virus (TRSV) and peach rosette mosaic virus (PRMV) plants were tested by ELISA test according to manufacturers' protocols (Agdia Inc., USA and BIOREBA AG, Switzerland). PCR assay was performed to test the plants on the presence of blueberry red ringspot virus (BRRV).

Характеристики на плодовете

Плодове от избрани растения са набрани ръчно през средата на юли в оптималния етап на зрялост за този сорт. Същите са взети от 15 растения (5 растения от всеки вариант; 20 плодчета от всяко растение). Общо са събрани и измерени 300 плода. Размерите на плодовете (дължина, ширина и височина) са определени с дигитален шублер (Carl Roth, Германия). Индексът за форма на плода е определен като съотношение между средна височина и средна широчина. Теглото на плодовете се измерва с дигитална везна XL-1810 (Denver instruments, USA).

Съдържанието на сухи вещества (SSC, °Brix) в плодовете се определя от проба на плодов сок с цифров рефрактометър MA871 (Milwaukee, USA) при 20°C. SCC е определен при 25 плода от всеки вариант. За калибриране на рефрактометъра е използвана дестилирана вода.

Статистически анализ

Получените данни са анализирани чрез еднофакторен дисперсионен анализ (ANOVA) със софтуерна програма CoStat, версия 6.311 (CoHort Software, Monterey, CA, USA). Разликите между вариантите са тествани за значимост с помощта на теста на Дънкан. Тестовете се считат за значими при $p<0.01$.

Fruit traits

Fruits from selected plants were hand-picked during middle July in the optimal maturity stage for this variety. Fruits were picked from 15 plants (5 plants per each variant; 20 fruits per each plant). In total, 300 fruits were picked and measured. Fruit dimensions (fruit length, width and height) were determined with digital caliper (Carl Roth, Germany).

Fruit shape index was given as the ratio of mean height to mean width. Fruit weight was measured with a digital balance XL-1810 (Denver instruments, USA).

The soluble solids content (SSC, °Brix) of the fruits was determined in a sample of fruit juice with a digital brix MA871 refractometer (Milwaukee, USA) at 20°C. SCC was determined in 25 fruits from each variant. Distilled water was used for refractometer calibration.

Statistical analysis

Obtained data was analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) with CoStat software program, version 6.311 (CoHort Software, Monterey, CA, USA). Differences between variants were tested for significance by means of Duncan's multi-range tests. Tests were considered significant at $p < 0.01$.

РЕЗУЛТАТИ

Резултатите от RT-PCR анализа потвърдиха наличието на BlMaV в 10 симптоматични растения (Фигури 1 и 2) и отсъствието на вируса в 5 растения без симптоми. Други вируси не бяха открити в анализираните растения.

RESULTS

Results of the RT-PCR analysis confirmed the BlMaV presence in 10 symptomatic plants (Figures 1 and 2), and the absence of the virus in 5 plants without symptoms. Other viruses were not detected in the analyzed plants.

Фиг. 1. Плодове и листа от растения със силни симптоми на мозайка предизвикана от BlMaV (вариант 1)
Fig. 1. Fruits and leaves from the plants with severe mosaic symptoms induced by BlMaV (variant 1)

Фиг. 2. Плодове и листа от растения със слаби симптоми на мозайка предизвикана от BlMaV (вариант 2)
Fig. 2. Fruits and leaves from the plants with slight mosaic symptoms induced by BlMaV (variant 2)

Общият брой от 100 плода от вариант са набрани ръчно при оптимална зрялост и са измерени в лабораторията. Резултатите от изследваните физически свойства (дължина, ширина и

A total number of 100 fruits per variant were hand-picked in optimal maturity and measured in the laboratory. Results of the investigated physical properties (fruit length, width, and height

височина на плода и индекс за форма на плода) са представени в Таблица 1.

and fruit shape index) of the fruits are given in Table 1.

Таблица 1. Дължина, широчина, височина и индекс на форма на плода, съдържание на разтворими сухи вещества в заразени с BlMaV и здрави растения

Table 1. Fruit length, width, height, fruit shape index, and soluble solids content in BlMaV infected and healthy plants

Характеристика/Trait	Варианти/Variants		
	1-заразено/1-Infected	2-заразени/2-Infected	3-здрави/3-Healthy
Дължина/Fruit length (mm)	16.69±0.54 a	16.67±0,17 a	16.59±0.38 a
Широчина/Fruit width (mm)	16.28±0.53 a	16.30±0.14 a	16.23±0.49 a
Височина/Fruit height (mm)	12.26±0.15 a	12.09±0.24 a	12.24±0.17 a
Индекс на форма на плода Fruit shape index	1.02±0.003 a	1.02±0.007 a	1.02±0.01 a
Тегло/Fruit weight (g)	2.02±0.17 a	2.05±0.06 a	2.05±0.14 a
Разтворими сухи вещества Soluble solids content (°Brix)	12.90±1.23 a	12.16±0.87 a	13.02±0.34 a

Няма статистически значими разлики между средните стойности обозначени с една и съща буква във вариантите според тест на Дънкан $p < 0.01$.

No statistically significant differences between averages denoted with the same letter in variants by Duncan's multi-range test at $p < 0.01$.

Статистическата оценка на получените резултати чрез ANOVA показа, че BlMaV не оказва значимо влияние върху физичните свойства на плодовете на сорт "Дюк" (p <0.01).

Анализът потвърди, че BlMaV инфекцията намалява SSC в плодовете на заразените растения с мозаечна симптоматика от 0,93–6,60% (Таблица 1). Това увеличение няма значимо въздействие (p<0.01).

Statistical evaluation of the obtained results in ANOVA showed that BlMaV had no significant effect on the physical properties of 'Duke' fruits ($p < 0.01$).

The analysis confirmed that BlMaV infection decreased SSC in fruits on infected plants with mosaic symptoms from 0.93−6.60% (Table 1). This increase was with no significant effect ($p < 0.01$).

ОБСЪЖДАНЕ

Изследването на вирусните заболявания по боровинките в Сърбия е започнало преди 15 години в Изследователски институт по овощарство в Чачак. Мозаечният вирус по боровинката, е открит в Сърбия на две отдалечени места в три разновидности. BRRV е намерен на едно място и след това е унищожен (Jevremović et al., 2018). Няма други вируси по боровинките в Сърбия. Поради факта, че сорт „Дюк" има най-голям дял в овощните градини и най-голям брой заразени растения, целта на нашата работа бе да проучим влиянието на BlMaV върху неговите плодове.

В зависимост от интензивността

DISCUSSION

The investigation on blueberry virus diseases in Serbia has begun 15 years ago at the Fruit Research Institute in Čačak. Blueberry mosaic associated virus was detected in Serbia on two distant locations in three varieties. BRRV was found in one location and afterwards eradicated (Jevremović et al., 2018). Other viruses infecting blueberries are not present in Serbia. Due to the fact that variety 'Duke' has a largest share in the orchards and the highest number of infected plants, the aim of our work was to examine the impact of the BlMaV on its fruits.

Depending on the intensity of

на инфекцията, мозайката може да присъства на целия храст или да се локализира на няколко листа или клонки. BlMaV е открит и при асимптоматични растения (Thekke-Veetil et al., 2014). Информацията за влиянието на инфекцията от мозаечен вирус върху свойствата на плодовете и добива на боровинката е оскъдна. Материалите от литературата сочат, че мозаечният вирус намалява добива, качеството на плодовете и влияе върху периода на зреене на боровинките (Ramsdell and Stretch, 1987). Caruso and Ramsdell (1995) отчитат 15% загуби на реколтата при сорт "Блукроп". След откриване на BlMaV в овощната градина, където се проведе настоящето изследване, по време на визуални наблюдения не са установени промени в периода на зреене на плодовете от заразени и здрави растения (непубликувани резултати).

Резултатите, получени в настоящото проучване, показват, че BlMaV не оказва никакво влияние върху размера на плодовете. Плодовете по заразените храсти, както по растенията с тежка мозайка, така и по растенията със симптоми на няколко листа, се развиват нормално. Нямаше разлика в нито един от трите измерени размера на плодовете между изследваните варианти. Теглото на плодовете е в границите 2,02-2,05 g, което потвърждава разликата между вариантите.

Съдържанието на разтворими сухи вещества в заразените плодове е малко по-ниско (12,90 и 12,16 ° Brix) в сравнение със здравите плодове (13,02 °Brix). Това намаление беше без статистически ефект (p <0.01). Съдържанието на SSC е важен параметър за качество на пресните плодове и определя момента на зреене на реколтата.

ИЗВОДИ

Резултатите от настоящето изследване показват, че вирусът BlMaV не оказва статистически значимо влияние върху дължината, ширината, висо-

infection, mosaic may be present on entire bush or localized on few leaves or branches.

BlMaV was also detected in asymptomatic plants (Thekke-Veetil et al., 2014). The information on the influence of the blueberry mosaic infection on the fruit properties and yield is scarce. Reports from the literature suggested that blueberry mosaic disease reduced yield, fruit quality and influenced on the ripening time of the fruits (Ramsdell and Stretch, 1987). Caruso and Ramsdell (1995) reported 15% crop losses in variety ‘Bluecrop’. After BlMaV detection in the orchard where we conducted our study, during visual inspections we did not observed changes in the ripening time of the fruits from infected and healthy plants (unpublished results).

Results obtained in our study showed that BlMaV did not have any impact on the fruit size. Fruits on infected bushes, both on the plants with severe mosaic and on the plants with symptoms on several leaves, were normally developed.

There were no differences in any of the three measured fruit dimensions between the examined variants. Fruit weight was within the range 2.02−2.05 g confirming no difference between variants.

Soluble solids content in the infected fruits was slight lower (12.90 and 12.16 °Brix) compared to the healthy fruits (13.02 °Brix). This decrease was without statistical effect (p < 0.01). SSC content is an important quality parameter of fresh fruit and determines the moment of maturity for harvest.

CONCLUSIONS

The results of our study showed that BlMaV did not have statistically significant impact on the fruit length, width, height, fruit shape index and

чината, индекса за форма на плода и съдържанието на разтворими сухи вещества в плодове на сорт "Дюк". Лекото понижение на съдържанието на разтворими сухи вещества в заразени с BlMaV плодове не е оказало статистически значим ефект. В момента се извършва оценка на влиянието на вируса върху състава на хранителните и биоактивните съединения.

soluble solids content in 'Duke' fruits.

The slight decrease of soluble solids content in BlMaV infected fruits was with no statistically significant effect.

The influence of the virus on the composition of nutritive and bioactive compounds is underway.

БЛАГОДАРНОСТИ

Представеното проучване бе подкрепено от Министерството на образованието, науката и технологичното развитие на Република Сърбия, договор 451-03-68/2020-14/200215

ACKNOWLEDGEMENTS

Presented study was supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia, contract 451-03-68/2020-14/200215

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Caruso F. L. and D. C. Ramsdell**, 1995. Compendium of Blueberry and Cranberry Disease. Disease compendium series. APS Press, St Paul, USA.
2. **Jevremović, D., Leposavić, A. and S. Paunović**, 2015. First Report of Blueberry Mosaic-associated Virus in Highbush Blueberry in Serbia. *Journal of Plant Pathology,* 97, 541.
3. **Jevremović, D., Leposavić, A. and S. Paunović**, 2016. Incidence of Viruses in Highbush Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) in Serbia. *Pesticidi i fitomedicina*, 31, 45-50.
4. **Jevremović, D., Leposavić, A. and A. S. Paunović**, 2018. Production of Highbush Blueberry Nuclear Stock in Serbia. *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans,* 21(5), 207-213.
5. **Li, R., Mock, R., Huang, Q., Abad, J., Hartung, J. and G. Kinard**, 2008. A Reliable and Inexpensive Method of Nucleic Acid Extraction for the PCR-based Detection of Diverse Plant Pathogens. *Journal of Virological Methods,* 154, 48-55.
6. **Ramsdell, D. C. and A. W. Stretch**, 1987. Blueberry Mosaic. In: Virus Diseases of Small Fruits. (R. H. Converse, ed). Agriculture Handbook, USDA Washington, D.C., USA, pp. 119-120.
7. **Retamales, J. B. and J. F. Hancock**, 2018. Blueberries, 2nd edition. Cabi, Glasgow, UK.
8. **Thekke-Veetil, T., Ho, T., Keller, K. E., Martin, R. R. and I. E. Tzanetakis**, 2014. A New Ophiovirus is Associated with Blueberry Mosaic Disease. *Virus Research,* 189, 92-96.
9. **Varney, E. H.**, 1957. Mosaic and Shoestring Virus Diseases of Cultivated Blueberry in New Jersey. *Phytopathology*, 47: 307-309.

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2020, 23 (3), 204-217
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan
ISSN 1311-0489 (Print)
ISSN 2367-8364 (Online)

Влияние на различни концентрации цитокинини /zeatin и 2-iP/ върху *in vitro* размножаване на диви боровинки

Мария Георгиева[1]*, Диян Георгиев[1], Деница Христова[1], Виолета Кондакова[2], Илиян Баджаков[2], Атанас Павлов[3,4]

[1]*Институт по планинско животновъдство и земеделие, Троян, Селскостопанска академия, София, България*
[2]*АгроБиоИнститут, София, Селскостопанска академия, София, България*
[3]*Университет по хранителни технологии, Пловдив, България*
[4]*Институт по микробиология, Пловдив, България*

Impact of Different Concentrations of Cytokinins /Zeatin and 2-iP/ on *in vitro* Propagation of Wild Species of Genus *Vaccinium*

Maria Georgieva[1]*, Diyan Georgiev[1], Denitsa Hristova[1], Violeta Kondakova[2], Ilian Badjakov[2], Atanas Pavlov[3,4]

[1]*Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan, Agricultural Academy, Sofia, Bulgaria*
[2]*AgroBioInstitute, Sofia, Agricultural Academy, Sofia, Bulgaria*
[3]*University of Food Technologies, Plovdiv, Bulgaria*
[4]*Institute of Microbiology, Plovdiv, Bulgaria*
**E-mail: mariageo@gamail.com*

Original scientific paper

РЕЗЮМЕ

Настоящото проучване е фокусирано върху оптимизация на някои от параметрите на микроразмножителния процес при диви червени и черни боровинки, с произход Троянския балкан, местност Беклеме. Изпитани са 17 варианта на модифицирана WPM среда (McCown and Lloyd, 1981), с различни концентрации на zeatin, 2-iP, casein hydrolisate и pH (zeatin 2-3,5 mg/l; 2-iP 1,5-3,5 mg/l; casein hydrolisate 150-250 mg/l и pH 4,3-4,8).

Най-високи стойности на микроразмножителния коефициент при

SUMMARY

The present study is focused on the optimization of some of the parameters of the micropropagation process in lingonberry and bilberry, originating in the Troyan Balkan, Bekleme area. 17 variants of modified WPM medium were tested (McCown and Lloyd, 1981), with different concentrations of zeatin, 2-iP, casein hydrolysate and pH (zeatin 2-3.5 mg/l; 2-iP 1.5-3.5 mg/l; casein hydrolyzate 150-250 mg/l and pH 4.3-4.8).

The highest values of the micropropagation coefficient in lingonberry -

червените боровинки – 4,4 бр./експлант са установени на хранителна среда М4, обогатена с 3,5 mg/l zeatin, 1,5 mg/l 2-iP и 250 mg/l casein hydrolisate, а при черните – 2,8 бр./експлант на М5 модифицирана среда (2,0 mg/l zeatin, 3,5 mg/l 2-iP и 250 mg/l casein hydrolisate).

Най-голяма средна дължина на издънките при червените боровинки е отчетена на среда М17 – 4,2 cm (2,75 mg/l zeatin, 2,5 mg/l 2-iP и 200 mg/l casein hydrolisate). Най-добри резултати относно дължината на издънките при черните боровинки – 1,6 cm е наблюдавана на вариант М4 (3,5 mg/l zeatin, 1,5 mg/l 2-iP и 250 mg/l casein hydrolisate).

Изпитани са 9 варианта с варирващи концентрации на ауксин IAA /0,5 mg/l; 0,75 mg/l; 1,0 mg/l/ и редуцирана наполовина солева концентрация на основната среда (WPM). Дивите видове боровинки (червени и черни) са вкоренени успешно при концентрация на ауксин 0,5-1,0 mg/l и myo-inositol 250-500 mg/l.

Ключови думи: дива червена боровинка, дива черна боровинка, микроразмножаване, тъканни култури, 2-iP, zeatin, IAA, casein hydrolisate

Съкращения: WPM, zeatin – зеатин, 2-iP – две ип, IAA – индолил оцетна киселина, IBA – индолил маслена киселина, CH – казеин хидролизат, MI – миоинозитол

4.4 pcs./explant were put on nutrient medium M4, enriched with 3.5 mg/l zeatin, 1.5 mg/l 2-iP and 250 mg/l casein hydrolysate, and for bilberry - 2.8 pcs/explant of M5 modified medium (2.0 mg/l zeatin, 3.5 mg/l 2-iP and 250 mg/l casein hydrolysate).

The largest average length of shoots in lingonberry was reported on medium M17 - 4.2 cm (2.75 mg/l zeatin, 2.5 mg/l 2-iP and 200 mg/l casein hydrolysate). The best results regarding the length of shoots in bilberry - 1.6 cm was observed in variant M4 (3.5 mg/l zeatin, 1.5 mg/l 2-iP and 250 mg/l casein hydrolysate).

Nine variants with varying concentrations of auxin IAA /0.5 mg/l were tested; 0.75 mg/l; 1.0 mg/l/ and reduced by half the basic medium salt concentration (WPM). Wild blueberry species (lingonberry and bilberry) were successfully rooted at a concentration of auxin 0.5-1.0 mg/l and myo-inositol 250-500 mg/l.

Key words: lingonberry, bilberry, micropropagation, tissue culture, 2-iP, zeatin, IAA, casein hydrolysate

Abbreviation: Woody Plant Medium (WPM), zeatin (4-Hydroxy -3-methylbut-2-enylamino) purine, 2iP (N^6 - isopentenyladenine), IAA (Indole-3-acetic acid), IBA (indole-3-butyric) acid), CH - casein hydrolysate, MI - myo-inositol

УВОД

Дивите червени и черни боровинки, като представители на флората на България, представляват интерес за науката, поради изключително ценния им биохимичен състав и заради техните диетични и лечебни качества, които са били известни на хората още от дълбока древност.

Съществуват многобройни съобщения за здравните ползи от съдържащите се биоактивни компоненти като общи феноли, флавоноиди, антоциани

INTRODUCTION

Lingonberry and bilberry, as representatives of the flora of Bulgaria, are of interest to science because of their extremely valuable biochemical composition and because of their dietary and healing properties, which have been known to humans since ancient times.

There are numerous reports on the health benefits of bioactive components, such as total phenols, flavonoids, anthocyanins etc. in their fruits and

и др. в плодовете и в листата им, на които се дължат противораковите, противовъзпалителните и антидиабетни им свойства (Jaakola et al. 2001; Wang et al., 2005; Battino et al. 2009; Lätti et al., 2011). В света боровинковите плодове са известни още и с названието „супер плод“.

Растителните клетъчни, тъканни и органни култури са използвани като алтернативен инструмент за изучаване на биологичните и физиологични особености на дивите представители, с цел приложението им в селекционни програми и хранителна промишленост (Kalf and Dufour, 1997; Nikolaeva-Glomb, 2014).

Освен това, прилагането на метода на тъканните култури при дивите боровинки би било полезно за тяхното характеризиране и отбор на генотипове с повишено съдържание на биологично активни вещества, за целите на фармацевтичната и медицинска индустрия (Mazza and Miniati, 1993; Stothers, 2002).

Целта на настоящата разработка е оптимизиране на растежните регулатори - 2-iP, zeatin, IAA, органичните добавки - casein hydrolisate, myo-inositol и pH използвани при *in vitro* размножаването на диви боровинки (червени и черни), произхождащи от Троянския балкан.

leaves, which are responsible for their anti-cancer, anti-inflammatory and anti-diabetic properties (Jaakola et al. 2001; Wang et al., 2005; Battino et al. 2009; Lätti et al., 2011). Blueberries are also known as "super fruit" all over the world.

Plant cell, tissue and organ cultures have been used as an alternative tool for studying the biological and physiological characteristics of wild representatives, with a view to their application in breeding programs and food industry (Kalf and Dufour, 1997; Nikolaeva-Glomb, 2014).

In addition, the application of the tissue culture method to wild blueberries would be useful for their characterization and selection of genotypes with increased content of biologically active substances, for the purposes of the pharmaceutical and medical industry (Mazza and Miniati, 1993; Stothers, 2002).

The aim of the present study is to optimize the growth regulators - 2-iP, zeatin, IAA, organic additives - casein hydrolysate, myo-inositol and pH used in *in vitro* propagation of wild blueberries (lingonberry and bilberry) originating from the Troyan Balkans.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Растителен материал

Естествените популации от диви боровинки в Троянския балкан, местност Беклеме са разположени на надморска височина 1440 m.

Научният експеримент е проведен в лаборатория за микроразмножаване на дребноплодни овощни видове към ИПЖЗ - гр. Троян.

Стерилизация на растителния материал и въвеждане в *in vitro* култура

Като изходни експланти са използвани обезлистени двупъпкови зелени резници с дължина 1,5-2 cm от *in vivo*

MATERIAL AND METHODS

Plant material

The natural populations of wild blueberries in the Troyan Balkan, Bekleme area are located at an altitude of 1440 m.

The scientific experiment was conducted in the laboratory for micropropagation of small fruit species at RIMSA - Troyan

Sterilization of plant material and introduction into *in vitro* culture

Green cuttings with two buds and length 1.5-2 cm from *in vivo* plants were used as starting explants. The micro cuttings were isolated from the middle

растения. Микрорезниците са изолирани от средната част на едногодишни летораст.

Хранителната среда за въвеждане на боровинки е WPM (McCown and Lloyd 1981), обогатена с 3 mg/l 2-iP (Д). Боровинката е ацидофилен вид и киселинността на средата е 4,2 и 4,8.

Като стерилизиращ агент в настоящия експериментален протокол е използван 0,1 % $HgCl_2$ с различна експозиция (3 мин. и 3,5 мин.).

Стерилизацията на растителния материал включва:

- Промиване на течаща вода за един час:
- Повърхностна стерилизация в условия на ламинар бокс:

- 70 % C_2H_5OH за 30 сек.
- 0,1% $HgCl_2$
- Трикратно промиване със стерилна дестилирана вода.

Въведените в *in vitro* култура микрорезници от представители на род *Vaccinium* се отглеждат в растежни камери, с контролирани условия. Поддържаната температура е 22±25 °C, фотопериодът 16/8 ден/нощ и осветеността 2000-3000 lx. Продължителността на субкултивиране е 30 дни. Разработването на успешен стерилизационен протокол при род *Vaccinium* ще намери приложение в селекционните програми на дребноплодните.

В процеса на *in vitro* размножаване и вкореняване, използвахме основна хранителна среда WPM с вариращи концентрации на растежни регулатори, органични добавки и стойности на pH (Таблица 1-2). Култивирани са експланти отделени от предварително селектирани клонове на дивите боровинки.

part of annual shoots.

The nutrient medium for the introduction of blueberries is WPM (McCown and Lloyd 1981), enriched with 3 mg/l 2-iP (E). Blueberry is an acidophilic species and the acidity of the medium is 4.2 and 4.8.

In the present experimental protocol, 0.1% $HgCl_2$ with different exposures (3 min and 3.5 min) was used as a sterilizing agent.

Sterilization of plant material includes:

- Flushing on running water for one hour:
- Surface sterilization in laminar box conditions:

- 70% C_2H_5OH for 30 sec.
- 0.1% $HgCl_2$
- Rinse three times with sterile distilled water.

Introduced in *in vitro* culture micro cuttings from members of genus *Vaccinium* are grown in growth chambers, under controlled conditions. The maintained temperature is 22 ± 25 °C, the photoperiod 16/8 day/night and the illumination 2000-3000 lx. The duration of sub-cultivation is 30 days. The development of a successful sterilization protocol for genus *Vaccinium* will find application in the selection programs of small fruit.

In the process of *in vitro* propagation and rooting, we used a basic WPM nutrient medium with varying concentrations of growth regulators, organic additives and pH values (Table 1-2). Explants separated from pre-selected wild blueberries branches were cultivated.

Таблица 1. Варианти на хормонален баланс при фаза на мултипликация
Table 1. Hormonal balance variants in the multiplication phase

Варианти на хранителни среди Variants of nutrient medium	Основна среда Basic medium	Zeatin mg/l	2-iP mg/l	Casein hydrolysate mg/l	pH
M1	WPM	3,5	3,5	250	4,8
M2	WPM	3,5	3,5	250	4,3
M3	WPM	3,5	3,5	150	4,8
M4	WPM	3,5	1,5	250	4,8
M5	WPM	2,0	3,5	250	4,8
M6	WPM	2,0	1,5	150	4,3
M7	WPM	2,0	1,5	150	4,8
M8	WPM	2,0	1,5	250	4,3
M9	WPM	2,0	3,5	150	4,3
M10	WPM	3,5	1,5	150	4,3
M11	WPM	3,5	3,5	150	4,3
M12	WPM	3,5	1,5	250	4,3
M13	WPM	3,5	1,5	150	4,8
M14	WPM	2,0	1,5	250	4,8
M15	WPM	2,0	3,5	150	4,8
M16	WPM	2,0	3,5	250	4,3
M17	WPM	2,75	2,5	200	4,55

Ризогенезът на дивите боровинки е осъществен на средите посочени в Таблица 2.

The rhizogenesis of wild blueberries was performed on the media listed in Table 2.

Таблица 2. Състав на хранителните среди изпитвани през фаза вкореняване на дивите боровинки
Table 2. Composition of nutrient media tested during the rooting phase of wild blueberries

Варианти на хранителни среди Variants of nutrient medium	1/2WPM	IAA mg/l	Myo-inositol	pH
R1	1/2WPM	1,0	500	4,8
R2	1/2WPM	0,5	500	4,8
R3	1/2WPM	1,0	250	4,8
R4	1/2WPM	1,0	500	4,3
R5	1/2WPM	0,5	250	4,3
R6	1/2WPM	0,5	250	4,8
R7	1/2WPM	0,5	500	4,3
R8	1/2WPM	1,0	250	4,3
R9	1/2WPM	0,75	375	4,55

Влияние на хранителната среда върху нарастването и пролиферацията на дивите боровинки

Абсолютното сухо тегло на проучваните боровинки е отчетено през етапа на мултипликация на различните варианти хранителни среди.

Претегля се общото количество на свежата биомаса в началото и края на експеримента.

Influence of nutrient medium on the growth and proliferation of wild blueberries

The absolute dry weight of the studied blueberries was reported during the stage of multiplication of the different nutrient media.

The total amount of fresh biomass was weighted at the beginning and end of the experiment.

Сухата биомаса се определя като 0,5-1,0 g свежа биомаса се изсушава в тегловно стъкло при температура от 60 ºС за 24 часа във вентилационна сушилня. Изчислява се % сухо тегло.

Развитието на *in vitro* растенията се проследява чрез определяне на акумулираната суха биомаса (ADB) по следното уравнение:

Dry biomass is defined as 0.5-1.0 g of fresh biomass, which was dried in a weight glass at a temperature of 60 ºC for 24 hours in a ventilated dryer. % Dry weight was measured.

The development of *in vitro* plants was monitored by determining the accumulated dry biomass (ADB) according to the following equation:

ADB=FDW-IDW, g,

където:

- ADB – акумулирана суха биомаса, g;
- FDW – крайно количество на сухата биомаса на суспензията, g; - това е количеството свежа биомаса в края на култивирането *определеното сухо

IDW – начално количество на сухата биомаса на суспензията използвана за посевен материал, g - това е количеството свежа биомаса в началото на култивирането *определеното сухо.

where:

- ADB - accumulated dry biomass, g;
- FDW - final amount of dry biomass of the suspension, g; - this is the amount of fresh biomass at the end of cultivation * determined dry
- IDW - initial amount of dry biomass of the suspension used for seeding material, g - this is the amount of fresh biomass at the beginning of cultivation * determined dry.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

В резултат на проведения експеримент бяха оптимизирани протоколите за стерилизация, мултипликацията и вкореняването на диви черни и червени боровинки с произход местност Беклеме.

Изборът на $HgCl_2$ като стерилизиращ агент е определен като подходящ при дивите боровинки, в резултат на многобройни наши проучвания, в които изпитването на различни стерилизанти не са дали надеждни резултати (непубликувани данни**).**

При прилагането на 0,1 % $HgCl_2$ и експозиция от 3 мин. беше отчетен сравнително висок % стерилни култури при червените боровинки – 59.5%, а при черните е 46.7%. Увеличаването на експозицията на 3.5 мин за черните боровинки доведе до леко увеличение на стерилните култури – 48.2% (Таблица 3).

RESULTS AND DISCUSSION

As a result of the experiment, the protocols for sterilization, multiplication and rooting of bilberries and lingonberries originating in the Bekleme area were optimized.

The choice of $HgCl_2$ as a sterilizing agent has been determined to be suitable for wild blueberries, as a result of numerous of our studies in which testing of various sterilizers has not yielded reliable results (unpublished data**).**

A relatively high % of sterile cultures was reported for lingonberries - 59.5%, and 46.7% for bilberries with the application of 0.1% $HgCl_2$ and exposure of 3 min. A slight increase in sterile cultures - 48.2% (Table 3) was a result of the increase of the exposure to 3.5 min for bilberries.

Таблица 3. Ефективност на стерилизацията при диви черни *(Vaccinium myrtillus* L.*)* и червени *(Vaccinium vitis-idaea* L.*)* боровинки
Table 3. Sterilization efficiency in bilberries *(Vaccinium myrtillus* L.*)* and lingonberries *(Vaccinium vitis-idaea* L.*)*

Сорт Cultivar	Експозиция с Exposition with $HgCl_2$	Хр. среда Nutrient medium	Брой въведени Number of introduced	Брой заразени Number of infected	% заразени infected	% стерилни култури sterile crops
червени боровинки lingonberries	3 min.	Д	252	102	40,5 %	59,5 %
черни боровинки bilberries	3 min	Д	351	187	53,3 %	46,7 %
черни боровинки bilberries	3,5 min	Д	83	36	48,2 %	51,8 %

В предишни наши експерименти сме установили, че поведението на дивите червени и черни боровинки е различно в зависимост от хранителната среда, включените растежни регулатори и взаимодействията между тях (Georgieva et al., 2016).

Анализът на резултатите показва, че мултипликационният коефициент е в зависимост от концентрацията на приложения растежен регулатор и органични добавки. Така например при червените боровинки той е в границите от 1,3 бр./експлант (М16 и М17) до 4,4 бр./експлант (М4) (Фигура 1, 3). Този коефициент при черните боровинки е в по-нисък диапазон от 1,2 бр./експлант (М11) до 2,8 бр./експлант (М5).

По принцип, индуцирането на регенеративен процес при дивите видове е свързано с използването на по-високи дози на растежните регулатори, като те се различават дори в рамките на един и същи вид. Резултатите показват, че съотношението между цитокинините zeatin : 2-iP при червените боровинки е 3,5 mg : 1,5 mg в полза на zeatina, докато при черните боровинки е обратно - 2 mg : 3,5 mg в полза на 2-iP. Ползата от акумулиране на високи дози цитокинини в началната фаза на тяхното развитие се проявява в силен ефект след освобождаването на *in vitro* регенерантите от хормоналния натиск.

In our previous experiments, we found that the behavior of lingonberries and bilberries is different depending on the nutrient medium, the growth regulators involved and the interactions among them (Georgieva et al., 2016).

The analysis of the results shows that the multiplication coefficient depends on the concentration of the applied growth regulator and organic additives. For example, it is in the range of 1.3 pcs/explant (M16 and M17) to 4.4 pcs/explant (M4) for lingonberries (Figure 1, 3). This coefficient for bilberries is in a lower range from 1.2 pcs/explant (M11) to 2.8 pcs./explant (M5).

In general, the induction of a regenerative process in wild species is associated with the use of higher doses of growth regulators, which differ even within the same species. The results show that the ratio of cytokinins zeatin: 2-iP in lingonberries is 3.5 mg: 1.5 mg in favour of zeatin, while in bilberries it is the opposite - 2 mg: 3.5 mg in favour of 2-iP.

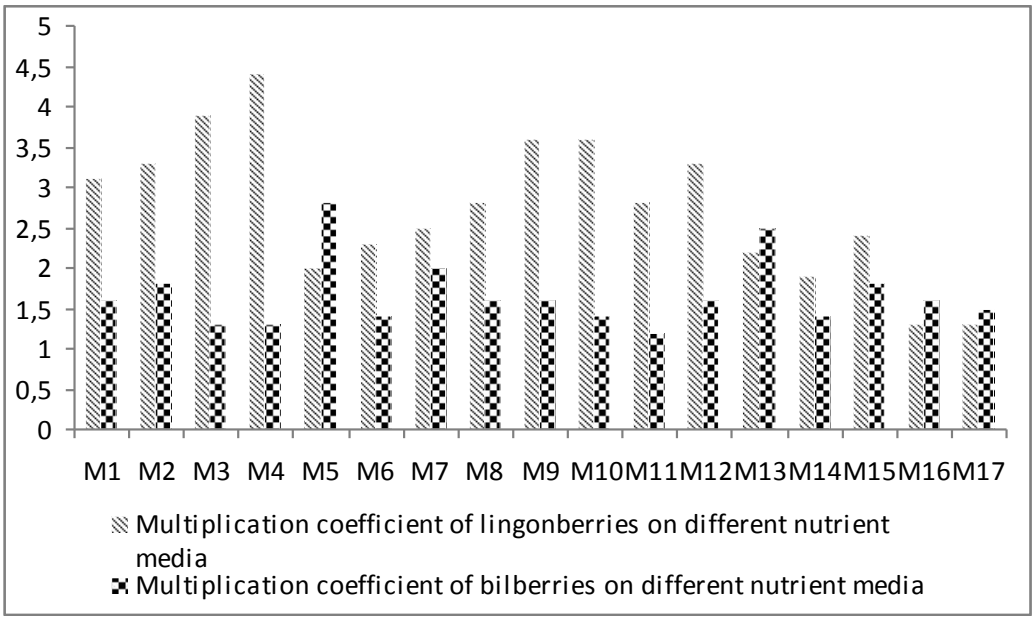
The benefit of accumulation of high doses of cytokinins in the initial phase of their development is manifested in a strong effect after the release of *in vitro* regenerants from hormonal pressure.

Jaakola et al. (2001; 2002) докладват, че високите концентрации на 2-iP в хранителната среда водят до повишаване на покафеняването на червени и черни диви боровинки.

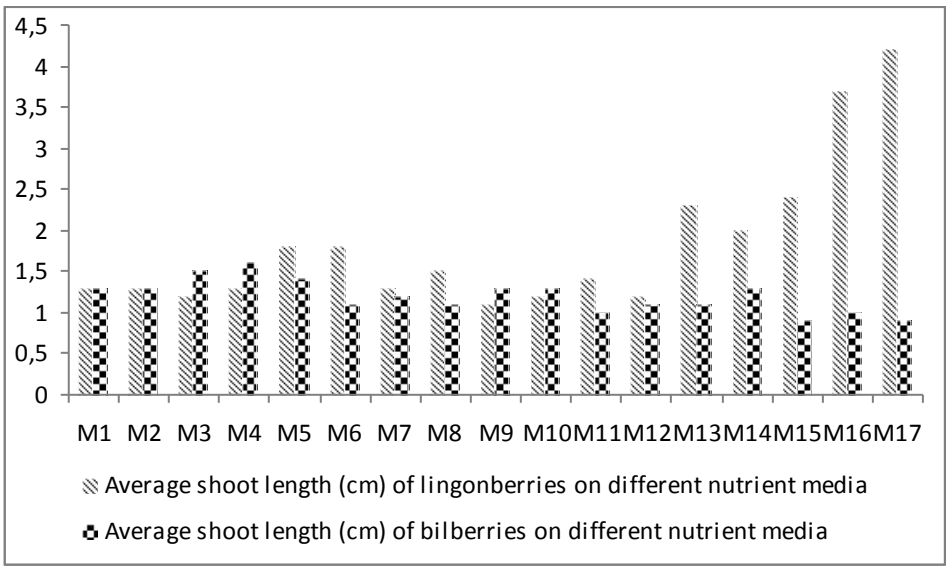
Ние не сме наблюдавали такова покафеняване, което според нас се дължи на обогатяване на средите с органични добавки – casein hydrolisate и myo-inositol.

Jaakola et al. (2001; 2002) report that high concentrations of 2-iP in the nutrient medium lead to increased browning of lingonberries and bilberries.

There wasn't such browning in the present experiment, which in our opinion is due to the enrichment of the media with organic additives - casein hydrolysate and myo-inositol.



Фиг. 1. Мултипликационен коефициент на диви черни и червени боровинки на различни хранителни среди
Fig. 1. Multiplication coefficient of bilberries and lingonberries on different nutrient media



Фиг. 2. Средна дължина на издънките (cm) на диви черни и червени боровинки на различни хранителни среди
Fig. 2. Average shoot length (cm) of bilberries and lingonberries on different nutrient media

Показателят средна дължина на издънките при червените боровинки варира от 1,1 cm на хранителна среда M9 до 4,2 cm (M17), а при черните от 1 cm (M11) до 1,6 cm (M4) (Фигура 2). Не е наблюдавана определена корелация между дължината на издънките и техния брой.

От изпитваните девет варианта на среди за коренообразуване е регистрирано вкореняване само на някои от тях (Таблица 4). Така например при червените боровинки вкореняване е отчетено само на R6 и R8 – 11,1 %. Коренообразуването при черните боровинки е наблюдавано само на четири варианта и е в границите от 16,7 % (R7) до 57 % (R4) (Таблица 5). Jaakola et al. (2001) докладват за 81,3 % вкореняване при черните боровинки, с добавяне на 0,49 µ M IBA в хранителната среда. Изследователи като Shibli and Smith (1996) успешно вкореняват черни боровинки (40 %) от листни експланти на хранителна среда без растежни регулатори, след осем седмици.

The average length of shoots in lingonberries varied from 1.1 cm on nutrient medium M9 to 4.2 cm (M17), and in bilberries from 1 cm (M11) to 1.6 cm (M4) (Figure 2). No definite correlation was observed between length of shoots and their number.

Rooting was registered only in some of the nine variants of rooting medium (Table 4). For example, in the case of lingonberries, rooting was reported only at R6 and R8 - 11.1%.

Root formation in bilberries was observed in only four variants and ranged from 16.7% (R7) to 57% (R4) (Table 5). Jaakola et al. (2001) reported 81.3% rooting in bilberries, with the addition of 0.49 µ M IBA in the nutrient medium.

Researchers such as Shibli and Smith (1996) successfully rooted bilberries (40%) from leaf explants in a nutrient medium without growth regulators after eight weeks.

Данните за най-големия среден брой корени при двата вида боровинки са близки – 3 броя при червените (R6 0,5 mg/l IAA и 250 mg/l myo-inositol, pH 4,8) и 2,8 броя при черните (R3 1 mg/l IAA и 250 mg/l myo-inositol, pH 4,8).

Най-голямата средна дължина на корените при червените боровинки е 2 cm и е отчетена на хранителна среда R6, а при черните – 1,8 cm на R7.

The data for the largest average number of roots in both types of berries are similar - 3 in lingonberries (R6 0.5 mg/l IAA and 250 mg/l myo-inositol, pH 4.8) and 2.8 in bilberries (R3 1 mg/l IAA and 250 mg/l myo-inositol, pH 4.8).

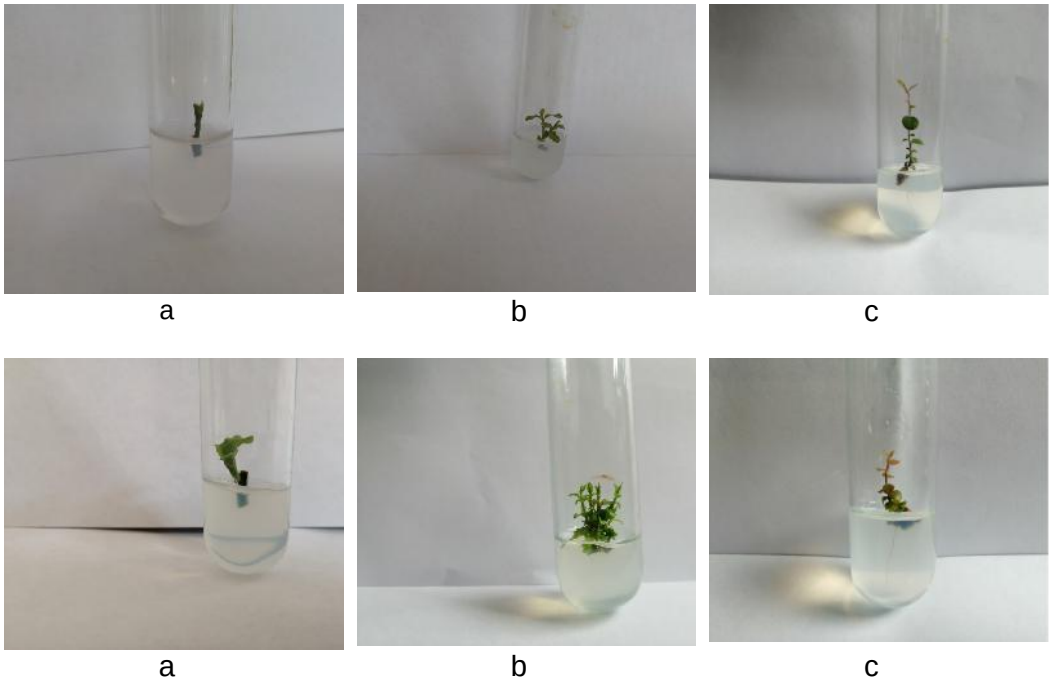
The maximum average length of the roots in lingonberries is 2 cm on nutrient medium R6, and in bilberries - 1.8 cm on R7.

Таблица 4. Вкореняване на диви червени боровинки на различни хранителни среди
Table 4. Rooting of lingonberries in different nutrient media

Варианти на хранителни среди Variants of nutrient medium	Процент вкореняване Rooting %	Среден брой корени Average number of roots	Средна дължина на корените Average length of roots (cm)
R1	-	-	-
R2	-	-	-
R3	-	-	-
R4	-	-	-
R5	-	-	-
R6	11,1 %	3	2
R7	-	-	-
R8	11,1 %	1	1
R9	-	-	-

Таблица 5. Вкореняване на диви черни боровинки на различни хранителни среди
Table 5. Rooting of bilberries in different nutrient media

Варианти на хранителни среди Variants of nutrient medium	Процент вкореняване Rooting (%)	Среден брой корени Average number of roots	Средна дължина на корените Average length of roots (cm)
R1	-	-	-
R2	-	-	-
R3	33,3 %	2,8	1,4
R4	57 %	2	1,3
R5	50 %	0,8	0,8
R6	-	-	-
R7	16,7 %	1,5	1,8
R8	-	-	-
R9	-	-	-



Фиг. 3 Схема на *in vitro* размножаването (въвеждане (a), мултипликация (b), вкореняване (c)) на диви червени и черни боровинки
Fig. 3 Scheme of *in vitro* propagation (introduction (a), multiplication (b), rooting (c)) of lingonberries and bilberries

Абсолютно сухо тегло

На Таблица 6 са представени резултатите относно абсолютно сухото тегло (%) на изследваните червени и черни боровинки. Това е показател, характеризиращ *in vitro* растежа и дава представа за степента на развитие на заложения експлант, в зависимост от екзогенното приложение на растежните регулатори.

От изпитаните 17 варианта хранителни среди върху нарастването на свежата биомаса на черните и червени боровинки е наблюдавана тенденция за установяване по-високи стойности на абсолютно сухото тегло при черните боровинки (с изключение на вариант М15 и М17).

Най-силен растеж при червените боровинки е отчетен на хранителна среда М14 (19,72 %), а при черните – на среда М3 (32,49 %).

Absolutely dry weight

Table 6 presents the results regarding the absolutely dry weight (%) of the studied lingonberies and bilberries. This is an indicator characterizing *in vitro* growth and gives an idea of the degree of development of the introduced explant, depending on the exogenous application of growth regulators.

Of the 17 nutrient media tested on the increase in fresh biomass of bilberries and lingonberries, there was a tendency to establish higher values of absolutely dry weight in bilberries (except for variant M15 and M17).

The strongest growth in lingonberries was reported on nutrient medium M14 (19.72%), and in bilberries - on medium M3 (32.49%).

Таблица 6. Абсолютно сухо тегло (%) на червени и черни боровинки от район на произход м. Беклеме
Table 6. Absolute dry weight (%) of lingonberries and bilberries from the region of origin Bekleme area

Варианти на хранителни среди Variants of culture medium	Абсолютно сухо тегло, % на червени боровинки Absolute dry weight % of lingonberries (average)	Абсолютно сухо тегло, % на черни боровинки Absolute dry weight % of bilberries (average)
M1	14,68	32,49
M2	11,19	25,70
M3	11,25	31,00
M4	11,77	26,79
M5	14,87	25,77
M6	13,01	23,84
M7	12,76	19,00
M8	13,04	18,17
M9	10,71	24,21
M10	13,12	19,06
M11	13,47	20,06
M12	13,67	19,06
M13	13,38	19,96
M14	19,72	23,93
M15	17,22	15,69
M16	17,60	24,84
M17	18,80	15,10

Адаптация

Адаптацията на *in vitro* растения от диви черни и червени боровинки при лабораторни условия е безпроблемна (Фигура 4). Трансферът от *in vitro* към *in vivo* условия е успешен (90 %). Не се наблюдават морфологични промени и растенията се развиват нормално. Продължителността на адаптация е 40 дни. Оптимизираните условия на контейнерно отглеждане довеждат до получаване на жизнени растения с изравнен растеж и добре развита коренова система.

Adaptation

The adaptation of *in vitro* plants from bilberries and lingonberries under laboratory conditions is trouble-free (Figure 4). Transfer from *in vitro* to *in vivo* conditions was successful (90%). No morphological changes were observed and the plants developed normally. The duration of adaptation was 40 days. Optimized container growing conditions lead to the production of viable plants with balanced growth and a well-developed root system.

Фиг. 4. Адаптация на диви черни (А) и червени (Б) боровинки
Fig. 4. Adaptation of bilberries (A) and lingonberries (B)

ИЗВОДИ

Разработването на моделна система за *in vitro* размножаване, вкореняване и адаптация на диви видове принадлежащи към род *Vaccinium* има огромно значение за бъдещи научни изследвания насочени към определяне на техния биологичен, физиологичен и здравен статус. Досегашните резултати доказват тяхната фармакологична стойност и значението им за хранителната, фармацевтична и козметична индустрия.

In vitro размножаването на диви видове е свързано с по-големи трудности в сравнение с техните селекционирани сортове. Резултатите показват, че за индуциране на органогенез при тях се използват по-високи дози (1,5 -3,5 mg/l/ на два цитокинина (zeatin и 2-iP). Съотношенията между тях се различават при двата вида - червена и черна боровинка.

Преодоляването на физиологични аномалии, които се коментират от Jaakola et al. (2001; 2002), е успешно с включването на органични добавки към хранителните среди (casein hydrolisate и myo-inositol).

Постакумулативният ефект от използването на по-високи дози цитокинини се проявява в процесите на вкореняване и *in vivo* адаптиране.

Разработеният ефективен протокол за *in vitro* отглеждане на диви боровинки (червени и черни) дава възмож-

CONCLUSIONS

The development of a model system for *in vitro* propagation, rooting and adaptation of wild species belonging to genus *Vaccinium* is of great importance for future research aimed at determining their biological, physiological and health status. The results so far prove their pharmacological value and their importance for the food, pharmaceutical and cosmetic industries.

In vitro propagation of wild species is associated with greater difficulties compared to their selected cultivars. The results show that higher doses of 1.5-3.5 mg/l/of two cytokinins (zeatin and 2-iP) are used to induce organogenesis. The ratios between them differ in both types - lingonberries and bilberries.

Overcoming physiological abnormalities, which are commented by Jaakola et al. (2001; 2002), has been successful with the inclusion of organic food additives (casein hydrolysate and myo-inositol).

The post-acumulative effect of the use of higher doses of cytokinins is manifested in the processes of rooting and *in vivo* adaptation.

The developed effective protocol for *in vitro* cultivation of wild berries (lingonberries and bilberries) makes it

ност за създаване на насаждения от тях на подходящи местообитания, което ще позволи съхранение на тези ценни биологични видове.

possible to create plantations of them in suitable habitats, which will allow the conservation of these valuable species.

БЛАГОДАРНОСТИ

Настоящата разработка се основава на изследвания, финансирани от Фонд "Научни изследвания" на Министерството на образованието и науката, договор ДФНИ 16/1 от 2017 г. на тема: "Иновативни подходи за изучаване и използване на генетични ресурси от диви боровинки в България".

ACKNOWLEDGEMENTS

The present study is based on research funded by the Research Fund of the Ministry of Education and Science, contract DFNI 16/1 of 2017 on the topic: "Innovative approaches for studying and using genetic resources of wild blueberries in Bulgaria".

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Battino, M., J. Beekwilder, B. Denoyes-Rothan, M. Laimer, G. J. McDougall and B. Mezzetti**, 2009. Bioactive Compounds in Berries Relevant to Human Health. *Nutritional Reviews* 67, 145-150.
2. **Georgieva, M., I. Badjakov, I. Dincheva, S. Yancheva and V. Kondakova**, 2016. *In vitro* Propagation of Wild Bulgarian Small Berry Fruits (Bilberry, Lingonberry, Raspberry and Strawberry). *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 22 (1), 46-51.
3. **Jaakola, L., A. Tolvanen, K. Lain and A. Hohtola**, 2001. Effect of N^6- Isopentenyladenine Concentration on Growth Initiation *in vitro* and Rooting of Bilberry and Lingonberry Microshoots, *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 66, 73-77.
4. **Jaakola, L., A. Tolvanen, K. Laine and A. Hohtola**, 2002. Micropropagation of Bilberry and Lingonberry, *Acta Horticulturae*.
5. **Kalf W. and D. Dufour**, 1997. Healthy Functionality of Bilberry. *Hort Technology*. 7: 216- 21.
6. **Lätti, A.K., K.R. Riihinen and L. Jaakola,** 2011. Phenolic Compounds in Berries and Flowers of a Natural Hybrid between Bilberry and Lingonberry (Vaccinium × intermedium Ruthe). *Phytochemistry* 72, 810–815.
7. **Mazza G., and E. Miniati**, 1993. Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains. *CRC Press*.
8. **McCown, B. N and G. Lloyd,** 1981. Woody Plant Medium (WPM) – a Mineral Nutrient Formulation for Microculture of Woody Plant Species. *HortScience,* 16, 453.
9. **Nikolaeva-Glomb**, **L. Mukova, N. Nikolova, I. Badjakov, I. Dincheva, V. Kondakova, L. Doumanova, A. S. Galabov**, 2014. In vitro Antiviral Activity of a Series of Wild Berry Fruit Extracts against Representatives of Picorna- Orthomyx0- and Paramyxoviridae. *Natural Product Communications*, 9:51-54.
10. **Shibli, R.A. and Smith M.A.L.,** 1996. Direct Shoot Regeneration from *Vaccinium pahlae* (Othelo) and *V. myrtillus* (bilberry) Leaf Explants. *HortScience*, 31, 1225-1228.
11. **Stothers L.**, 2002. A Randomized Trial to Evaluate Effectiveness and Cost Effectiveness of Naturopathic Cranberry Products as Prophylaxis against Urinary Tract infection in Women. *Can J Urol.* 9: 1558-62.
12. **Wang, S.Y., R. Feng, L. Bowman, R. Penhallegon, M. Ding and Y., Lu,** 2005. Antioxidant Activity in Lingonberries (Vaccinium vitis-idaea L.) and its Inhibitory Effect on Activator Protein-1, Nuclear Factor-kappa B, and Mitogen-Activated Protein Kinases Activation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 53, 3156-3166.

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2020, 23 (3), 218-233
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan
ISSN 1311-0489 (Print)
ISSN 2367-8364 (Online)

Оценка върху запазване качеството на пресни сливови плодове от сорт Елена при хладилни условия след приложение на биологични и конвенционални торове

Деница Христова*, Диян Георгиев

Институт по планинско животновъдство и земеделие, ул. „Васил Левски" 281, 5600 Троян, България

Assessment on the Preservation of Fresh Fruit Quality of 'Elena' Plum Cultivar under Refrigeration after Application of Biological and Conventional Fertilizers

Denitsa Hristova*, Diyan Georgiev

Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, 281 Vasil Levski Str., 5600 Troyan, Bulgaria
**E-mail: den_1986@abv.bg*

Original scientific paper

РЕЗЮМЕ

Целта на проведеното през 2016-2018г изследване в ИПЖЗ-Троян е проследяване степента на влияние от торове предназначени за конвенционално и биологично плодопроизводство върху качеството и съхранението в хладилни условия на пресни сливови плодове от сорт Елена. Установено е, че продължителността на съхранение при температура от 0 до 4 °C е до 35 дни, като с най-добри сетивни характеристики и качество за консумация, след изследвания период са отчетени от вариантите на торене с пилешки тор и био торенето. След престой на плодовете в хладилни условия, количеството на биохимическите показатели обща, инвертна захар и захароза се понижава. Увеличение е установено при процентното съдържание на дъбилни вещества и пектин, най-силно проявено при вариантите на торене с пилешки

SUMMARY

The present study was conducted in 2016-2018 at RIMSA-Troyan. Its purpose was to monitor the effect of fertilizers for conventional and biological fruit production on the quality and refrigeration of fresh fruit of 'Elena' plum cultivar. The best sensory characteristics and quality for consumption were found in the variants with chicken manure and bio fertilization. Fruit was kept from 0 to 4 °C up not more than 35 days.

After staying in refrigerated conditions, the amount of biochemical indicators, such as total, invert sugar and sucrose in fruit, decreased.

An increase was found in the percentage of tannins and pectin, most pronounced in the variants with chicken manure (0.167%; 1.11%) and biofertilizer (0.173%; 1.03%). The results obtained

тор (0.167 %; 1.11%) и био торенето (0.173%; 1.03%). Получените резултати вероятно са повлияни от състава на приложения органичен пилешки тор и био тора Текнокел Амино Са.

Ключови думи: слива, торене, съхранение, биохимичен състав, общи полифеноли

УВОД

Пресните плодове са важен източник на витамини, минерали, антиоксиданти, флавоноиди и диетични фибри (Auger et al. 2004; Cevallos-Casals et al., 2006; Milošević and Milošević, 2012). След прибиране на реколтата, в резултат на въздействието на микроорганизми, дишането и загубата на влага те бързо намаляват своята трайност и хранителна стойност (Radev, 2017).

Свойствата на почвата, сезонните и климатични промени по време на вегетация влияят и имат пряко отражение върху количеството и качеството на получената продукция (Cautín and Agustí, 2005; Barbosa-Canovas et al., 2006; Dimitrova and Borisova, 2007; Rato et al., 2008; Gitea et. al., 2019).

Съхранението и потреблението на сливови плодове се различава значително,в зависимост от сорта, полаганите грижи, прибирането на реколтата и осигурените след нея условия (Crisosto and Mitchell, 2002). Температурата е важна технология за съхранение на плодовете, влияеща върху настъпващите променени в тяхната физиология и биохимия (Brizzolara et al., 2020).

Желанието за консумация на пресни сливови плодове зависи от сетивните им характеристики, като външен вид, цвят, твърдост, вкус и аромат. Съотношението захари/киселини определя вкусовите им качества, а съдържанието на някои летливи ароматни компоненти и техния мирис. Освен придаващи цвят, вкус и стипчивост, полифенолите, присъстващи в плодове действат като защита срещу неблагоприятните условия на околната среда, отстраняват свободните радикали, унищожават пътя на окисление

are likely influenced by the composition of the applied organic chicken manure and bio fertilizer Tecnokel Amino Ca.

Key words: plum, fertilization, storage, biochemical composition, total polyphenols

INTRODUCTION

Fresh fruits are an important source of vitamins, minerals, antioxidants, flavonoids and dietary fiber (Auger et al. 2004; Cevallos-Casals et al., 2006; Milošević and Milošević, 2012). After harvesting, as a result of the effects of microorganisms, breathing and loss of moisture they quickly reduce their durability and nutritional value (Radev, 2017).

Soil characteristics, seasonal and climatic changes during vegetation have an impact on the quantity and quality of the production (Cautín and Agustí, 2005; Barbosa-Canovas et al., 2006; Dimitrova and Borisova, 2007; Rato et al., 2008; Gitea et. al., 2019).

The storage and consumption of plum fruits varies considerably, depending on the cultivar, care, harvesting and conditions provided after that (Crisosto and Mitchell, 2002). Temperature is an important technology for storing fruits, influencing the changes in their physiology and biochemistry (Brizzolara et al., 2020).

The desire to consume fresh plum fruit depends on their sensory characteristics, such as appearance, colour, firmness, taste and aroma. The sugar/acid ratio determines their taste qualities and the content of certain volatile aromatic components, their odour. In addition to giving colour, flavour and astringency, the polyphenols in fruits act as protection against adverse environmental conditions, destroy free radicals, destroy the way of oxidation

няват свободните радикали, разрушават пътя на окисление образуван от тях като липидната пероксидация и увреждане на ДНК в човешкото тяло (Robbins, 2003; Simon-Graoa et al., 2014). Проучвания установяват, че есенните сортове сливи са с по-висок антиоксидантен капацитет спрямо летните (Ariona et al., 2014). Според Moyer et al., (2002) антиоксидантното въздействие на биоактивните вещества и оказващия им благоприятен ефект върху здравето на човека корелира с тяхното съдържание.

Поради това е важно да се проследи биохимическия анализ за количественото определяне на отделните показатели и след съхранение (Guerra et al., 2009; Popović et al., 2018).

Проведеното изпитване има за цел проследяване степента на влияние на някои торове предназначени за конвенционално и биологично плодопроизводство, върху биохимическия състав на пресни сливови плодове от сорт Елена, преди и след съхранението им.

formed by them as lipid peroxidation and DNA damage in the human body (Robbins, 2003; Simon-Graoa et al., 2014). Studies have found that autumn plum cultivars have a higher antioxidant capacity than summer (Ariona et al., 2014).

According to Moyer et al., (2002), the antioxidant effect of bioactive substances and their beneficial effect on human health correlates with their content.

Therefore, it is important to follow the biochemical analysis for the quantification of separate indicators and after storage (Guerra et al., 2009; Popović et al., 2018).

The purpose of the present study is to monitor the influence of some fertilizers intended for conventional and organic fruit production on the biochemical composition of fresh fruit of 'Elena' plum cultivar, before and after their storage.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Експериментът е проведен през периода 2016-2018 г. в колекционното насаждение на Институт по планинско животновъдство и земеделие - Троян. Обект на изследването са плодовете на немския сорт Елена, селекция на д-р Хартман от кръстоска на Fellenberg x Stanley. Схемата на засаждане на овощните дървета е 4/2.5 m. Прибирането на реколтата е извършена през следните периоди: през 2016г. – 26.08.; 2017г. - 04.09.; 2018г. - 21.08, непосредствено след което те са поставени за съхранение.

Варианти на торене:

I вариант – Био торене – включ-ващо торовете: Агрифул (почвено) – 5 l/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

MATERIAL AND METHODS

The experiment was conducted in the period 2016-2018 in the collection plantation of the Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture - Troyan. The objective of the present study is fruit of the German cultivar of 'Elena', a selection of Dr. Hartmann created as a crossing between Fellenberg x Stanley. The scheme of planting fruit trees is 4/2.5 m. The harvest was carried out during the following periods: in 2016 - 26.08; 2017-04. 09; 2018-21.08, immediately after which they were placed for storage.

Fertilization variants:

I variant - Organic fertilization - including fertilizers: Agriful (soil) - 5 l/da, Tecamin Flower (foliar) - 0.3%, Tecnocel Amino Ca (foliar) - 0.4%;

II variant - Conventional - Yara Mila Complex (soil) - 0.500 kg/tree, YaraVita Frutrel (foliar) - 0.500 ml/da, Yara Vita Universal Bio (foliar) - 0.500 ml/da,

(листно) – 0.500 ml/da, Амониева селитра- 0.220 g/дърво.
III вариант – Гранулиран пилешки тор – 0.500 kg/дърво;
IV вариант – Нетретирана контрола

Състав на торовете:

Агрифул - Общ хуминов екстракт-306g/l; Фулвокиселини-306g/l; Азот(N)-55g/l; Фосфор (P_20_5)-13g/l; Калий (KjO)-13g/l; Обща органична материя-551g/l; pH-4.7

Текамин Флауър – Екстракт от морски водорасли–51g/l; Свободни "L" аминокиселини-38 g/l; Азот (N)-38 g/l; Фосфор (P_2O_5)-127g/l; Бор (B)-13g/l; Молибден(Mo)- 6.5 g/l; pH-2

Текнокел Амино Са - Калциев оксид (CaO) водоразтворим-148 g/l; Бор (B) водоразтворим - 3 g/l; Свободни "L" аминокиселини-89 g/l; pH-4.0-4.5

Yara Mila Complex Азот (N)-12%; Калий (K)-18%; Магнезий (MgO)-2.7%; Бор (B)-0.015%; Манган (Mn)- 0.02%; Фосфор (P)-11%; Сяра (SO_3)- 20%; Желязо (Fe)- 0.2%; Цинк (Zn)- 0.02%.

YaraVita Frutrel - Калциев оксид (CaO)- 280 g/l; Фосфор (P)- 104 g/l; Азот (N)- 69 g/l; Магнезий (MgO)- 100 g/l; Цинк (Zn)- 40 g/l; Бор (B)-20 g/l

YaraVita Universal Bio - Азот (N)-100 g/l; Фосфор (P_2O_5)-40 g/l; Калий (K_2O)- 70 g/l; Манган (Mn)-1.3 g/l; Мед (Cu)- 1.0 g/l; Цинк (Zn)- 0.7 g/l; Бор (B)-0.2 g/l; Молибден(Mo)- 0.03 g/l

Гранулиран пилешки тор Vita Organic - Азот(N)- 1.2%; Фосфор (P)-1.99%; Калий (K)-2.5%; Калций (Ca)-10.85%; Магнезий (Mg)- 0.75%; Цинк (Zn)-350 mg/kg; Мед (Cu)-50 mg/kg; Манган(Mn)- 443 mg/kg; Желязо (Fe)-3450 mg/kg.

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

Ammonium nitrate - 0.220 g/tree;
III variant - Granulated chicken manure - 0.500 kg/tree;
IV variant - Untreated control

Fertilizer composition:

Agriful - Total humic extract-306g/l; Fulvic acid - 306g/l; Nitrogen (N) - 55g/l; Phosphorus (P_20_5) -13g / l; Potassium (KjO) -13g/l; Total organic matter - 551g/l; pH-4.7

Tecamin Flower - Seaweed extract-51g/l; Free "L" amino acids -38 g/l; Nitrogen (N)-38 g/l; Phosphorus (P_2O_5)-127g/l; Boron (B)-13g/l; Molybdenum (Mo)- 6.5 g/l; pH-2

Tecnocel Amino Ca - Calcium oxide (CaO) water-soluble -148 g/l; Boron (B) water-soluble - 3 g/l; Free "L" amino acids - 89 g/l; pH-4.0-4.5

Yara Mila Complex Nitrogen (N) -12%; Potassium (K) -18%; Magnesium (MgO) -2.7%; Boron (B) -0.015%; Manganese (Mn) - 0.02%; Phosphorus (P) -11%; Sulphur (SO_3) - 20%; Iron (Fe) - 0.2%; Zinc (Zn) - 0.02%.

YaraVita Frutrel - Calcium oxide (CaO) - 280 g/l; Phosphorus (P) - 104 g/l; Nitrogen (N) - 69 g/l; Magnesium (MgO) - 100 g/l; Zinc (Zn) - 40 g/l; Boron (B) - 20 g/l

YaraVita Universal Bio - Nitrogen (N) - 100 g/l; Phosphorus (P_2O_5) - 40 g/l; Potassium (K_2O) - 70 g/l; Manganese (Mn) - 1.3 g/l; Copper (Cu) - 1.0 g/l; Zinc (Zn) - 0.7 g/ l; Boron (B) - 0.2 g/l; Molybdenum (Mo) - 0.03 g/l

Granulated chicken manure Vita Organic - Nitrogen (N) - 1.2%; Phosphorus (P) - 1.99%; Potassium (K) - 2.5%; Calcium (Ca) - 10.85%; Magnesium (Mg) - 0.75%; Zinc (Zn) - 350 mg/kg; Copper (Cu) - 50 mg/kg; Manganese (Mn) - 443 mg/kg; Iron (Fe) - 3450 mg/kg.

Fertilizer application periods:

Agriful - applied five times at the beginning of vegetation for a period of 15-20 days;

Tekamin Flower _ 2 applications. Applied before blossoming and during

по време на образуване на завръз;

Текнокел Амино Са - внесен двукратно. Прилаган след цъфтеж и месец преди пребиране на реколтата;

Yara Mila Complex - внесен еднократно през 2016 и 2018г;

Амониева селитра– внесена еднократно през 2017г.;

YaraVita Frutrel – четирикратно внесен. Първо във фаза зимни пъпки, във фаза бял бутон, по време на образуване на завръз и месец преди пребиране на реколтата;

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

Гранулиран пилешки тор – внесен еднократно през 2016 и 2018г.

Биохимичният състав на плодовете е изследван в химическата лабораторията на ИПЖЗ - Троян. Проследени са следните показателите: сухо вещество по Re (%), сухо тегловно (%), захари (%) (общи, инвертна и захароза) – по метода на Шоорл и Регенбоген, киселини (%) – чрез титруване с 0,1n NaOH; аскорбинова киселина (mgL^{-1}) – по метода на Фиалков; антоциани (mgL^{-1}) – по метода на Fuleki и Franciss, пектин (%) – по метода на Мелитц, дъбилни вещества (%) – по метода на Левентал, Общи полифеноли – по метода на Singleton and Rossi (mgGAE/100gFW).

Съхранение на плодовете при температура 4 ^{o}C

Плодовете за съхранение са поставяни в пластмасови касетки при хладилни условия с температури в диапазона 0-4 ^{o}C. На всеки 7 дни се отчитат загнилите и негодни за консумация плодове. На последните плодове с добро качество, след съхранението се анализира биохимическия им състав.

През първата опитна година, след прибирането на реколтата от сорт Елена са определени от всеки вариант по 5 kg свежи и видимо здрави сливови плодове. През следващата 2017 година, поради недостатъчно им количес-

fruit-set formation;

Tecnocel Amino Ca - 2 applications. Applied after blossoming and a month before harvest;

Yara Mila Complex - 1 application in 2016 and 2018;

Ammonium nitrate- 1 application in 2017;

YaraVita Frutrel - 4 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 before the harvest.

Yara Vita Universal Bio - 3 applications. Applied before and after blossoming and after harvest;

Granulated chicken manure - one application in 2016 and 2018.

The biochemical composition of fruit was studied at the chemical laboratory of RIMSA - Troyan. The following indicators were monitored: dry matter according to Re (%), dry mass (%), sugars (%) (total, invert and sucrose) according to the method of Shoorl and Regenbogen, acids (%) - by titration with 0.1 n NaOH; ascorbic acid (mgL^{-1}) - according to the method of Fialkov; anthocyanins (mgL^{-1}) - according to the method of Fuleki and Franciss, pectin (%) - according to the method of Melitz, tannins (%) - according to the method of Leventhal, total polyphenols (mgGAE/100g)- according to Singleton and Rossi.

Storage of fruits at a temperature of 4 ^{o}C

The fruits were stored in plastic boxes under refrigeration conditions at temperatures in the range 0-4 ^{o}C. Every 7 days the rotten and unfit for consumption fruits were reported. The biochemical composition after storage of good fruit quality was analyzed.

In the first experimental year, after the harvest of 'Elena', 5 kg of fresh and visibly healthy plums were taken from each variant.

In the next 2017, due to their insufficient

тво, съхранението им се проследява с 1.500 kg. Неблагоприятните климатични условия през вегетационния период на 2018 г. и получения по-нисък добив за съхранение са изпитани по 0.500 kg сливови плодове от всеки вариант.

Статистическа обработка

За обработка на получените данни от експерименталната работа на изследваните сортове са използвани следните статистически анализи: вариационен, корелационен и регресионен анализ.

quantity, their storage was monitored for 1,500 kg. The unfavorable climatic conditions during the vegetation period of 2018 and the lower yield for storage were tested with 0.500 kg of plums from each variant.

Statistic analysis

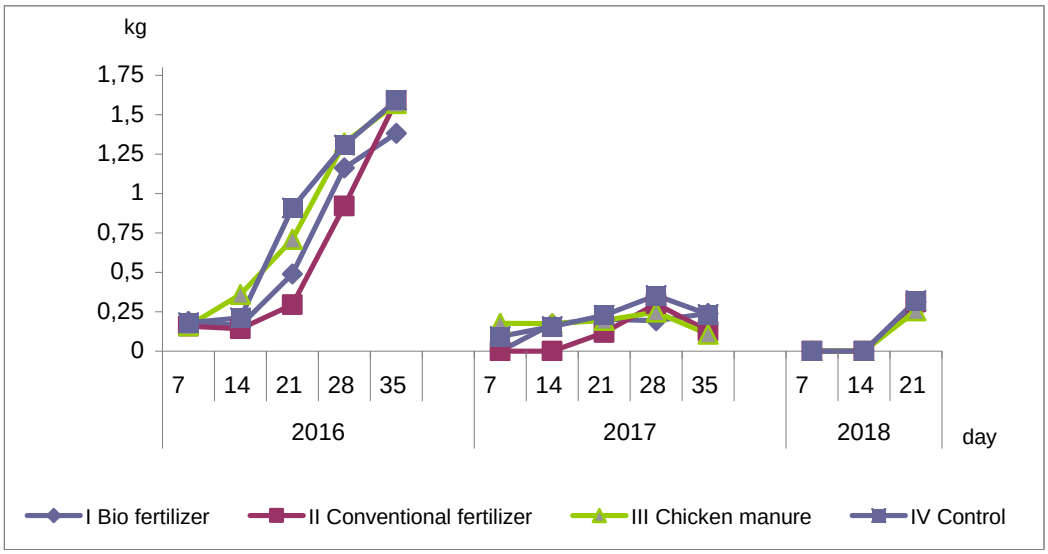
For data processing the following statistical analyses were used: variation, correlation and regression analysis.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Въз основа на представените резултати на Фигура 1 е установено, че продължителността на съхранение на сливовите плодове на сорт Елена през 2016 и 2017г., е в интервала от 29 до 35 дни, а през 2018 до 15 дни, данни съответстващи на посочените от Abdi et al., (1997) и Crisosto et al., (2004), според които след прибиране на реколтата, в зависимост от сорта сливовите плодове могат да се съхраняват в хладилни условия от две до шест седмици.

RESULTS AND DISCUSSION

Based on the results presented in Figure 1 it was found that the duration of storage of fruit of 'Elena' plum cultivar in 2016 and 2017 was of 35 days, and in 2018 up to 21 days. These data corresponding to those indicated by Abdi et al., (1997) and Crisosto et al., (2004), according to which, after harvesting, depending on the cultivar, plums can be stored in refrigerated conditions for two to six weeks.



Фиг. 1. Динамика на количеството (kg) отстранени, негодни за консумация пресни сливови плодове от сорт Елена, съхранявани при хладилни условия за периода 2016-2018г.

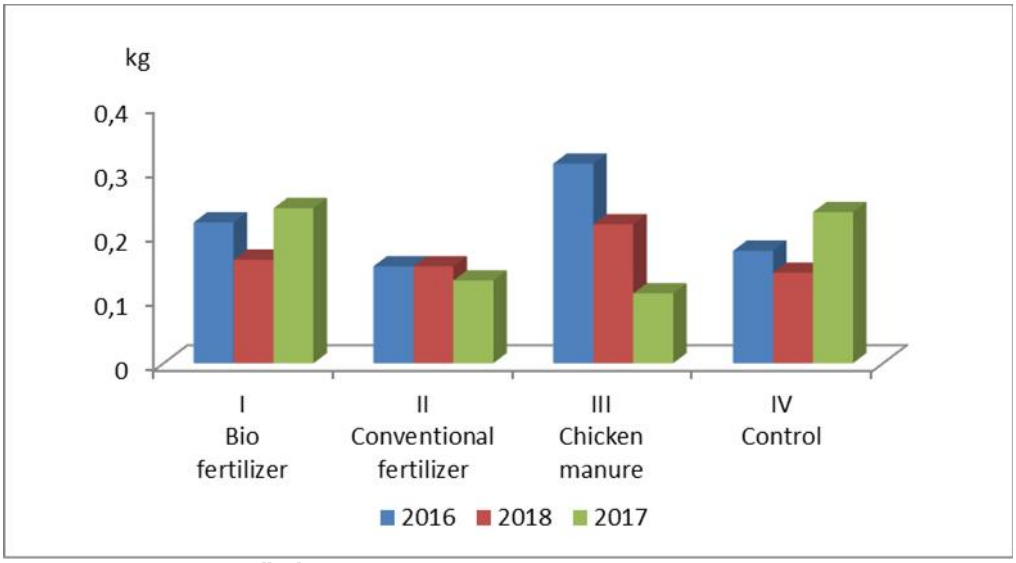
Fig. 1. Dynamics of the quantity (kg) of fresh plums of Elena removed, unfit for consumption, stored under refrigerated conditions for the period 2016-2018

Отчетено е, че през тригодишния опитен период при варианта на конвенционално торене, независимо от количеството на съхраняваните плодове (5;1.5 или 0.5 kg), след 7 и 14 дни на съхранение, липсват или са отстранени минимален брой плодове, негодни за консумация, след което тяхното количество се увеличава.

Проведеното изпитване показва, че най-много плодове, които запазват за по-дълъг период качествените си характеристики при съхранение през 2016г и 2018г. са от варианта на торене с пилешки тор съответно - 0.309 kg и 0.215 kg, а през 2017г. на био торенето - 0.240 kg (Фигура 2). Получените резултати вероятно са повлияни от състава на органичния пилешки тор и био тора Текнокел Амино Са.

It was reported that during the three-year experimental period for the conventional fertilization variant, regardless of the amount of stored fruit (5; 1.5 or 0.5 kg), after 7 and 14 days of storage, a minimum number of unfit fruits were missing or removed after which their quantity increased.

The test shows that most fruits that retained their quality characteristics for a longer period during storage in 2016 and 2018 were in the variant with chicken manure, respectively - 0.309 kg and 0.215 kg, and in 2017 in the organic fertilization variant - 0.240 kg (Figure 2). The results are likely influenced by the composition of the organic chicken manure and biofertilizer Tecnocel Amino Ca.



Фиг. 2. Количество (kg) на пресни сливови плодове от сорт Елена, годни за консумация, след съхранение при хладилни условия за периода 2016-2018г.
Fig. 2. Quantity (kg) of fresh plums of Elena suitable for consumption, after storage under refrigerated conditions for the period 2016-2018

Анализираните биохимически показатели преди и след съхранение на пресни сливови плодове от сорт Елена по години и средно за периода 2016-2018г. са представени в Таблици 1 и 2.

The analyzed biochemical indicators, before and after storage of fresh plums of 'Elena' cultivar by years and on average for the period 2016-2018, are presented in Tables 1 and 2.

Таблица 1. Биохимически състав на пресни сливови плодове сорт Елена, преди съхранение по години и средно за периода 2016-2018г.
Table 1. Biochemical composition of fresh plums of 'Elena' cultivar, before storage by years and on average for the period 2016-2018

	Indicators / Variants	Dry mass, %	Dry in Re, %	Total sugars, %	Invert sugar, %	Sucrose, %	Acids as malic, %	Ascorbic acid, mgL^{-1}	Tannins, %	Anthocyanin, mgL^{-1}	Pectin, %	Acidimetric coefficient
2016	I Biofertilizer	20.46	21.00	14.30	6.00	7.89	0.45	5.28	0.145	13.39	0.91	31.77
	II Conv. fertilizer	18.70	18.00	10.05	5.35	4.47	0.32	5.28	0.145	18.23	0.86	32.81
	III Chicken manure	19.89	20.25	10.40	5.70	4.47	0.45	5.28	0.233	34.52	0.42	23.11
	IV Control	21.02	19.00	10.90	5.35	5.27	0.45	5.28	0.187	18.23	0.94	24.22
	CV %	4.95	6.80	17.17	5.53	29.35	15.57	-	22.22	43.81	30.77	17.94
2017	I Biofertilizer	17.08	22.00	9.90	7.00	2.76	0.48	8.80	0.169	29.03	1.49	20.62
	II Conv. fertilizer	16.68	21.00	12.95	6.35	6.27	0.41	5.28	0.056	6.45	1.19	31.58
	III Chicken manure	18.22	20.00	13.15	7.00	5.84	0.41	7.04	0.094	13.23	1.34	32.07
	IV Control	18.55	19.50	11.10	7.00	3.90	0.48	7.04	0.131	22.26	0.92	23.12
	CV %	5.07	5.37	13.19	4.75	35.16	9.08	20.41	43.15	55.96	19.68	21.76
2018	I Biofertilizer	17.25	18.50	12.95	8.70	4.04	0.45	8.80	0.181	9.84	0.06	28.77
	II Кон. торене	19.05	19.00	13.25	8.20	4.80	0.38	10.56	0.145	8.06	0.06	34.86
	III Chicken manure	16.23	17.00	13.15	8.05	4.85	0.38	12.32	0.072	6.13	0.02	34.60
	IV Control	17.18	18.00	13.65	8.55	4.85	0.51	8.80	0.163	13.06	0.13	26.76
	CV %	8.18	4.69	2.18	3.58	8.42	13.95	16.60	28.57	31.71	66.66	13.12
average	I Biofertilizer	18.26	20.50	12.38	7.23	4.90	0.46	7.63	0.165	17.42	0.82	27.05
	II Conv. fertilizer	18.14	19.33	12.08	6.63	5.18	0.37	7.04	0.115	10.91	0.70	33.08
	III Chicken manure	18.11	19.08	12.23	6.92	5.05	0.41	8.21	0.133	17.96	0.59	29.93
	IV Control	18.92	18.83	11.88	6.97	4.67	0.48	7.04	0.160	17.85	0.66	24.70
	CV %	2.07	3.75	1.72	3.46	4.24	9.3	7.48	14.28	21.33	13.04	12.61

CV - coefficient of variation

На база получените резултати е установено, че стойностите на сухото тегловно вещество преди съхранение на плодовете са в диапазона от 16.23 % (пилешкия тор 2018г.) до 21.02 % (контролата 2016г.) Средната стойност на показателя за изследвания тригодишен период между опитните варианти е 18-19%, а след престой в хладилната камера е 19-20%. Тоест не се наблюдават значителни разлики в стойностите по показателя.

Based on the results, it was found that the values of dry mass before storage of fruits were in the range from 16.23% (chicken manure 2018) to 21.02% (control 2016). The average value of the indicator for the studied three-year period between the experimental variants was 18-19%, and after storage in the refrigerator was 19-20%. That is, there are no significant differences in the values of the indicator.

Таблица 2. Биохимически състав на пресни сливови плодове сорт Елена, след съхранение по години и средно за периода 2016-2018г.
Table 2. Biochemical composition of fresh plums of 'Elena' cultivar, after storage by years and on average for the period 2016-2018.

	Indicators / Variants	Dry mass, %	Dry in Re, %	Total sugars, %	Invert sugar, %	Sucrose, %	Acids as malic %	Ascorbic acid, mgL^{-1}	Tannins, %	Anthocyanins, mgL^{-1}	Pectin, %	Acidimetric coefficient
2016	I Biofertilizer	22.87	21.50	11.45	8.55	2.76	0.32	3.52	0.262	11.93	0.95	35.78
	II Conv. fertilizer	18.75	17.00	12.45	8.35	3.89	0.32	3.52	0.150	1.77	0.71	38.91
	III Chicken manure	22.49	20.00	13.15	8.20	4.70	0.32	5.28	0.206	5.81	0.59	41.09
	IV Control	21.09	19.00	12.30	8.35	3.75	0.39	7.04	0.243	9.84	0.52	31.54
	CV %	8.73	9.70	5.59	1.67	20.95	10.60	34.71	19.04	61.25	27.24	11.24
2017	I Biofertilizer	20.73	17.50	8.20	4.85	3.18	0.55	7.04	0.131	11.94	1.04	14.91
	II Conv. fertilizer	22.50	19.00	9.05	4.70	4.13	0.48	8.80	0.169	11.94	1.60	18.85
	III Chicken manure	19.69	16.00	8.70	4.05	4.42	0.48	7.04	0.150	8.87	1.94	18.13
	IV Control	20.76	17.50	5.70	3.35	2.23	0.48	5.28	0.131	8.39	1.06	11.88
	CV %	5.54	6.97	19.08	16.07	28.36	7.14	20.31	12.41	18.67	31.06	20.07
2018	I Biofertilizer	17.06	19.00	8.20	4.70	3.33	0.51	14.08	0.127	11.77	1.10	16.08
	II Conv. fertilizer	15.69	17.00	8.20	5.85	2.23	0.51	17.60	0.127	12.90	0.60	16.08
	III Chicken manure	17.06	19.00	9.55	7.35	2.09	0.45	8.80	0.145	7.48	0.80	21.22
	IV Control	16.51	18.50	9.05	7.20	1.76	0.51	17.60	0.145	4.52	0.83	17.75
	CV %	3.90	5.14	7.62	19.77	28.93	6.06	28.63	7.35	42.24	24.69	13.61
average	I Biofertilizer	20.22	19.33	9.28	6.03	3.09	0.46	8.21	0.173	8.44	1.03	20.18
	II Conv. fertilizer	18.98	17.67	9.90	6.30	3.42	0.44	9.97	0.149	8.87	0.97	22.67
	III Chicken manure	19.75	18.33	10.47	6.53	3.74	0.42	7.04	0.167	7.38	1.11	25.12
	IV Control	19.45	18.33	9.02	6.30	2.58	0.46	9.97	0.173	7.58	0.80	19.60
	CV %	2.65	3.69	6.62	3.17	15.31	4.26	16.26	6.64	8.68	13.40	11.55

CV - coefficient of variation

По отношение на съдържанието на сухите рефрактометрични вещества, не се отчита влиянието на по-ниските температури при съхранение.

Съгласно Manganaris et al., (2008) най-ревалентния фактор, определящ степента на зрялост при сливовите плодове е количественото им съдържание на захари. В нашето изследване анализираните стойности на биохимическия показател общи захари са разнопосочни. Отчетено е, че в резултат

With regard to the dry matter content of refractometric substances, the effect of lower storage temperatures was not taken into account.

According to Manganaris et al., (2008), the most relevant factor determining the degree of ripeness in plums is their quantitative sugar content. In the present study, the analyzed values of total sugars were diverse.

It is reported that as a result of the low

на ниската температура при съхраняване на сливови плодове, количеството им намалява. Средно за периода на изпитване с високо процентно съдържание на общи захари се отличава варианта на торене с гранулиран пилешки тор, както преди (12.23%), така и след хладилно съхраняване (10.47%). Съгласно Kaulmann et al. (2014), общото съдържание на захари в пресните сливови плодове варира между 8.5 и 19.6g/100g. В посочения от автора диапазон попадат и анализира-ните от нас резултати, средно отчетени за целия период на изпитване, преди и след съхранение.

От тригодишния биохимически анализ е установено, че с всяка следваща опитна година, съдържанието на анализираната инвертна захар се повишава при всички варианти. Най-високи стойности са отчетени при първи вариант (био торене) – през 2016г. – 6.00%; 2017г. – 7.00% и 2018г. - 8.70%.

По отношение показателя захароза, средно за времевия интервал 2016-2018г най-висок процентен резултат е установен при варианта на конвенционално торене – 5.18%. След престой в хладилната камера са отчетени по-ниски резултати по отношение показателите обща, инвертна захар и захароза, но най-високи средни стойности са отчетени при трети вариант, с приложен пилешки тор, съответно 10.47%; 6.53% и 3.74%.

Въпреки характерното намаляване на общата киселинност по време на съхранение при месести плодове Valero et al. (2013), отчетеното средно за периода на изпитване процентно съдържание на органични киселини, преди и след съхранението на плодовете при всички варианти е приблизително 0.40%.

Количествено определената аскорбинова киселина в тях се променя през годините и вариантите от опита, което потвърждава съобщението от Lee and Kader (2000), според които показателя е чувствителен към прило-

temperature during storage of plums, their quantity decreased. On average for the experimental period with a high percentage of total sugars, the variant with granulated chicken manure is distinguished, both before (12.23%) and after refrigerated storage (10.47%). According to Kaulmann et al. (2014), the total sugar content in fresh plums varies between 8.5 and 19.6 g/100g. The range indicated by the author also includes the results analyzed in the present study, reported on average for the entire experimental period, before and after storage.

From the three-year biochemical analysis was found that with each subsequent experimental year, the content of the analyzed invert sugar increased in all variants. The highest values were reported in the first variant (bio fertilizer) - in 2016 - 6.00%; 2017 - 7.00% and 2018. - 8.70%.

Regarding the sucrose, on average for the time interval 2016-2018, the highest percentage was found in the variant of conventional fertilization - 5.18%. After staying in the refrigerator, lower results were reported in terms of total, invert sugar and sucrose, but the highest average values were reported in the third variant with chicken manure, respectively 10.47%; 6.53% and 3.74%.

Despite the characteristic decrease in total acidity during storage in fleshy fruits Valero et al. (2013), the average percentage of organic acids reported for the test period before and after storage of the fruit in all variants was approximately 0.40%.

The quantified ascorbic acid in changes over the years and experimental variants, which confirms the report from Lee and Kader (2000), according to which the indicator is sensitive to the application of nitrogen fertilizers and storage

жението на азотни торове и условията за съхранение след прибиране на реколтата. През тригодишния период на изпитване, след съхранение е регистрирано увеличение на аскорбиновата киселина през 2017г. и 2018 г. от конвенционалното и през 2018 от био торенето. С по-висока средна стойност на показателя за периода се отличават всички опитни варианти, с изключение на трети (с приложение на пилешки тор) при който е анализирано съдържание от 7.04mgL^{-1}.

И през трите години след съхранение процентното съдържание на дъбилни вещества се увеличава. За периода 2016-2018 година при първи вариант (био торене) е отчетена най-висока средна стойност, като преди съхранението на плодовете е 0.165% и след него - 0.173%.

В резултат на анализа е установено, че след съхранение на пресни сливови плодове количеството на антоцианите намалява. Средното им съдържание за изследвания период преди поставянето им в хладилната камера е в интервала от 6.45mgL^{-1} (втори вариант 2017г.) до 34.52mgL^{-1} (трети вариант 2016г.), и след съхранението е в диапазона от 5.81mgL^{-1} (трети вариант 2016г.) до 12.90mgL^{-1} (втори вариант 2018г.).

По отношение на процентното съдържание на пектин в сливовите плодове е установено повишаване на стойностите му, след престоя им в хладилната камера. С най-висок среден резултат на показателя от 1.11% за периода на изпитване се отличава трети вариант на торене, с пилешкия тор.

Общо фенолно съдържание

Общото фенолно съдържание в пресни сливови плодове на сорт Елена, намалява след съхранението им в хладилни условия, при температура от 0 до 4 °C (Фигура 3). Средно за периода на изпитване, най-висок резултат на показателя е установен преди съхранение при варианта с приложение на био торове – 318,68 mg/100gFW. След

conditions after harvest.

During the three-year experimental period, after storage, an increase in ascorbic acid was registered in 2017 and 2018 with the conventional fertilizer and in 2018 in the biofertilizer variant. With a higher average value of the indicator for the period are distinguished all experimental variants, except for the third (with the application of chicken manure) in which the content of 7.04 mgL^{-1} was analyzed.

In all three years after storage, the percentage of tannins increased. For the period 2016-2018 in the first variant (bio fertilizer) the highest average value was reported, as before the storage of the fruit was 0.165%, and after it - 0.173%.

As a result of the analysis it was found that after storage of fresh plums the amount of anthocyanins decreased. Their average content for the studied period before their placement in the refrigerator was in the range from 6.45 mg% (second variant 2017) to 34.52 mgL^{-1} (third variant 2016), and after storage it was in the range of 5.81 mg% (third variant 2016) up to 12.90 mgL^{-1} (second variant in 2018).

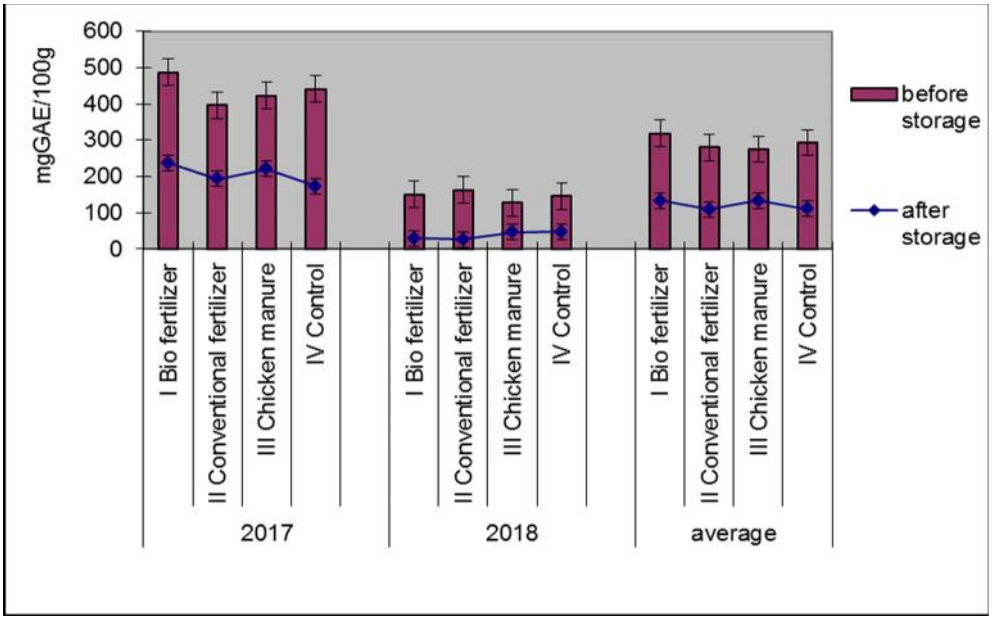
Regarding the percentage content of pectin in plums, an increase in its values was found after their stay in the refrigerator. With the highest average result of 1.11% for the test period, a third variant of fertilization, with chicken manure, is distinguished.

Total polyphenols content

The total polyphenols content in fresh plums of 'Elena' plum cultivar decreased after storage in refrigerated conditions at a temperature of 0 to 4 °C (Figure 3). On average for the test period, the highest result of the indicator was found before storage in the bio fertilizer variant - 318.68 mgGAE/100gFW.

периода на съхраняване, количеството общи полифеноли намалява при всички опитни варианти, като най-силно се проявява при конвенционалното торене и контролата. По-ниското съдържание на общи феноли може да е в резултат на по-ускореното дишане на плодовете, водещо до тяхното разграждане (Niara et al., 2018).

After the storage period, the amount of total polyphenols decreased in all experimental variants, being most pronounced in conventional fertilization and the control. The lower content of total phenols may be due to the faster respiration of fruits, leading to their degradation (Niara et al., 2018).



Фиг. 3. Влияние на различни варианти на торене върху съдържанието на общи полифеноли (mg/100gFW) преди и след съхранение на пресни сливови плодове сорт Елена

Fig. 3. Impact of different fertilization variants on the content of total polyphenols (mgGAE/100gFW) before and after storage of fresh plums of 'Elena' cultivar

Корелационни зависимости между основни биохимически показатели преди и след съхранение на пресни сливови плодове от сорт Елена

Представеният в Таблица 3 корелационен анализ, описващ силата и посоката на зависимост между основни биохимически показатели на пресни сливови плодове на сорт Елена показва, че процентното съдържание на сухо тегловно вещество корелира положително преди съхранение с органичните киселини (r=0.76) и след с дъбилни вещества (r=0.79).

Correlation dependencies between basic biochemical parameters before and after storage of fresh fruit of 'Elena' plum cultivar

The correlation analysis presented in Table 3, describing the strength and direction of dependence between the main biochemical parameters of fresh plums of 'Elena' cultivar, shows that the percentage of dry mass correlates positively before storage with organic acids (r = 0.76) and after storage with tannins (r = 0.79).

Таблица 3. Корелационни зависимости между основни биохимически показатели на пресни сливови плодове от сорт Елена, преди и след съхранение

Table 3. Correlational dependencies between basic biochemical parameters before and after storage of fresh fruit of 'Elena' plum cultivar

	Dry weight, %	Dry in Re, %	Total sugars, %	Invert sugar, %	Sucrose, %	Acids as malic, %	Ascorbic acid, mgL^{-1}	Tannins, %	Anthocyanins mgL^{-1}	Pectin, %	Acidimetric coefficient
Before storage											
Dry mass, %	1,00										
Dry in Re, %	-0,40	1,00									
Total sugars, %	-0,73	0,82	1,00								
Invert sugar, %	0,22	0,61	0,50	1,00							
Sucrose, %	-0,91	0,12	0,40	-0,60	1,00						
Acids as malic, %	0,76	0,14	-0,13	0,80	-0,96	1,00					
Ascorbic acid, mgL^{-1}	-0,54	0,17	0,68	0,37	0,24	-0,07	1,00				
Tannins, %	0,60	0,38	0,11	0,91	-0,86	0,97	0,02	1,00			
Anthocyanins, mgL^{-1}	0,39	0,03	0,16	0,79	-0,70	0,79	0,53	0,77	1,00		
Pectin, %	-0,06	0,89	0,48	0,50	-0,09	0,26	-0,28	0,45	-0,12	1,00	
Acidimetric coefficient	-0,81	-0,03	0,21	-0,74	0,98	-0,99	0,08	-0,94	-0,80	-0,17	1,00
After storage											
Dry weight, %	1,00										
Dry in Re, %	0,96	1,00									
Total sugars, %	-0,16	-0,41	1,00								
Invert sugar, %	-0,42	-0,63	0,73	1,00							
Sucrose, %	-0,04	-0,25	0,96	0,51	1,00						
Acids as malic, %	0,21	0,47	-0,98	-0,83	-0,90	1,00					
Ascorbic acid, mgL^{-1}	-0,68	-0,46	-0,60	-0,28	-0,63	0,57	1,00				
Tannins, %	0,79	0,79	-0,47	-0,24	-0,49	0,41	-0,36	1,00			
Anthocyanins, mgL^{-1}	-0,27	-0,11	-0,14	-0,60	0,06	0,28	0,45	-0,63	1,00		
Pectin, %	0,41	0,21	0,78	0,20	0,89	-0,68	-0,85	-0,14	0,03	1,00	
Acidimetric coefficient	-0,18	-0,43	1,00	0,78	0,94	-1,00	-0,59	-0,44	-0,21	0,74	1,00

Силно положителна и статистически значима за ниво на значимост 0.05, корелация е отчетена след престоя на плодовете в хладилната камера между количеството общи захари и захароза (r=0.96).

Биохимическият показател инвертна захар в плодовете от сорта, преди съхранение е в корелационна зависи-

Highly positive and statistically significant for a significance level of 0.05, a correlation was reported after storage of fruit in the refrigerator between the amount of total sugars and sucrose (r = 0.96).

The invert sugar before storage correlated with organic acids (r = 0.80), tannins (r = 0.91) and anthocyanins

мост с органични киселини (r=0.80), дъбилни вещества (r=0.91) и антоциани (r=0.79).

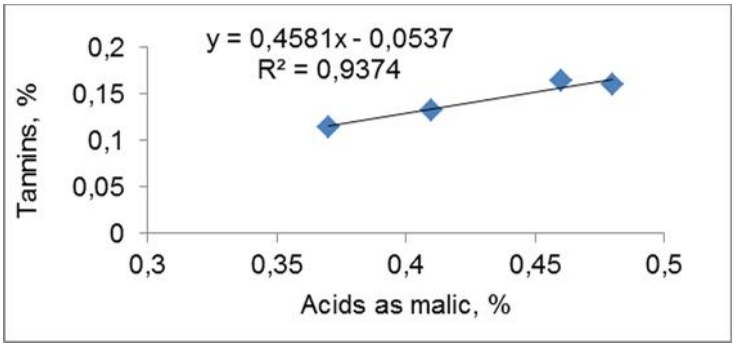
Преди и след съхранение на плодовете, показателят захароза корелира силно положително с ацидимитричен коефициент, (r=0.98; r=0.94) и силно отрицателно с киселини, (r=-0.96; r=-0.90).

Определената висока корелационна зависимостта между процентното съдържание на дъбилни вещества и киселини в пресни сливови плодове от сорт Елена, преди съхранение при хладилни условия (r=0.79) позволява да се изведе представеното на Фигура 4 регресионното уравнение y=0.4581x-0.0537, при коефициент на детерминация R^2=0.94.

(r = 0.79).

Before and after fruit storage, sucrose correlated strongly positively with acidimetric factor (r = 0.98; r = 0.94) and strongly negatively with acids (r = -0.96; r = -0.90).

The determined high correlation between the percentage of tannins and acids in fresh plums of 'Elena', before storage under refrigeration conditions (r = 0.79) allows to deduce the regression equation presented in Figure 4 y = 0.4581x-0.0537, with a coefficient of determination R^2= 0.93.



Фиг. 4. Регресионна зависимост между процентното съдържание на дъбилни вещества и киселини в пресни сливови плодове от сорт Елена, преди съхранение при хладилни условия след приложение на биологични и конвенционални торове

Fig. 4. Regression dependence between the percentage of tannins and acids in fresh plums of Elena plum cultivar, before storage under refrigerated conditions after application of organic and conventional fertilizers.

ИЗВОДИ

Проследено е влиянието на някои биологични и конвенционални торове върху биохимическия състав на плодовете, както и промените на показателите и качеството им след проведеното съхранение.

Отчетено е, че максималното съхранение на плодове при температурния диапазон от 0 до 4 °C е до 35 дни.

С най-добри сетивни характеристики и качество за консумация, през

CONCLUSIONS

The impact of some biological and conventional fertilizers on the biochemical composition of plum fruits, as well as the changes of the indicators and their quality after storage have been observed.

It is reported that the maximum storage of fruits ranged from 0 to 4 °C was up to 35 days.

With the best sensory characteristics and quality for

изследвания период са пресните сливи от вариантите на торене с пилешкия тор и био торенето.

След съхранение на плодовете в хладилни условия, стойностите на биохимическите показатели обща, инвертна захар и захароза се понижават.

Увеличение е установено при процентното съдържание на дъбилни вещества и пектин, най-силно проявено при вариантите на торене с пилешкия тор (0.167 %; 1.11%) и био торенето (0.173%; 1.03%).

consumption, during the studied period are fresh plums treated with chicken manure and organic fertilization.

After staying in refrigerated conditions, the amount of biochemical indicators decreased, such as total, invert sugar and sucrose in fruit.

An increase was found in the percentage of tannins and pectin, most pronounced in the variants with chicken manure (0.167%; 1.11%) and bio fertilizer (0.173%; 1.03%).

БЛАГОДАРНОСТИ

Тази работа е подкрепена от Министерство на образованието и науката по Националната програма за научни изследвания „Млади учени и постдокторанти“

ACKNOWLEDGEMENTS

This work is supported by the Bulgarian Ministry of Education and Science under the National Program for Research "Young Scientists and Postdoctoral Students".

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Abdi, N., P. Holford and W. B. Glasson**, 1997. Effects of Harvest Maturity on the Storage Life of Japanese-type Plums. *Aust. J. Exp. Agric*., 37, 391-397.
2. **Ariona, Cr., J. Tabartb, Cl. Keversb, M. Niculauac, R. Filimona, D. Beceanua and J. Dommesb**, 2014. Antioxidant Potential of Different Plum Cultivars during Storage. *Food Chemistry*, 146, 485-491.
3. **Auger, C., N. Al-awwadi, A. Bornet, J. M. Rouanet, F. Gasc, G. Cros and P. L. Teissedre**, 2004. Cate-chins and Procyanidins in Mediterranean Diets. *Food Res. Int.*, 37 (3), 233-245.
4. **Barbosa-Canovas, G., P. Juliano and M. Peleg**, 2006. Food Engineering. EOLSS Press, Oxford (UK).
5. **Brizzolara, S, G. A. Manganaris, V. Fotopoulos, C. B. Watkins and P. Tonutti**, 2020. Primary Metabolism in Fresh Fruits during Storage. *Front. Plant Sci.* 11:80.doi: 10.3389/fpls.2020.00080.
https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2020.00080/full
6. **Cautín, R. and M. Agustí**, 2005. Phenological Growth Stages of the Cherimoya Tree (*Annona cherimola* Mill.). *Sci. Hortic.,* 105, 491-497.
7. **Cevallos-Casals, B., D. Byrne, W. R. Okie, and L. Cisneros-Zevallos**, 2006. Selecting New Peach and Plum Genotypes Rich in Phenolic Compounds and Enhanced Functional Properties. *Food Chem.*, 96, 27-280.
8. **Crisosto, C. H. and F. G. Mitchell**, 2002. Postharvest Handling Systems: Table Grapes. In: AA. Kader (Ed.) Postharvest Technology of Horticultural Crops, 357-363.
9. **Crisosto, C. H., D. Garner, G. M. Crisosto and E. Bowerman**, 2004. Increasing ‘Blackamber’ Plum (*Prunus salicina* Lindell) Consumer Acceptance. *Postharvest Biol. Technol.*, 34, 237-244.
10. **Dimitrova, F. and M. Borisova**, 2007. Agrochemical Aspects of Soil Fertility during Long-term Mineral Fertilization. Scientific reports, International Conference Soil Science - a basis for sustainable agriculture and the environment. Sofia, Bulgaria, pp. 324-327.

11. **Gitea, M., D. Gitea, D. Tit, L. Purza, A. Samue, S. Bungău, G. Badea and L. Aleya**, 2019. Orchard Management under the Effects of Climate Change: Implications for Apple, Plum and Almond Growing. *Environmental Science and Pollution Research*. https://doi.org/10.1007/s11356-019-04214-1
12. **Guerra, M., M. A. Sanz and P. A. Casquero**, 2009. Influence of Harvest Dates on Quality, Storage Capacity and Sensory Attributes of European Plum cv. Green Gage. *Food Science and Technology International*, 15 (6), 527-534.
13. **Kaulmann, A., M. C. Jonville, Y. J. Schneider, L. Hoffmann and T. Bohn**, 2014. Carotenoids, Polyphenols and Micronutrient Profiles of Brassica oleraceae and plumvarieties and Their Contribution to Measures of Total Antioxidant Capacity. *Food Chemistry*, 155, 240-250.
14. **Lee, S. K. and A. A. Kader**, 2000. Preharvest and Postharvest Factors Influencing Vitamin C Content of Horticultural Crops. *Postharv. Biol. Tec.*, 20, 207-220.
15. **Manganaris, G.A., A. R. Vicente and C. H. Crisosto**, 2008. Effect of Pre-harvest and Post-harvest Conditions and Treatments on Plum Fruit Quality. CAB reviews: perspectives in agriculture, veterinary science, nutrition and natural resources, pp. 1-9.
16. **Milošević, T. and N. Milošević**, 2012. Factors Influencing Mineral Composition of Plum Fruits. *Journal of Elementology*, 17 (3), 453-464.
17. **Moyer, R. A., K. E. Hummer, C. E. Finn, B. Frei and R. E. Wrolstad**, 2002. Anthocyanins, Phenolics, andantioxidant Capacity in Diverse Small Fruits: Vaccinium, Rubus and Ribes, *J. Agric .Food Chem.,* 50 (3), 519-525.
18. **Naira, M. S., A. Saxenaa, and C. Kaur**, 2018. Effect of Chitosan and Alginate Based Coatings Enriched with Pomegranate Peel Extract to Extend the Postharvest Quality of Guava (*Psidium guajava* L.), *Food Chem.*, 240, 245-252.
19. **Popović, B., V. Tešević, O. Mitrović, M. Kandić, A. Leposavić, I. Glišić and N. Milošević**, 2018. Analytical Indicators of Plum Fruit Sensory Characteristic Changes after Seven-day Storage at Room Temperature. *Agrofor International Journal*, 3 (2), 49-55.
20. **Radev, R.**, 2017. Use of Pectin Coatings for Fresh Fruits and Vegetables. International Scientific Conference on Engineering, Technologies and Systems Techsys, Technical University – Sofia. Plovdiv, Bulgaria, pp. 395-398.
21. **Rato, A. E., A. C. Agulheiro, J. M. Barroso, and F. Riquelme**, 2008. Soil and Rootstock Influence on Fruit Quality of Plums (*Prunus Domestica* L.). *Sci Hortic-Amsterdam,* 118 (3), 218-222.
22. **Robbins, R. J.**, 2003. Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2866-2887.
23. **Simon-Graoa, S., V. Gimeno, I. Simon, V. Lidonc, M. Nieves, R. M. Balal and F. Garcia-Sanchez**, 2014. Fruit Quality Characterization of Eleven Commercial Mandarin Cultivars in Spain. *Scientia Horticulturae*, 165, 274-280.
24. **Valero, D, H. M. Mula-Diaz and P. J. Zapat**a, 2013. Effect of alginate Edible Coating on Preserving Fruit Quality in Four Plum Cultivars during Postharvest Storage. *Postharvest Biol Technol.*, 77: 1-6. doi: 10.1016/j.postharvbio.2012.10.011. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925521412002402?via%3Dihub