Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2020, 23 (4), 207-229
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan
ISSN 1311-0489 (Print)
ISSN 2367-8364 (Online)

Подробен масспектрометричен анализ (GC-MS) на етерично масло от *Salvia sclarea* L. и първа *in vitro* оценка на противогъбична активност срещу растителен патоген *Colletotrichum acutatum* на J.H. Simmonds

Соня Филипович[1]*, Таня Васич[2], Нико Радулович[1], Ивана Станоевич[2], Дарко Йевремович[3]

[1]*Катедра по химия, Факултет по науки и математика, Нишки университет, Вишеградска 33, 18000 Ниш*, Република Сърбия
[2]*Селскостопански факултет, Нишки университет, Косанчичева 4, 37000 Крушевац*, Република Сърбия
[3]*Изследователски институт по овощарство,"Краля Петра I" 9, 32000 Чачак, Република Сърбия*

Detailed GC-MS Analysis of the *Salvia sclarea* L. Essential Oil and the First *in vitro* Antifungal Activity Assessment against Crop Pathogen *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds

Sonja Filipović[1]*, Tanja Vasić[2], Niko Radulović[1], Ivana Stanojević[2], Darko Jevremović[3]

[1]*Department of Chemistry, Faculty of Sciences and Mathematics, University of Niš, Višegradska 33, 18000 Niš, Republic of Serbia*
[2]*Faculty of Agriculture Kruševac, University of Niš, Kosančićeva 4, 37000 Kruševac, Republic of Serbia*
[3]*Fruit growing Institute Čačak, Kralja Petra 9, 32 000 Čačak, Republic of Serbia*

**E-mail: sonjafilipovic86@yahoo.com*

Original scientific paper

РЕЗЮМЕ

Род *Salvia* L. (*Lamiaceae*) включва около 900 вида, широко разпространени в целия свят. *Salvia sclarea* L., един от най-ценните представители на род *Salvia*, е двугодишен двусемеделен храст, родом от районите на Южна Европа, но култивиран в целия свят като източник на етерично масло. Дългогодишната му употреба като традиционно лекарство (антисептично, противовъзпалително, стомашно, храно-

SUMMARY

The genus *Salvia* L. (*Lamiaceae*) comprises about 900 species widespread throughout the world. *Salvia sclarea* L., Clary Sage, one of the most appreciated representative of genus *Salvia*, is a biennial dicot shrub, native to southern Europe regions, but cultivated all over the world as a source of essential oil. Long history of use as a traditional medicine (antiseptic, anti-inflammatory, stomachic, digestive etc.) is further supported in the

смилателно и др.) е подкрепена допълнително от многобройни научни изследвания (Foray et al., 1999; Pitarokili et al., 2002). Оценката на скоростта на вторичния метаболизъм, промяната в качествата и количествата на елементите в етеричното масло и по-специално основните активни вещества, които засягат биологичните дейности, е съществена (Hudaib et al., 2001). Установено е, че химичният състав на етеричното масло от *S.sclarea* е силно повлиян от генетични и екологични фактори, възраст на органите, климатични условия и сезонност. Представени са резултати от подробни анализи на съставките в етерично масло от надземни части на *S. sclarea*. Растителен материал, добит във фаза на пълен цъфтеж от южни райони на Сърбия, дава прозрачно, жълтеникаво ароматно етерично масло. Последващи щателни GC и GC-MS анализи позволяват идентифицирането на повече от 60 съставки, сред които доминиращи са линалилацетат (43.17%), линалол (15.8%), гермакрен D (9.73%), кариофилен (5.13%) и склареол (1.43%). Заедно с определянето на вторичния метаболитен профил на сръбското етерично масло от *S.sclarea*, потенциалът на градинския чай като средство за растителна защита е оценен чрез интензивността на спорообразуване и нарастване на мицела на *Colletotrichum acutatum* JH Simmonds C.A.2 изолати, причиняващи антрахноза, *in vitro*.

Ключови думи: *Salvia sclarea*, градински чай, етерично масло, противогъбично, *Colletotrichum acutatum*

numerous scientific studies (Foray et al., 1999; Pitarokili et al., 2002). Evaluation of secondary metabolism rate, modification in the qualities and quantities of essential oil constituents, and in particular the principal active ones affecting the biological activities is fundamental (Hudaib et al., 2001). The chemical composition of the essential oil of *S. sclarea* was found to be highly influenced by genetic and environmental factors, organ age, climate conditions, and seasonality. Herein, we present the results of detailed analyses of the essential oil constituents of the commercial sample of *S. sclarea* aerial parts. Plant material, harvested at full flowering stage from southeastern Serbian regions, yielded a transparent, yellowish fragrant essential oil. Subsequent meticulous GC and GC-MS analyses enabled the identification of more than 60 constituents, among which linalyl acetate (43.17%), linalool (15.8%), germacrene D (9.73%), caryophyllene (5.13%) and sclareol (1.43%) were the dominant ones. Together with the secondary metabolite profile, determination of the Serbian *S. sclarea* essential oil agricultural plant protection potential was estimated by assessing sporulation intensity and mycelia growth of *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds C.A.2 isolates, causative of strawberry antrachnose, *in vitro*.

Key words*: Salvia sclarea*, Clary Sage, essential oil, antifungal, *Colletotrichum acutatum*

УВОД

Salvia L. е част от вид *Mentheae* в подсемейство *Nepetoideae* от семейство *Lamiaceae* с около 900 силно разнородни вида. *Salvia sclarea* L., е един от търговските представители в род *Salvia*, използван в парфюмерийната индустрия, производството на безалкохолни напитки и алкохолни напитки, произхождащ от средиземноморските страни,

INTRODUCTION

Salvia L. is part of the tribe Mentheae within the subfamily Nepetoideae of *Lamiaceae* with about 900 highly heterogeneous species. *Salvia sclarea* L., Clary Sage, is one of the commercial representatives in the genus *Salvia*, used in the perfumery industry, soft drink and liquor production, native to Mediterranean countries, North Africa and

Северна Африка и Централна Азия, но в наши дни се култивира по целия свят (Werker et al., 1985). Този вид, чието име произлиза от латинската дума *salvere*, което означава „лекувам“, има дълга история в употребата си като традиционно лекарство под формата на отвара или настойка с антисептични, противовъзпалителни, благоприятстващи стомаха и храносмилателната система влияния и отхрачващи свойства (Foray et al., 1999; Pitarokili et al., 2002). Етеричното масло (ЕО), получено както от диви, така и от култивирани форми, е доказано ефективно от многобройните научни изследвания за лечение на тревожни състояния (Setzer, 2009), притежава антиоксидантно, антибактериално (Jirovetz et al., 2006; Kuzma et al., 2009), противогъбично (Pitarokili et al., 2002; Fraternale et al., 2005; Jirovetz et al., 2007; Džamić et al., 2008), антималарийно (Özek et al., 2010), антихолинестеразно (Orhan et al., 2008), антивирусно (Dikova, 2009) и опиоидно въздействие (Çınar et al., 2011). Установено е, че химическият състав на етеричното масло от *S. sclarea* е силно повлиян от генетични и екологични фактори, възраст на организма, климат условия и сезонност. Оценка на модификацията на вътрешновидовия химичен полиморфизъм в качеството и количеството на съставките на етеричното масло, и по-специално на активните съединения, са от значение, тъй като според USP, BP и европейските фармакопеи, е необходим контрол на качеството на етеричните масла от медицински растения.

Colletotrichum acutatum J.H. Simmonds е растителен патоген, заразяващ както корена, така и короната на ягодите (Fragaria × ananassa Duchesne, Rosaceae), причинявайки некроза, проявяваща се върху плодове, филизи, листа и цветни стъбла (Freeman and Katan, 1997, Freeman et al., 2002). Тази гъбичка може да атакува растението на всички етапи от развитието, причинявайки значителни производствени загуби в

central Asia, but nowadays cultivated worldwide (Werker et al., 1985).

This species, with its name derived from the Latin *salvere* meaning to "heal", has a long history of use as a traditional medicine in the form of decoction or infusion with antiseptic, anti-inflammatory, stomachic, digestive and anticatarrhal properties (Foray et al., 1999; Pitarokili et al., 2002).

Essential oil (EO) obtained from both wild and cultivated forms is proven effective through the numerous scientific studies in the treatment of anhyolitic effects (Setzer, 2009), antioxidant, antibacterial (Jirovetz et al., 2006; Kuzma et al., 2009), antifungal (Pitarokili et al., 2002; Fraternale et al., 2005; Jirovetz et al., 2007; Džamić et al., 2008), antimalarial (Özek et al., 2010), anticholinesterase (Orhan et al., 2008), antiviral (Dikova, 2009) and opioid receptors activities (Çınar et al., 2011). The chemical composition of the essential oil of *S. sclarea* was found to be highly influenced by genetic and environmental factors, organ age, climate conditions, and seasonality. Evaluation of intra-species chemical polymorphism modification in the qualities and quantities of essential oil constituents, and in particular the principal active ones are of significance since, according to USP, BP and European pharmacopoeias, the quality control of the essential oils from medicinally important plants is the necessity.

Colletotrichum acutatum J.H. Simmonds is a plant pathogen infecting both the root and crown of strawberries (*Fragaria* × *ananassa* Duchesne, Rosaceae), causing necrosis manifested on fruits, stolons, leaf and flower stems (Freeman and Katan, 1997, Freeman et al., 2002). This fungus can attack the plant at all stages of development causing significant production losses worldwide, both before and after harvesting.

световен мащаб, както преди, така и след прибиране на реколтата (Freeman and Shabi, 1996; Talhinhas et al., 2011). От първия случай на антракноза, регистриран в Европа през 1984 г. (Talhinhas et al., 2011), болестта присъства в Австралия, Нова Зеландия, Обединеното кралство, САЩ, както и в различни страни в Азия, Африка и Южна Америка, от дълго време. Понижаване на добива с над 80%, поради появата на този патоген, се наблюдава в Сърбия, когато за първи път е установено присъствието на C. *acutatum* при ягодите (Ivanović et al., 2005). Освен този основен гостоприемник, C. *acutatum* може да присъства и в други важни за селското стопанство видове, като Malus sp., (Rosaceae), Oleaeuropaea L., (Oleaceae), *Piper* sp. (Piperaceae) и много други, показващи цялостната му патогенна значимост (Lee et al., 2007; Peres et al., 2008; Polashock et al., 2009; Talhinhas et al., 2011). Контролът на причинителя на антракноза, C. *acutatum*, е насочен предимно към прилагане на налични синтетични агенти. Нарастващите нужди от здравословна храна обаче ограничават употребата на синтетични пестициди и поражда нуждата от нови, ефикасни и безопасни противогъбични средства, използвани срещу много устойчиви щамове. Пестицидите от билков произход получават значително внимание, тъй като представляват изобилен източник на разнообразни биоактивни съединения, без никакво или слабо вредно въздействие върху нецелевите организми и околната среда. Освен това съставките на ЕО са идентифицирани като алелохимични, ограничавайки растежа на конкурентни растения в околната среда, което е друго предимство на тяхното използване (Ulukanili et al., 2018). В настоящото проучване са посочени резултатите от подробните GC-MS анализи на етеричните съставки на *Salvia sclarea* L., произхождащи от югоизточните райони на югоизточна Сърбия, за да се определи качествения

(Freeman and Shabi, 1996; Talhinhas et al., 2011,). Since the first anthracnose, recorded in Europe in 1984 (Talhinhas et al., 2011), the disease has been present in Australia, New Zealand, United Kingdom the United States as well as in various countries in Asia, Africa and South America, for a long time. Yield reductions of over 80%, due to the occurrence of this pathogen, were observed in Serbia when the presence of *C. acutatum* on strawberries was first established (Ivanović et al., 2005).

Besides this main host, *C. acutatum* can also be present in other species important for agriculture, such as *Malus* sp., (Rosaceae), *Oleaeuropaea* L., (Oleaceae), *Piper* sp. (Piperaceae), and many others indicating its overall pathogenic relevance (Lee et al., 2007; Peres et al., 2008; Polashock et al., 2009; Talhinhas et al., 2011). The control of the anthracnose causative agent, *C. acutatum*, is primarily aimed at applying available synthetic agents. However, the increasing requires for healthy food limits the use of synthetic pesticides and raises the need for new, efficient and safe, antifungal agents used against multi-resistant strains. Pesticides of herbal origin have received substantial attention since they represent a prolific source of a variety of bioactive compounds, with no or little harmful effect on non-target organisms and the environment.

Furthermore, EOs constituents are identified as allelohemical, limiting the growth of competing plants in the surrounding environment, which is another advantage of their usage (Ulukanili et al., 2018). In the present study, we report on the results of the detailed GC-MS analyses of the *Salvia sclarea* L.essential oil constituents, originating from the southeastern Serbian regions, in order to determine qualitative and quantitative composition of the essential oil and evaluate the secondary

и количествен състав на етеричното масло и да се оцени скоростта на вторичния метаболизъм. Заедно с вторичния метаболитен профил, определянето на потенциала за растителна защита на етеричното масло от Салвия склерея спрямо C.A.2 изолати на *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds, причинител на антракноза по ягодите, е установен *in vitro* чрез оценка на интензивността на спорообразуване и растежа на мицела.

metabolite rate in the sense of the modification in essential oil constituents.

Together with the secondary metabolite profile, determination of the agricultural plant protection potential of Clary Sage essential oil on *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds C.A.2 isolates, causative of strawberry antrachnose, *in vitro*, is estimated by assessing sporulation intensity and mycelia growth.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

1. Растителен материал

В настоящето изследване е използвана търговска проба от етерично масло от култивирана *Salvia sclarea* L. с произход от Crvena reka, Югоизточна Сърбия (географска ширина: 43°59'7.44", дължина: 19°57'20.41", надморска височина: 268 m).

2. GC-MS анализ

Мас-спектралният анализ е отчетен с газов хроматограф на Hewlett-Packard 6890N, снабден с капилярна колона от разтопен кварц DB-5MS (5% дифенил, 95% диметилполисилоксан, 30 m × 0.25 mm, дебелина на филма 0.25 µm, Agilent Technologies, Lexington, USA) и в комбинация с масов селективен детектор 5975B от същата компания. Инжекторът и интерфейсът работят съответно при 250 °C и 300 °C. Температурата на фурната е повишена от 70 на 290 °C при скорост на нагряване 5 °C/min; програмата за нагряване завърши с изотермичен период от 10 минути. За газ-носител е използван хелий (He) с 1.0 mL/min. Пробите, 1 µl от подходящи разтвори в диетилов етер (1 mg/ml), се инжектират в режим без разделяне. Условията на MS са както следва: йонизационно напрежение 70 eV, обхват на масата на придобиване 35-650, време на сканиране 0.32 s.

3. Определяне на съединенията

Съставните части на етеричните масла са определени чрез използване на техните индекси на задържане,

MATERIAL AND METHODS

1. Plant material

A commercial sample of the essential oil of cultivated *Salvia sclarea* L. originating from Crvena reka, southeastern Serbia (latitude: 43°59'7.44", longitude: 19°57'20.41", altitude: 268 m) was utilized in this work.

2. GC-MS analysis

Mass spectra were recorded on a Hewlett-Packard 6890N gas chromatograph equipped with a fused silica capillary column DB-5MS (5% diphenyl, 95% dimethylpolysiloxane, 30 m × 0.25 mm, film thickness 0.25 µm, Agilent Technologies, Lexington, USA) and coupled with a 5975B mass selective detector from the same company. The injector and interface were operated at 250 °C and 300 °C, respectively. Oven temperature was raised from 70 to 290 °C at a heating rate of 5 °C/min; the heating program ended with an isothermal period of 10 min. As carrier gas helium, He, at 1.0 mL/min was used. The samples, 1 µl of the appropriate solutions in diethyl ether (1 mg/mL) were injected in a splitless mode. MS conditions were as follows: ionization voltage of 70 eV, acquisition mass range 35-650, scan time 0.32 s.

3. Identification of compounds

The constituents of the essential oils were identified by using their retention indices, calculated by linear interpolation

изчислени чрез линейна интерполация спрямо периодът на задържане на серия от n-алкани, и техните мас-спектри на споменатата преди това колона DB-5 при същите хроматографски условия. Идентифицирането на отделни съединения е извършено чрез сравняване на техните мас-спектри с тези на вътрешната референтна библиотека, с мас-спектрите на банката данни (Wiley 7N and NIST/NBS libraries) или с автентични съединения и потвърдени чрез сравнение на техните индекси на задържане (използвайки обобщено уравнение от Van Del Dool et al., 1963 и Adams, 2007) с автентични съединения или с предишни литературни доклади. Относителните количества на отделните компоненти са изчислени въз основа на GC-MS пикови области без корекция на коефициента на реагиране на детектора за пламъчна йонизация (FID), ако се приеме, че всички имат идентичен отговор.

4. Противогъбично действие

4.1. Тестов организъм

В настоящия експеримент е използван изолат на *C. acutatum* J.H. Simmonds (C.A.2) получен от *Fragaria* × *ananassa* (Weston) Duchesne ex Rozier, Rosaceae, отглеждани в Сърбия. Изолатът се определя въз основа на морфологични, патогенни и молекулярни характеристики и се поддържа върху картофено-декстрозен агар (PDA) при температура 25 °C.

4.2. Въздействие на летливата фаза на етерично масло върху растежа на изолати Colletotrichum acutatum

Противогъбичната активност на етеричните масла е изследвана в петриеви блюда с PDA с диаметър 90 mm. Субстратите са инокулирани чрез засяване на мицелни фрагменти от изолати, взети от края на култури на възраст седем дни. Маслата са приложени под формата на капки, поставени във вътрешността на капака на петриевото блюдо в концентрации от 0.02, 0.04,

relative to retention times of a series of *n*-alkanes, and their mass spectra on a previously mentioned DB-5 column under the same chromatographic conditions.

Identification of individual compounds was made by comparison of their mass spectra with those of the internal reference mass spectra library, with the data bank mass spectra (Wiley 7N and NIST/NBS libraries) or with authentic compounds, and confirmed by comparison of their retention indices (using the generalized equation by Van Del Dool et al., 1963 and Adams, 2007) with authentic compounds or with previous literature reports. For quantification purpose, relative amounts of individual components were calculated based on GC-MS peak areas without FID response factor correction by assuming a unity response by all.

4. Antifungal activity

4.1. Test organism

In this experiment, the used isolate of *C. acutatum* J.H. Simmonds (C.A.2) was obtained from *Fragaria* × *ananassa* (Weston) Duchesne ex Rozier, Rosaceae grown in Serbia. The isolate was determined based on morphological, pathogenic and molecular characteristic, and maintained on a potato-dextrose agar (PDA) at the temperature of 25 °C.

4.2. Effect of volatile phase of essential oil on the growth of Colletotrichum acutatum isolates

The antifungal activity of essential oils was tested on PDA in Petri dishes 90 mm in diameter. Substrates were inoculated by sowing mycelial fragments of isolates taken from the edge of cultures aged seven days.

The oils were applied in the form of drops placed in the inside of the lid of the Petri dish in concentrations of 0.02, 0.04, 0.08

0.08 и 0.16 µL/ml на въздух. Веднага след нанасянето на маслата, петриевите блюда са обърнати и запечатани с парафилмова лента, за да се предотврати загубата от изпаряване. Излагането на изолатите на изследваните масла на пара продължи седем дни при 25 °C. Анализът е извършен в четири повторения за всяка концентрация на масло. Изолатите отглеждани в среда с добавен фунгицид Метод 480 SC (a.m. Captan, Galenika phytopharmacy) са използвани като вариант за положителен контрол. Фунгицидният метод 480 SC се прилага в концентрация, препоръчана за практическо приложение, разрежда се в стерилна вода и се хомогенизира с магнитна бъркалка. По същия начин, вариантът за отрицателна контрола, гъбични изолати, отглеждани в PDA, са използвани при идентични условия без описаното третиране (Grahovac, 2014).

Седем дни след третирането, ефектът от етеричните масла е представен чрез процента на инхибиране на растежа на мицела, в сравнение с контролите. Най-ниската концентрация с ефект на пълно инхибиране на растежа на изолат се определя като минимална инхибиторна концентрация (MIC). След оценката, петриевите блюда, в които растежът на изолата е напълно спрял, са отворени и проветрени на въздушен поток в ламинарна камера в продължение на 30 минути, за да се отстрани газообразната фаза на маслото и да се определи леталния ефект. Смята се, че определена концентрация на масло проявява смъртоносен ефект, ако не се забележи първоначален растеж на изолата седем дни след вентилация. Най-ниската въздушна концентрация е определена като минимална летална концентрация (MLC) (Grahovac, 2014). Резултатите, получени по време на изследването, са обработени чрез дисперсионен анализ (ANOVA) със статистическата програма StatSoft STATISTICA 8.0. Тестът на Дънкан е

and 0.16 µL/mL of air. Immediately after applying the oils, the Petri dishes were reversed and sealed with parafilm tape to prevent vapour loss.

Exposure of the isolates to the vapours of the studied oils lasted seven days at 25 °C. The assay was performed in four replicates for each oil concentration. The isolates grown on the medium with added fungicide Method 480 SC (a.m. Captan, Galenika phytopharmacy) were used as the positive control variant.

The Fungicide Method 480 SC was applied at a concentration recommended for practical application, diluted in sterile water and homogenized on a magnetic stirrer. Similarly, the negative control variant, fungi isolates grown on PDA were used under identical conditions without the described treatment (Grahovac, 2014).

Seven days after the treatment, the effect of essential oils was represented by the percentage of inhibition of mycelial growth, compared to the controls. The lowest concentration with the effect of complete inhibition of isolate growth was defined as the minimum inhibitory concentration (MIC). After the evaluation, Petri dishes, in which the growth of the isolate was completely stopped, were opened and ventilated under a stream of air in the laminar chamber for 30 minutes to remove the gaseous phase of the oil and determine the lethal effect.

It was considered that a certain concentration of oil exhibits a lethal effect if no initial growth of the isolate was noted seven days after ventilation. The lowest airborne effect concentration was defined as the minimum lethal concentration (MLC) (Grahovac, 2014).

The results obtained during the research were processed by ANOVA analysis with the statistical program StatSoft STATISTICA 8.0. Duncan's test was conducted to

проведен, за да се анализира разликата между различните предварителни третирания. Стойност от P = 0.05 се счита за статистически значима.

4.3. Определяне на нивото на спорообразуване

Десет дни след третирането се определя влиянието на етеричните масла върху нивата на спорообразуване на *C. acutatum*. Определянето на нивата на спорообразуване се извършва с помощта на хемоцитометър Thom. За тази цел се приготвя суспен-зия от спори чрез добавяне на 5 ml дестилирана вода към петриево блюдо с култура от изолат C.A.2 (*C. acutatum* J.H. Simmonds). След това блюдото е наблюдавано под микроскоп (Vasic, 2007). Нивото на спорообразуване се изразява според скалата от Quesada и Lopez (1980), където: + = лошо спорообразуване (<5.000 спори/ml), ++ = средно спорообразуване (5.000 - 10.000 спори/ml) и +++ = обилно спорообразуване (> 10000 спори/ml). Експериментът е изведен в четири повторения.

analyze the difference between various pre-treatments. A value of P = 0.05 was considered statistically significant.

4.3. Determination of sporulation level

Ten days after the treatment, the effect of essential oils on *C. acutatum* sporulation levels was determined. Determination of sporulation levels was performed using a Thom haemocytometer.

For this purpose, a spore suspension was prepared by adding 5 mL of distilled water to the Petri dish with a culture of isolate C.A.2 (*C. acutatum* J.H. Simmonds). The plate was then viewed under a microscope (Vasic, 2007).The sporulation level is expressed according to the scale by Quesada and Lopez, 1980, where: + = poor sporulation (<5,000 spores/ml), ++ = medium sporulation (5,000 - 10,000 spores/ml) and +++ = abundant sporulation (> 10,000 spores/ml). The experiment was set in four repetitions.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Химичен състав на етеричното масло

GC/MS анализите разкриха наличието на 67 съставки, съставляващи до 99.06% от анализираното етерично масло *S. sclarea*, а идентифицираните компоненти са изброени в ред на елуиране от колоната HP-5 MS в Таблица 1, заедно с техните индекси на задържане, количествени данни и метод за идентификация. Най-разпространените съставки са монотерпенов естер линалилацетат (43.17%) и съответстващият му алкохол линалол (15.8%). Другите основни съставки са идентифицирани като гермакрен D (9,73%), кариофилен (5.13%) и склареол (1.43%). ЕО е доминиран от кислородните монотерпени (66.65%), последвани от сесквитерпеновите въглеводороди, които възлизат на 24.51%, окислените сесквитерпени 2.43%, моно-

RESULTS AND DISCUSSION

1. Chemical composition of the essential oil

GC/MS analyses revealed the presence of 67 constituents making up to 99.06 % of the of the analyzed *S. sclarea* essential oil, and the components indentified are listed in order of elution from the HP-5 MS column in the Table 1, along with their retention indices, quantitative data and identification method. The most abundant constituents were monoterpenic ester linalyl acetate (43.17%) and its corresponding alcohol linalool (15.8%). The other principal constituents were identified as germacrene D (9.73%), caryophyllene (5.13%) and sclareol (1.43%).

The EO was dominated by the oxygenated monoterpenes (66.65%) followed by the sesquiterpene hydrocarbons amounted to 24.51%, oxygenated sesquiterpenes

терпените 2.05% и дитерпените 1.71%. Механизмите на действие на етеричните масла спрямо растителните патогени все още не са известни. Предполага се, че биофизичните и интензивността на биологичните характеристики на етеричните масла зависят от химическата структура на техните вещества. Заедно със синергията, антагонизма или допълнителното въздействие на съставните елементи на етеричните масла, заслужава да се разгледа и влиянието върху дадения патоген, структурни и морфологични промени или може би специфично взаимодействие с мембраната. Например терпените, съдържащи по-голямата част от етеричните масла, са отговорни за хидрофобните характеристики на етеричните масла, позволяващи дифузията им през гъбичната мембрана, засягайки вътреклетъчните метаболитни пътища и органелите. Очевидното вредно въздействие върху морфологията на клетъчните мембрани, освобождаване на вътреклетъчни компоненти, малки йони като калий и фосфат, последвани от макромолекулни вещества като ДНК и други, се наблюдават при антимикробния механизъм на действие на етеричното масло от *S. sclarea* (Cui et al., 2015). Скорошно проучване на Kumar et al. 2019, съобщава за фунгитоксичност на етерично масло от *Салвия склареја*, самостоятелно и в комбинация с линалилацетат и линалол, спрямо *Aspergillus nidulans* (86.37%) и *Alternaria alternata* (98.37%). Доказано е намаляване на ергостерола, един от основните стероли, осигуряващ твърдост и структурна цялост на гъбичната плазмена мембрана, както и забележимо изтичане на жизненоважни йони (Ca^{2+}, K^{+} и Mg^{2+}) и абсорбиращи UV лъчи материали в зависимост от дозата (Kumar et al., 2019). Гореспоменатото показва сложността на структурните промени, залегнали в основата на противогъбичния механизъм, породен от етеричното масло на *S. sclarea* спрямо патогени на култури.

2.43%, monoterpenes 2.05% and diterpenes1.71%. The mechanisms of EO action against plant pathogens are still not well known. It has been suggested that biophysical, and the intensity of biological, characteristics of essential oils depends on chemical structure of their components.

Along with the synergy, antagonism or additive effects of the EOs constituents, the influence on the targeted pathogen, structural and morphological changes, or perhaps a specific membrane interaction are also worth being considered. For instance, terpenes comprising the vast majority of the essential oils are responsible for the hydrophobic characteristics of EOs allowing their diffusion through the fungal membrane, affecting intracellular metabolic pathways and organelles.

Obvious harmful effects on the morphology of cell membranes, release of intracellular components, small ions such as potassium and phosphate, followed by macromolecular substances such as DNA and others were observed in antimicrobial mechanism of *S. sclarea* essential oil action (Cui et al., 2015).

Recent study by Kumar et al. 2019, reported fungitoxicity of Clary Sage essential oil, alone, and in combination with linalyl acetate and linalool, against *Aspergillus nidulans* (86.37%) and *Alternaria alternata* (98.37%).

Reduction of ergosterol, one of the principal sterol providing rigidity and structural integrity to fungal plasma membrane, and prominent leakage of vital ions (Ca^{2+}, K^{+} and Mg^{2+}) and UV-absorbing materials in a dose dependent manner is proven (Kumar et al., 2019). Abovementioned demonstrate the complexity of the structural changes underlying the antifungal mechanism induced by *S. sclarea* essential oil in crop pathogens.

Таблица 1. Химичен състав на етерично масло от въздушните части от *Salvia sclarea*

Table 1. Chemical composition of the aerial parts essential oil from *Salvia sclarea*

Rt	RI[a]	Съединение Compound	Съдържание Content[b] [%]	Compound class	Метод за идентификация Identification method[d]
4.44	932	*α*-Pinene	0.11	MT	MS, RI, CoI
4.71	946	Camphene	0.02	MT	MS, RI, CoI
5.09	969	Sabinene	0.02	MT	MS, RI, CoI
5.18	974	*β*-Pinene	0.11	MT	MS, RI, CoI
5.32	988	*β*-Myrcene	0.73	MT	MS, RI, CoI
6.05	1020	*p*-Cymene	0.02	MT	MS, RI, CoI
6.14	1024	D-Limonene	0.27	MT	MS, RI, CoI
6.23	1032	(*Z*)-*β*-Ocimene	0.28	MT	MS, RI
6.47	1044	(*E*)-*β*-Ocimen	0.44	MT	MS, RI
7.05	1067	*cis*-Linalool oxide	0.04	MT*	MS, RI, CoI
7.40	1084	*trans*-Linalool oxide	0.05	MT*	MS, RI, CoI
7.44	1086	Terpinolene	0.1	MT	MS, RI
7.69	1095	Linalool	15.80	MT*	MS, RI, CoI
8.98	1154	Nerol oxide	0.01	MT*	MS, RI
9.33	1165	Borneol	0.05	MT*	MS, RI
9.61	1174	Terpinen-4-ol	0.04	MT*	MS, RI, CoI
9.79	1179	*p*-Cymen-8-ol	Tr	MT*	MS, RI
9.92	1186	*α*-Terpineol	3.20	MT*	MS, RI, CoI
10.06	1200	Dodecane	0.154	O	MS, RI
10.48	1214	Linalool formate	0.08	MT*	MS, RI
10.84	1227	Nerol	0.57	MT*	MS, RI, CoI
11.16	1235	Neral	0.04	MT*	MS, RI, CoI
11.58	1254	Linalool acetate	43.13	MT*	MS, RI, CoI
11.84	1256	Geraniol	0.05	MT*	MS, RI, CoI
12.28	1287	Bornyl acetate	0.08	MT*	MS, RI, CoI
12.66	1298	Geranylformate	0.05	MT*	MS, RI, CoI
12.59	1300	Tridecane	0.03	O	MS, RI
13.98	1345	*α*-Cubebene	0.12	MT*	MS, RI
13.88	1346	*α*-Terpinyl acetate	0.11	MT*	MS, RI, CoI
14.16	1359	Neryl acetate	1.70	MT*	MS, RI, CoI
14.64	1379	Geranyl acetate	1.50	MT*	MS, RI, CoI
14.68	1374	*α*-Copaene	3.39	ST	MS, RI,
14.92	1387	*β*-Bourbonene	0.54	ST	MS, RI,
15.00	1390	β-Cubebene	1.07	ST	MS, RI
15.81	1417	(*E*)-Caryophyllene	5.13	ST	MS, RI, CoI
16.03	1428	*β*-copaene	0.15	ST	MS, RI
16.09	1432	*α-trans*-Bergamotene	0.06	ST	MS, RI
16.38	1451	Isogermacrene D	0.05	ST	MS, RI
16.62	1452	*α*-Humulene	0.36	ST	MS, RI, CoI
16.83	1458	*allo*-Aromadendrene	0.07	ST	MS, RI
17.14	1478	*γ*-Muurolene	0.17	ST	MS, RI
17.31	1484	Germacrene-D	9.73	ST	MS, RI
17.42	1489	Eremophilene	0.54	ST	MS, RI
17.66	1500	Bicyclogermacrene-2	1.82	ST	MS, RI
17.72	1500	*α*-Muurolene	Tr	ST	MS, RI
18.05	1513	*γ*-Cadinene	0.11	ST	MS, RI
18.23	1522	*δ*-Cadinene	0.82	ST	MS, RI
18.79	1544	*α*-Calacorene	0.04	ST	MS, RI
19.05	1549	Salviadienol	0.05	ST*	MS, RI
19.32	-	1,5-epoxysalvial-4(14)-ene	0.12	ST*	MS, RI
19.58	1577	Spathulenol	0.46	ST	MS, RI
19.69	1582	Caryophyllene oxide	0.85	ST*	MS, RI
19.96	1595	4(14)-Salvialene-1-one	0.46	ST*	MS, RI

20.17	1639	*allo*-Aromadendrene epoxide	0.08	ST*	MS, RI
20.39	-	Torilenol	0.13	ST*	MS, RI
20.98	1640	Isospathulenol	0.15	ST*	MS, RI
21.27	1649	*β*-Eudesmol	0.09	ST*	MS, RI
21.35	-	Cadina-1(10),4-dien-8-α-ol	0.20	ST*	MS, RI
21.92	-	Caryophylla-3(15),7(14)-dien-6-ol	0.08	ST*	MS, RI
22.06	1690	Eudesma-4(15),7-dien-1-β-ol	0.06	ST*	MS, RI
26.20	1906	Sclareoloxide	0.48	O	MS, RI
27.01	1908	Isopimara-8,15-diene	0.06	DT	MS, RI
27.72	1949	geranyl-α-terpinene	0.06	DT	MS, RI
28.28	1994	Manool oxide	0.04	DT	MS, RI
29.46	-	9-(epi)-Sclarene	0.06	DT	MS, RI
29.48	2055	Manool	0.06	DT	MS, RI
32.38	2222	Sclareol	1.43	DT	MS, RI
Total identified (%)		97.85			

Брой съединения / Number of components: 67
MT – Монотерпени / Monoterpenes 2.05%
MT* – Оксидирани монотерпени / Oxygenated monoterpenes 66.65%
ST – Сесквитерпени / Sesquiterpenes 24.51%
ST* – Оксидирани сесквитерпени / Oxygenated sesquiterpenes 2.43%
DT- Дитерпени / Diterpenes 1.71%
O – Други / Others 0.5 %

a) Линейният индекс на задържане (RI) определен експериментално върху колона DB-5MS спрямо серии от C7 – C32 n-алкани. b) Стойностите са средства за индивидуалния анализ; tr, следи от количества (<0,02%). c) Идентификация на съединението: RI, индекси на задържане, съвпадащи с литературни данни; MS, съвпадение на мас спектрите, CoI, коинжекция с чисто референтно съединение

a) Linear retention indices (RI) determined experimentally on the DB-5MS column relative to a series of C7 – C32 n-alkanes.
b) Values are means of the individual analysis; tr, trace amounts (< 0.02%).
c) Compound identification: RI, retention indices matching with literature data; MS, mass spectra matching, CoI, coinjection with pure reference compound

Džamić et al. дават сведения преди това за химичния състав на етерично масло от *S. sclarea* с произход от Сърбия (Džamić et al., 2008). Според тяхното проучване, количеството на линалилацетат (52.83%) и линалол (18.18%) е сравнително високо, както е в нашия материал, докато процентът на останалите компоненти не показва много разлики в съдържанието, но показва количествени вариации. А именно, α-терпинеол (5%), α-пинен (4.57%), лимонен (1.55%) и β-кариофилен (1,83%) са едни от общо 34-те доминиращи идентифицирани съединения, докато в нашата проба те представлява само малката част. Същата група автори са получили достъп до оценката на противогъбичната активност срещу няколко вида микромицети. Концентрация от 25 μL/ml от етерично масло показва минимална фунгицидна концентрация (MFC) срещу *Aspergillus*, *Penicillium* и *Fusarium* sp., и *Trichoderma viride*, докато стойностите на MFC за M. *mucedo* и

Džamić et al. have previously reported the chemical composition of *S. sclarea* EO originating from Serbia (Džamić et al., 2008). According to their study, the amount of linalyl acetate (52.83%) and linalool (18.18%) were comparable high, as are in our material, while the percentage of the other components did not display many differences in content, but exhibited quantitative variation. Namely, α-terpineol (5%), α-pinene (4.57%), limonene (1.55%) and β-caryophyllene (1.83%) were one of the, in total of 34, dominant identified compounds, while in our sample they represented just the minor portion of the analyzed EO. The same authors group accessed the antifungal activity evaluation against several micromycete species. A concentration of 25 μL/mL of the EO showed minimal fungicidal concentration (MFC) against *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Fusarium* sp., and *Trichoderma viride*, while the MFC values for *M. mucedo* and *A. viride*, and *C. albicans*

A. *viride* и C. *albicans* са 15 μL/mL и 10 μL/mL, съответно. Фунгистатичните и фунгицидни действия на маслото срещу тъмно пигментирана плесен *C. cladosporioides*, атакуваща както листата, така и плодовете на много растения и *T. grophytes*, са в концентрации от 2,5 μL/ml и 5 μL/ml. В случая на *C. fulvum*, *A.alternata*, *P. helianthi* и *P. macdonaldii* е доказано, че минималната летална концентрация (MLC) е 2,5 μL/ml (Džamić et al., 2008). Окуражени от техните резултати, решихме да оценим противогъбичния потенциал на нашето етерично масло от Салвия Склерея срещу друг много важен гъбичен патоген, *C. acutaum* и евентуално да се съпостави съдържанието на компонентите на етеричното масло с проявената противогъбична активност.

Наличието на линалилацетат и линалол като основните вторични метаболити в маслото на *S. sclarea* потвърждават резултатите, представени от Pitarokili и Kuzma (Pitarokili et al., 2002; Kuźma et al., 2009). Pitarokili et. al. посочват че растежа на гъбични почвени патогени се забавя според дозата в следствие на третиране с етерично масло от Салвия Склерея. Отчетено е инхибиране на радиалния растеж на мицела на *S. sclerotiorum* (1000 μL/L), *S.cepivorum* (2000 μL/L) и *F. oxysporumf. sp. dianthi* (2000 μL/L) заедно с фунгицидно въздействие върху *S. sclerotiorum* при концентрация от 2000 μL/L. Съответно стойностите EC50 на етерично масло от *S. sclarea*, получени за всяка гъбичка (*S. sclerotiorum* (EC50) 492,55 μL/L; *S. cepivorum* (EC50) 544,17 μL/L; и *F. oxysporum f. sp. dianthi* (EC50) 584.36μL/L) са представени в същата работа. Чистите търговски линалол и линалилацетат също са тествани, въпреки тяхното инхибиращо действие върху радиалния растеж на едни и същи патогени и са регистрирани различните степени на инхибиране в зависимост от тестваните гъбички (Pitarokili et al., 2002). Имайки предвид всичко спомена-

were 15μL/mL and 10 μL/mL, respectively. Fungistatic and fungicidal activities of the oil against darkly pigmented mold *C. cladosporioides* attacking both the leaves and fruits of many plants and *T. grophytes* were at the concentrations of 2.5 μL/mL and 5 μL/mL. In the case of *C. fulvum*, *A.alternata*, *P. helianthi* and *P. macdonaldii*, the minimal lethal concentration (MLC) was proven to be 2.5 μL/mL (Džamić et al., 2008).

Encouraged by their results we decided to estimate the antifungal potential of our Clary Sage EO against another very important fungal pathogen,*C. acutaum* and possibly correlate the EO constituents content with the exhibited antifungal activity.

The presence of linalyl acetate and linalool as the major *S. sclarea* EO secondary metabolites corroborate to the results presented by Pitarokili and Kuzma (Pitarokili et al., 2002; Kuźma et. al., 2009). Pitarokili et. al. pointed on the dose-dependent inhibiton of fungal soil-borne pathogens growth caused by the Clary Sage EO treatment. Inhibition of *S. sclerotiorum* mycelia radial growth (1000 μL/L), *S.cepivorum* (2000 μL/L) and *F. oxysporum*f. sp. *dianthi* (2000 μL/L) together with fungicidal effect on *S. sclerotiorum* at the concentration of 2000 μL/L were recorded.

The corresponding EC50 values of the essential oil of *S. sclarea* obtained for each fungus (*S. sclerotiorum* (EC50) 492.55 μL/L;*S. cepivorum*(EC50) 544.17 μL/L; and *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* (EC50) 584.36μL/L) are presented in the same work. Pure commercial linalool and linalyl acetate were also tested, independently, for their inhibitory action on the radial growth of the same pathogens, and the various degrees of inhibition depending on the fungi tested were recorded (Pitarokili et al., 2002). Having the all above mentioned in mind it

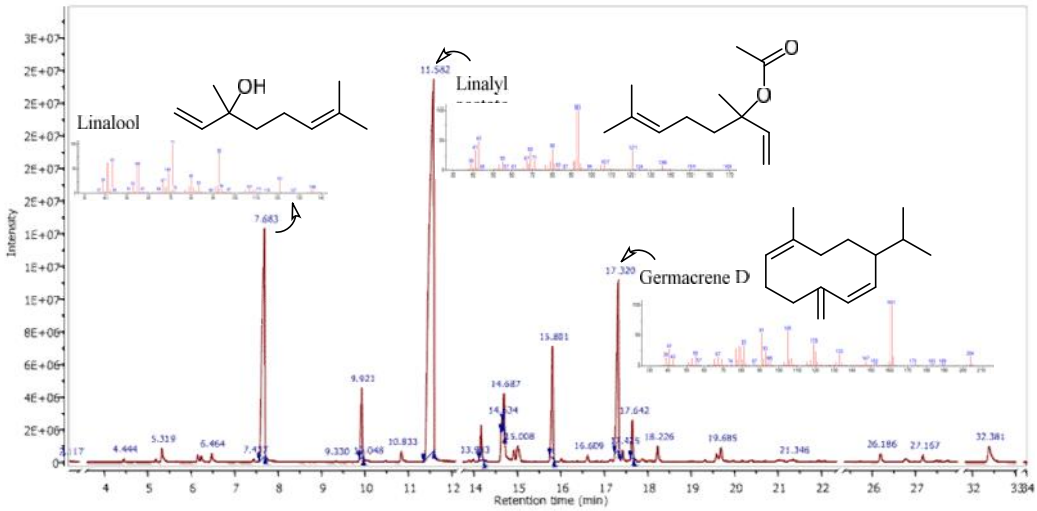
то по-горе, може да е възможно линалолът да повлияе и върху инхибирането на растежа на тествания от нас патоген. Резултатите от проби на *S. sclarea* в Сардиния, в които α-терпинеол (47.4%), а-терпинил ацетат (22.1%) и линалил ацетат (12.7%) са доминиращи от общо 23 идентифицирани съставки, посочват значително микробиостатично действие срещу гъбички C. albicans. α-терпинеол, присъстващ и в нашата хроматограма, тестван самостоятелно, показва кандидицидна активност при дози по-високи от 2 mg/ml, докато линалолът показва по-слаби MIC стойности (>2 mg/mL), показващи за синергичното действие на отделните съставки на етеричното масло. Основните съставки на анализираното етерично масло от *S.sclarea* с произход Сардиния се отличават много от нашата проба с доминиращия метил хавикол (49.02%), който никога не е посочван за този вид, и линалилацетат (19,2%) (Moretti et al., 1997). В испанските образци на *S. sclarea* преобладава линалол (32.97%), линалилацетат (16.85%), гермакрен D (7,57%) и терпинен-4-ол (5.63%) (Torres et al., 1997). В изследване на италианския биотип на Салвия Склерея, Carruba et al. посочват високо съдържание на гермакрен D (10.56%), присъстващ и в нашата проба във високия добив (9.73%), и възможността този вид етерично масло да бъде използван в растителната защита (Carruba et al., 2002) (Фигура 1).

Френски проби от *S. sclarea*, с висок процент на линалилацетат (81.4%) и линалоол (10.7%), показват активност, еквивалентна на стойност IC_{50}, получени с доксорубицин спрямо клетъчни суспензии на избрани хемопоетични тумори (HL-60, K562) и твърди тумори (MCF-7) и поради сложността на масления състав не може да бъде лесно обяснено коя съставка е активна.

might be possible that linallol influenced the inhibition of our tested pathogen growth, also. Considering the results, regarding the Sardinian samples of *S.sclarea*, in which α-terpineol (47.4%), α-terpinyl acetate (22.1%) and lynalil acetate (12.7%) were the dominant ones of in total 23 identified constituents, significant microbiostatic action against fungus *C. albicans* was stated. α-terpineol, present in our chromatogram also, tested alone, showed a candidicidal activity at doses higher than 2 mg/mL, while linalool exhibited weaker MIC values (>2mg/mL) pointing on the synergistic action of the single components, constituents of the EO.

Major constituents of the analyzed essential oil of Sardinian *S.sclarea* were very distinctive from our sample, dominating methyl chavicol (49.02%), never reported before from this species, and linalyl acetate (19.2%) (Moretti et al., 1997). Spanish speciments of *S. sclarea* prevailed by linalool (32.97%), linalyl acetate (16.85%), germacrene D (7.57%) and terpinen-4-ol (5.63%) (Torres et al., 1997). Investigating the Italian biotype of Clary Sage Carruba et al. pointed on the significance of the high content of germacrene D (10.56%), also present in our sample in the high yield (9.73%), in the possible exploiting of this species essential oil in plant protection (Carruba et al., 2002) (Figure 1).

French speciments of *S. sclarea*, yielding the high percentage of linalyl acetate (81.4%) and linalool (10.7%), showed activity equivalent to IC_{50} values obtained with doxorubicin against cell suspensions of selected hemopoeitic tumors (HL-60, K562) and solid tumors (MCF-7), and because of the complexity oil composition it was not easily explainable which constituent was the active one.



Фиг. 1. Обща йонна хроматограма на етерично масло от *S.sclarea*, с масспектрите и химичните формули на доминиращите маслени съставки
Fig. 1. Total ion current chromatogram of the essential oil of *S.sclarea*, with the mass spectrums and chemical formulas of dominant oil constituents

Разбира се, синергичният ефект на някои съединения в сместа от вторични метаболити се явява разумно предположение (Foray et al., 1999). Склареолът, лабданов тип дитерпен, с висока антимикробна активност и доза зависим от времето цитостатичен и цитотоксичен потенциал срещу панел от човешки левкемични клетъчни линии, P-388, KB и NSCLC-N6, присъства само в 0.06% в изследванията на растителния материал на Džamić et al., докато в нашата проба в него се съдържа 1.43% от маслото (Dimas et. al., 1998; Džamić et al., 2008). Този биоактивен дитерпен предизвиква понижаване на тежестта на инфекцията от ръжда при френски боб и пшеница (Bailey et al., 1975) и инхибиране на радиалното удължаване на гъбични колонии, отглеждани в агар (Ulubelen et al., 1994). Може да се направи заключение, че са идентифицирани различни хемотипове на Салвия Склареа. Освен най-често срещания преобладаващ линалилацетат/линалол, α-терпинеол, богат на гераниол/геранил ацетат хемотип (Elnir et al., 1991), богат на метил хавикол хемотип (Moretti et al.,

Of course, a synergistic effect of some compounds in the secondary metabolites mixture raises as a reasonable assumption. (Foray et al., 1999). Sclareol, a labdane-type diterpen, with high antimicrobial activity and dose, and time dependent cytostatic and cytotoxic potential against a panel of human leukemic cell lines, P-388, KB and NSCLC-N6 cell lines was present in only 0.06 % in Džamić et al. plant material, while in our sample it comprised 1.43% of the oil (Dimas et. al., 1998; Džamić et al., 2008). This bioactive diterpene induced the reduction of the severity of rust infection in French beans and wheat (Bailey et al., 1975), and the inhibition of the radial extension of fungal colonies grown in agar (Ulubelen et al., 1994). It can be concluded that different Clary Sage chemotypes have been identified. Besides the most common linalyl acetate/linalool dominant, *α*-terpineol dominant, geraniol/geranyl acetate-rich chemotype (Elnir et. al., 1991), a methyl chavicol-rich chemotype (Moretti et al., 1997), a germacrene-D-rich chemotype (Carruba et al., 2002), and very recently,

1997), богат на гермакрен D хемотип (Carruba et al., 2002), а съвсем скоро и α-туйон, туен и маноол оксид/фитол хемотипи от Тунис (Taarit et al., 2011). Според настоящият обширен GC-MS анализ, етеричното масло от *S. sclarea* от югоизточна Сърбия е богато на линалил ацетат, линаоол, но също така съдържа висок процент гермакрен D (Фигура 1).

Евгенолът представлява доминиращата съставка на *S. aromaticum* (L.) Merr. & LM Perry и *C. verum* J.Presl EOs, докато карвакролът е друго ароматно съединение с фенолна OH група, присъстваща в неговата структура, а *O. vulgare* L. демонстрира противогъбична активност поради образуването на водородна връзка с целевия ензимен активен център (Farag et al., 1989). Етеричното масло изследвано в настоящата работа не съдържа тези кислородни монотерпени (66.65%), но включва съединения с подобна химическа структура, така че може да се предположи, че инхибирането на растежа на мицела и промяната в нивото на спорообразуване на *C. acutatum* се постига отчасти поради тяхното присъствие. Алифатните алкохоли, гераниол, нерол и цитронелол, някои от които присъстват в нашата проба, потискат растежа на *A. flavus* и следователно предотвратяват образуването на афлатоксин (Mahmound, 1994), а етерични масла съдържащи алифатни алкохоли и феноли, проявяват значително действие срещу *A. aegyptiaceus, P. cyclopium* и *T. viride* (Megalla et al., 1980). Гореспоменатите резултати, заедно с нашите данни показват, че алифатните алкохоли имат противогъбично действие срещу широк спектър от гъбички. Поради сложния състав на нашето етерично масло, не беше лесно да се установи кое е активното вещество, което се счита за противогъбично срещу *C. acutatum.* Поради това се разсъждава върху възможния синергичен ефект на редица съединения в сместа.

α-thujone, thujene, and manool oxide/phytolchemotypes from Tunisia (Taarit et al., 2011).

According to our extensive GC-MS analysis the *S. sclarea* essential oil from south-eastern Serbia in our hands is rich in linaly lacette, linalool, but also contains high percentage of germacrene D (Figure 1).

Eugenol represents the dominant constituent of the *S. aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry and *C. verum* J.Presl EOs while carvacrol, another aromatic compound with the phenolic OH group present in its structure, from *O. vulgare* L. demonstrate antifungal activity due to the hydrogen bond formation with the targeted enzyme active cite (Farag et al., 1989).

EO tested in this work does not contain these particular oxygenated monoterpenes, but it does include compounds with a similar chemical structure, so it could be speculated that the inhibition of mycelial growth and an alteration of the sporulation level of *C. acutatum* is accomplished partly due to their presence.

Aliphatic alcohols, geraniol, nerol and citronellol, some of which present in our sample, suppressed the growth of *A. flavus* and consequently prevented the formation of aflatoxin, (Mahmound, 1994) and EOs containing aliphatic alcohols and phenols exhibited significant action against *A. aegyptiaceus*, *P. cyclopium* and *T. viride* (Megalla et al., 1980).

Above-mentioned results, together with our report suggest that aliphatic alcohols could have antifungal action against a broad spectrum of fungi. Due to the complexity of the EO composition in our hands, it was not straightforward to deduce which is the active one attributed for the antifungal activity against *C. acutatum*, ponting on the possible synergistic effect of a number of compounds in the mixture.

2. Противогъбично действие

2.1. Въздействие на летливата фаза на етерично масло върху растежа на изолати на Colletotrichum acutatum

Етеричното масло от *S. sclarea* инхибира растежа на мицела на *C. acutatum* и процентът на инхибиране зависи от концентрацията. Инхибиране растежа на мицела се наблюдава при концентрации от 0.04 µL/ml въздух и по-високи, като се има предвид етеричното масло от Салвия Склерея. Минималната инхибиторна концентрация на изследваното етерично масло (Таблица 2; Фигура 2) е 0.04 µL/ml въздух, докато минималната летална концентрация (MLC) е от 0.8 µL/ml въздух) .

2. Antifungal activity

2.1. Effect of volatile phase of essential oils on the growth of Colletotrichum acutatum isolates

S. sclarea essential oil inhibited the growth of *C. acutatum* mycelium and the percentage of the inhibition was concentration dependent. To be exact, inhibition of mycelial growth was observed at concentrations of 0.04 µL/mL of air and higher, considering the essential oil of Clary Sage. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the tested EO (Table 2; Figure 2) was at the concentration of 0.04 µL/mL of air, while the minimal lethal concentration (MLC) was at the concentration of 0.8 µL/mL of air.

Таблица 2. Въздействие на летливата фаза на етеричното масло върху растежа на мицела на *C. acutatum*

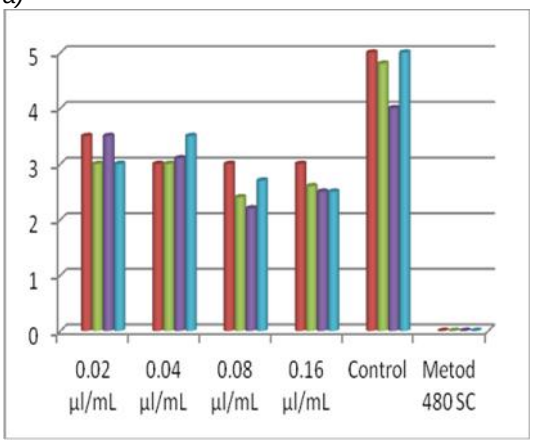
Table 2. The effect of volatile phase of the essential oil on the growth of *C. acutatum* mycelia

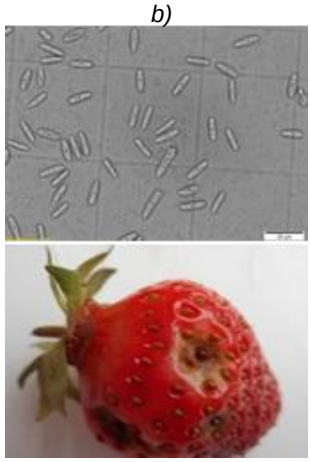
p.s. con	0.02 (µl/mL)	0.04 (µl/mL)	0.08 (µl/mL)	0.16 (µl/mL)	Контрола Control	Metod 480 SC
***Salvia sclarea* L.**	3.25[b]	3.15[b]	2.58[c]	2.65[c]	4.70[a]	-

***** (P = 0,05) Данните в редовете, маркирани с една и съща буква, не се различават статистически значимо въз основа на тест на Дънкан (p = 0,05)

***** (P=0.05) The data in rows marked by the same letter are not statistically significantly different based on Duncan test (p=0.05)

a) *b)*





c)

Фиг. 2. a) Въздействие на летливата фаза на етерично масло от *Salvia sclarea* върху растежа на изолат *Colletotrichum acutatum* in vitro след седемдневно излагане, b) Безполови спори на гъбичка *Colletotrichum acutatum* със скала за измерване спрямо ягода (Fragaria x ananassa Duchesne ex Rozier [chiloensis x virginiana]) гостоприемник от Сърбия под микроскоп Olympus CX31 c) Симптоми на антракноза по ягодови плодове

Fig. 2. a) The effect of volatile phase of the *Salvia sclarea* essential oil on the growth of *Colletotrichum acutatum* isolate *in vitro* after the seven-day exposure, b) Asexual spores of the fungus *Colletotrichum acutatum* with measurement scale on the strawberry (*Fragaria x ananassa* Duchesne ex Rozier [chiloensis x virginiana]) host from Serbia under the Olympus CX31 microscope c) Symptoms of strawberry anthracnose on fruits

2.2. Определяне на нивото на спорообразуване

Етеричното масло повлиява силно способността за спорообразуване на тестов изолат С.А.2 (*C. acutatum*) за образуването на по-голям или по-малък брой конидии (Таблица 2). По този начин ЕМ от S. sclarea, в сравнение с контролата, показва средно ниво на спорообразуване за всички приложени концентрации и инхибиторен ефект върху растежа на мицела на *C. acutatum* при *in vitro* условия. Етеричното масло проявява силен инхибиторен ефект при концентрации по-високи от 0.08 µL/mL. Минималните инхибиторни концентрации на маслото от Салвия Склареа са 0.02-0.08 µL/ml въздух за тествания изолат *C. acutatum*. Минималната летална концентрация (MLC) се изразява след пет дни. Нивото на спорообразуване на тествания изолат на *C. acutatum* е различно в зависимост от приложената концентрация. Vasić, 2007 посочват, че нивото на спорообразуване значително влияе върху скоростта и интензивността на инфекцията (Vasić, 2007). Използван е референтният антимикотичен каптан (Metod 480 SC), фунгицид от клас фталимиди, използван като положителна контрола, проявява своята фунгицидна активност чрез спиране на растежа на мицела на *C. acutatum*, като прави защитна бариера върху листата и плодовете, предотвратявайки навлизането на патогена и блокира производството на енергия (Таблица 3).

2.2. Determination of sporulation level

EO greatly influenced the sporulation ability of the C.A.2 (*C. acutatum*) test isolate to form conidia in larger or smaller numbers (Table 2).

Thus, the EO of *S. sclarea*, compared to the control, has shown a medium sporulation level for all of the applied concentrations, and an inhibitory effect on the growth of *C. acutatum* mycelium under *in vitro* conditions. The essential oil exhibited a strong inhibitory effect at concentrations higher than 0.08 µL/mL. The minimum inhibitory concentrations of Clary Sage oil was 0.02-0.08µL/mL of air, for the tested *C. acutatum* isolate.

The minimum lethal concentration (MLC) was expressed after five days. The sporulation level of the tested *C. acutatum* isolate was different depending on the applied concentration. Vasić, 2007 states that the level of sporulation significantly affects the speed and the intensity of infection (Vasić, 2007).

The referent antimycotic captan (Metod 480 SC), phtalimide class fungicide used as a positive control, manifests its fungicidal activity by stopping the growth of the mycelium of the *C. acutatum* making a protective barrier on the leaves and fruits preventing the entrance of pathogen and blocking the energy production, was being used (Table 3).

Таблица 3. Въздействие на етерично масло от Salvia sclarea върху нивото на спорообразуване на С. *actatum*

Table 3. Influence of the *Salvia sclarea* essential oil on the sporulation level of *C. actatum*

Ниво на спорообразуване Sporulation level	0.02 (µl/mL)	0.04 (µl/mL)	0.08 (µl/mL)	0.16 (µl/mL)	Control	Metod 480 SC
Salvia sclearea	++	++	++	++	+++	-

Многобройни *in vitro* проучвания показват високата ефективност на етеричните масла срещу замърсители

Numerous *in vitro* studies demonstrate the high efficacy of essential oils against bacteria and fungi contaminants.

като бактерии и гъбички. Beatović et al. изследват противогъбичната активност на различни концентрации на ЕМ на *O. sanctum* L. върху различни гъбични патогени, като например: *A. ochraceus, A. versicolor, A. niger, A. fumigatus, T. viride* и *P. funiculosum* (Beatović et al., 2013). Изследвана е противогъбичната активност на 18 етерични масла срещу изолати на *V. fungicola* var. *fungicola* (Preuss) Hassebrauk, M. *perniciosa* (Magnus) Delacroix и *Cladobotryum spp*. (Cooke) и причинителите на A. *bisporus* (Lange) Imbach., *in vitro*. От анализираните етерични масла, канелата, карамфилът, мащерката и чаеното дърво показват най-силна противогъбична активност срещу всички изследвани микопатогени, като минималната фунгицидна концентрация (MFC) е 0.02 μL/ml въздух за тестваните изолати (Tanović at al., 2006). Grahovac et al. изследват 56 етерични масла спрямо причинителят на антракноза C. *acutatum* и C. *gloeosporioides*, от които маслата от риган и мащерка са показали най-висока противогъбична активност. Най-ниската летална концентрация на масло от риган е била при 0.02 μL/ml въздух за изолат C. *acutatum* (Grahovac et al., 2014). Освен това Duduk et al. (2010) изследват *in vitro* противогъбичния ефект на три екстракта от етерични масла: *T. vulgaris, C. zeylanicum u S. aromaticum върху C. acutatum*. Всички тествани етерични масла инхибират растежа на мицела на *C. acutatum* при концентрации от 46 μL/L въздух и повече, а процентът на инхибиране зависи от количеството на приложеното етерично масло. Daferera et al. изследват противогъбичната активност на осем етерични масла, включително едно от *Salvia* sp., срещу *B. cinerea*, *Fusarium* spp. и *C. michiganensis* subsp. michiganensis върху изкуствена среда за отглеждане (Daferera et al., 2003). Растежът на гореспоменатите патогени беше напълно инхибиран от етеричните масла от риган (доминира тимол с

Beatović et al. studied the antifungal activity of varying concentrations of *O. sanctum* L. EO on diverse fungal pathogens: *A. ochraceus, A. versicolor, A. niger, A. fumigatus, T. viride* and *P. funiculosum* (Beatović et al., 2013). Antifungal activity of 18 essential oils was evaluated against *V. fungicola* var. *fungicola* (Preuss) Hassebrauk, *M. perniciosa* (Magnus) Delacroix and *Cladobotryum spp*. (Cooke) isolates, and the causative agents of *A. bisporus* (Lange) Imbach., *in vitro*.

Of the essential oils analyzed, cinnamon, clove, thyme, and tea tree showed the strongest antifungal activity against all investigated mycopathogens, with Minimum Fungicidal Concentration (MFC) being 0.02 μL/mL of air for isolates tested (Tanović at al., 2006).

Grahovac et al. tested 56 essential oils against the anthracnose causative pathogens *C. acutatum* and *C. gloeosporioides*, of which oregano and thyme oils have shown the highest antifungal activity. The lowest lethal concentration of oregano oil was at the 0.02 μL/mL of air for the *C. acutatum* isolate (Grahovac et al., 2014).

In addition, Duduk et al. (2010) studied the antifungal effect of three essential oils extracts: *T. vulgaris*, *C. zeylanicum* and *S. aromaticum* on *C. acutatum*, *in vitro*. All of the tested essential oils inhibited the growth of *C. acutatum* mycelium at the concentrations of 46 μL/L of air and higher, and the percentage of inhibition was dependent on the amount of essential oil applied. Daferera et al. examined the antifungal activity of eight essential oils, including one *Salvia sp*., against *B. cinerea*, *Fusarium spp.* and *C. michiganensis* subsp. *Michiganensis* on an artificial growth media (Daferera et al., 2003). The growth of the above mentioned pathogens was completely inhibited by oregano (thymol dominant, 63.7%), thyme, dictamnus, and marjoram (all rich

63.7%), мащерка, росен и майорана (всички богати на карвакрол) при относително ниски концентрации (85-300 µg/ml), докато етеричните масла от лавандула (доминират линалол и линалилацетат), розмарин и градински чай (и в двата преобладава евкалиптол съответно с 31.5% и 59.5%) проявяват по-малко инхибиторна активност. Velluti et al. изследват въздействието на пет етерични масла върху растежа и производството на фумозин B1 (хепатотоксичен и нефротоксичен токсин, който се среща главно в царевица, пшеница и други зърнени култури) от три различни изолата на *F. proliferatum*, посочвайки синергичното действие на доминиращите и второстепенните съединения в изследваните етерични масла. Същата група автори установи, че етеричните масла от канела и риган инхибират растежа на мицела и намаляват производството на фумозин B1 във *F. proliferatum* в царевичните зърна (Velluti et al., 2003). Гореспоменатите проучвания, заедно с много други, предполагат, че ЕМ са мощен източник на биопестициди срещу голямо разнообразие от причинители на гъбички.

in carvacrol) essential oils at relatively low concentrations (85-300 µg/mL), while the essential oils of lavender (linalool and linalyl acetate dominant), rosemary and sage (both eucalyptol dominant with 31.5% and 59.5%, respectively) exhibited less inhibitory activity.

Velluti et al. examined the effect of five essential oils on growth and fumosin B1 (hepatotoxic and nephrotoxic toxin occurring mainly in corn, wheat and other cereals) production by three different isolates of *F. proliferatum*, suggesting the synergistic action of the dominant and the minor compounds of the EO tested.

The same authors group found that the cinnamon and oregano essential oils inhibited the growth of mycelium and reduced the production of fumosin B1 in *F. proliferatum* in corn kernels (Velluti et al., 2003).

Above-mentioned studies, together with many others, suggest that the EOs are a potent source of biopesticides against a great variety of fungal causatives.

ИЗВОДИ

Контролът на гъбичните заболявания, причиняващи значителни загуби в растениевъдството, е сериозен проблем. Постоянното използване на синтетични пестициди води до увеличаване на замърсяването и съответно изследванията и идентифицирането на нови нетоксични и незамърсяващи активни растителни съставки като алтернативни природни противогъбични биопестициди за контрол на болестите в селското стопанство е от голямо значение. Летливите съединения от растенията имат антибактериална, противогъбична и инсектицидна активност и поради това те могат да се считат за източник на естествени растителни фунгициди, успешно прилагани като биоконтролни агенти в различни култури. Етеричното

CONCLUSIONS

The control of fungal diseases responsible for significant losses of crop production is considerable problem. Persistent use of synthetic pesticides causes pollution enhancement and accordingly, research on and identification of, new non-toxic and non-polluting, active plant constituents, as an alternative natural antifungal biopesticides, for the control of diseases in agriculture is of great importance.

Volatile compounds from plants have antibacterial, antifungal and insecticidal activities, and considered this they can be regarded as a prolific source of natural plant-derived fungicides successfully applied as biocontrol agents in a variety of crops.

масло от *S. sclarea* е изследвано в *in vitro* среда за противогъбичната му активност срещу растителна патогенна гъба *Colletotrichum acutatum* JH Simmonds изолат C.A.2 за първи път, за да оценят други алтернативни методи за защита на културите. Салвия склерея показва добра противогъбична активност срещу няколко растителни патогени и може да служи като естествена алтернатива на синтетичните фунгициди за контрол на някои важни гъбични заболявания. Механизмът на фунгицидно и фунгистатично действие все още трябва да бъде изяснен и може да се вземе предвид уместен подход за подобрено действие на етеричните масла чрез промяна на средствата, способни да прилепват към засегнатите растителни органи, удължавайки по този начин инхибиращия ефект върху растежа на патогена. Всички гореспоменати факти изискват по-нататъшни изследвания, за да се оцени потенциалът на етерично масло от *S. sclarea* за целите на практическото приложение при контрола на *C. acutatum*m, причинител на антракноза по ягодовите плодове.

The essential oil of *S. sclarea* is evaluated for its suitability in the *in vitro* antifungal activity assessment against plant pathogenic fungus *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds C.A.2 isolates, for the first time, in order to evaluate other alternative crop protection methods. Clary Sage have previously shown good antifungal activity against several plant pathogens and could possibly serve as a natural alternative to synthetic fungicides for the control of some important fungal diseases. Mechanism of fungicidal and fungistatic action should be yet clarified, and the appropriate approach for the enhanced performance of EO by altering vehicles able to adhere the effected plant organs, prolonging that way the inhibitory effect on the growth of pathogen, could perhaps be taken into account.

All the above-mentioned demand further research in order to evaluate *S. sclarea* essential oil potential for the purpose of the practical application in the control of the *C. acutatumm*, causative of strawberry anthracnose.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторите биха желали да изкажат своите благодарности на Министерство на образованието, науката и технологичното развитие на Република Сърбия за финансовата подкрепа (Проект 172061).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia for the financial support (Project 172061).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Adams, R. P.**, 2007. Identification of Essential oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, Carol Stream, IL: Allured publishing corporation, (Vol. 456).
2. **Bailey, J. A., G. A. Carter, R. S. Burden and R. L. Wain**, 1975. Control of Rust Diseases by Diterpenes from Nicotianaglutinosa. *Nature*, *255*(5506), 328-329.
3. **Baser, K. and G. Buchbauer**, 2009. Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*,* 1st ed. CRC press, Boca Raton, Florida, USA.
4. **Beatović, V. D., Ć. S. Jelačić, J., D. Č. Oparnica, B. D. Krstić-Milošević, M. J. Glamočlija, S. M. Ristić and J. D. Šiljegović**, 2013. Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Essential oil Ocimum sanctum L., *Hemijska Industrija,* 67(3), 427-435.
5. **Carrubba, A., R. La Torre, R. Piccaglia and M. Marotti**, 2002. Characterization

of an Italian Biotype of Clary Sage (*Salvia sclarea* L.) Grown in a Semi−Arid Mediterranean Environment. *Flavour and fragrance journal*, 17(3), 191-194.
6. **Çınar, Ö. G., H. Kırmızıbekmez, G. Akaydın and E. Yeşilada**, 2011. Investigation of in vitro Opioid Receptor Binding Activities of Some Turkish Salvia Species. *Records of Natural Products*, *5*(4).
7. **Cui, H., X. Zhang, H. Zhou, C. Zhao and L. Lin**, 2015. Antimicrobial activity and mechanisms of Salvia sclarea essential oil. *Botanical studies*, 56(1), 1-8.
8. **Daferera, D.J., B.N. Ziogas and M.G. Polissiou**, 2003. The Effectiveness of Plant Essential Oils on the Growth of Botrytis cinerea, Fusarium sp. and Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis. *Crop Protection,* 22: 39-44.
9. **Damm, U., P.F. Cannon, J.H.C. Woudenberg and P.W. Crous**, 2012.The *Colletotrichumacutatum* Species Complex. *Studies in Mycology,* 73: 37-113.
10. **Dikova, B.**, 2009. Establishment of Some Viruses-Polyphagues on Economically Important Essential Oil-Bearing and Medicinal Plants in Bulgaria. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, *23*(sup1), 80-84.
11. **Dimas, K., D. Kokkinopoulos, C. Demetzos, B. Vaos, M. Marselos, M. Malamas and T. Tzavaras**, 1999.The Effect of Sclareol on Growth and Cell Cycle Progression of Human Leukemic Cell Lines. *Leukemia research*, *23*(3), 217-234.
12. **Duduk, N., A. Obradović and M. Ivanović**, 2010. Influence of Essential Oils of Thyme, Cinnamon and Clove on the Growth of *Colletotrichum acutatum* mycelium. *Pesticidi&fitomedicina,* 25(2), 151-156.
13. **Džamić, A., M. Soković, M. Ristić, S. Grujić-Jovanović, J. Vukojević and P. D. Marin**, 2008. Chemical Composition and Antifungal Activity of Salvia sclarea (Lamiaceae) Essential Oil. *Archives of Biological Sciences*, *60*(2), 233-237.
14. **Elnir, O., U. Ravid, E. Putievsky, N. Dudai and G. Ladizinsky**, 1991. The Chemical Composition of Two Clary Sage Chemotypes and Their Hybrids. *Flavour and Fragrance Journal*, *6*(2), 153-155.
15. **Farag, R.S., Z.Y. Daw and S.H. Abo-Raya**, 1989. Influence of Some Spice Essential Oils on Aspergillus parasiticus Growth and Production of Aflatoxins in a Synthetic Medium. *J. Food Sci*., 54, 74-76.
16. Foray, L., C. Bertrand, F. Pinguet, M. Soulier, C. Astre, C. Marion ... and J. M. Bessière, 1999. In vitro Cytotoxic Activity of Three Essential Oils from Salvia species. *Journal of Essential Oil Research*, 11(4), 522-526.
17. **Fraternale, D., L. Giamperi, A. Bucchini, D. Ricci, F. Epifano, S. Genovese and M. Curini**, 2005. Composition and Antifungal Activity Of Essential Oil of Salvia sclarea from Italy. *Chemistry of natural compounds*, 41(5), 604-606.
18. **Freeman, S. and T. Katan**, 1997. Identification of *Colletotrichum* Species Responsible for Anthracnose and Root Necrosis of Strawberry in Israel. *Phytopathology,* 87: 516-521.
19. **Freeman, S. and E. Shabi**, 1996. Cross-Infection of Subtropical and Temperate Fruits by Colletotrichum Species from Various Hosts. *Physiological and Molecular Plant Pathology,* 49: 395-404.
20. **Freeman, S., Z. Shalev and T. Katan**, 2002. Survival in Soil of *Colletotrichumacutatum* and *C. gloeosporioides* Pathogenic on Strawberry*. Plant Disease,* 86: 965-970.
21. **Garrido, C., M. Carbú, F.J. Fernández-Acero, I. Vallejo and J.M. Cantoral**, 2009. Phylogenetic Relationships and Genome Organisation of *Colletotrichum acutatum* Causing Anthracnose in Strawberry. *European Journal of Plant Pathology,* 125: 397-411.
22. **Grahovac, M.**, 2014. Biological Control of *Colletotrichum* spp. Pathogens of

Stored Apple Fruits. Ph.D. Dissertation, Faculty of Agriculture, University of Novi Sad, Novi Sad, pp. 1-171.
23. **Hudaib, M., M. G. Bellardi, C. Rubies-Autonell, J. Fiori and V. Cavrini**, 2001. Chromatographic (GC-MS, HPLC) and Virological Evaluations of Salvia sclarea Infected by BBWV-I. *IlFarmaco*, 56(3), 219-227.
24. **Ivanović, M., Ivanović, M., Duduk, B., Trkulja, V. and Stojanović, G.**, 2005. Anthracnose - a New Strawberry Disease in Serbia. In: *Zbornik rezimea VII savetovanja o zaštiti bilja*, Soko Banja, pp. 119-120 (Sr).
25. **Jirovetz, L., G. Buchbauer, Z. Denkova, A. Slavchev, A. Stoyanova and E. Schmidt**, 2006. Chemical Composition, Antimicrobial Activities and Odor Descriptions of Various Salvia sp. and Thuja sp. Essential Oils. *Nutrition-Vienna*, 30(4), 152.
26. **Jirovetz, L., K. Wlcek, G. Buchbauer, V. Gochev, T. Girova, A. Stoyanova, ... and M. Geissler**, 2007. Antifungal Activities of Essential Oils of Salvia lavandulifolia, Salvia officinalis and Salvia sclarea against Various Pathogenic Candida Species. *Journal of essential Oil Bearing Plants*, 10(5), 430-439.
27. **Kumar, Singh, V., S. Das, A. Kumar Dwivedy, A. Kumar Chaudhari, N. Upadhyay and N. K. Dubey**, 2019. Assessment of Chemically Characterized Salvia sclarea L. Essential Oil and Its Combination with Linalyl Acetate as Novel Plant Based Antifungal, Antiaflatoxigenic and Antioxidant Agent against Herbal Drugs Contamination and Probable Mode of Action. *Natural product research*, 1-6.
28. **Kuźma, Ł., Kalemba, D., Różalski, M., Różalska, B., Więckowska-Szakiel, M., U. Krajewska and H. Wysokińska**, 2009. Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oil from Salvia sclarea Plants Regenerated in vitro. *Molecules*, 14(4), 1438-1447.
29. **Lee, D. H., D. Kim, Y. Jeon, J. Y. Uhm and S. Hong**, 2007. Molecular and Cultural Characterization of Colletotrichum spp. Causing Bitter Rot of Apples in Korea. *Plant Pathology Journal*, 23(2), 37.
30. **Mahmound, A.L.E.**, 1994. Antifungal Action and antiaflatoxigenic Properties of Some Essential Oil Constituents. *Lett. Appl. Microbiol.,* 19, 110-113.
31. **Megalla, S.E., N.E.M. El-Keltawi and S.A. Ross**, 1980. A Study of Antimicrobial Action of Some Essential Oil Constituents. *Herba Pol.,* 3, 181-186.
32. **Moretti, M. D., A. T. Peana and M. Satta**, 1997. A study on Anti-Inflammatory and Peripheral Analgesic Action of Salvia sclarea Oil and Its Main Components. *Journal of Essential Oil Research*, 9(2), 199-204.
33. **Orhan, I., M. Kartal, Y. Kan and B. Şener**, 2008. Activity of Essential Oils and Individual Components against Acetyland Butyrylcholinesterase. *Zeitschrift fuer Naturforschung C*, 63(7-8), 547-553.
34. **Ozek, T., N. Tabanca, F. Demirci, D. E. Wedge and K. Baser**, 2010. Enantiomeric Distribution of Some Linalool Containing Essential Oils and Their Biological Activities.
35. **Peana, A. T., M. D. Moretti and C. Juliano**, 1999. Chemical Composition and Antimicrobial Action of the Essential Oils of Salvia desoleana and S. sclarea. *Plantamedica*, 65(08), 752-754.
36. **Peres, N.A., S.J MacKenzie., T.L. Peever and L.W. Timmer**, 2008. Postbloom Fruit Drop of Citrus and Key Lime Anthracnose are Caused by Distinct Populations of *Colletotrichumacutatum*. *Phytopathology,* 98: 345-352.
37. **Pitarokili, D., M. Couladis, N. Petsikos-Panayotarou and O. Tzakou**, 2002. Composition and Antifungal Activity on Soil-Borne Pathogens of the Essential Oil of Salvia sclarea from Greece. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(23), 6688-6691.

38. **Polashock, J.J., P.V. Oudemans, F.L. Caruso, P. Mcmanus and J. Crouch**, 2009. Population Structure of the North American Cranberry Fruit Rot Complex. *Plant Pathology,* 58: 1116-1127.
39. **Quesada, L. G. and E. H. Lopez**, 1980. Forma sexual medios de cultivopara *Collerotrichum gleospotioides*, patogenodel mango en Cuba. *Ciencias de la Agricultura*, 7: 11-17.
40. **Setzer, W. N.**, 2009. Essential Oils and Anxiolytic Aromatherapy. *Natural product communications*, 4(9), 1934578X0900400928.
41. **Taarit, M. B., K. Msaada, K. Hosni and B. Marzouk**, 2011. Physiological Changes and Essential Oil Composition of Clary Sage (*Salvia sclarea* L.) Rosette Leaves as Affected by Salinity. *Acta physiologiae plantarum*, 33(1), 153-162.
42. **Talhinhas, P., C. Mota-Capitão, S. Martins, A.P. Ramos, J. Neves-Martins, L. GuerraGuimarães, V. Várzea, M.C. Silva, S. Sreenivasaprasad and H. Oliveira**, 2011. Epidemiology, Histopathology and Aetiology of Olive Anthracnose Caused by *Colletotrichumacutatum* and *C. gloeosporioides* in Portugal. *Plant Pathology,* 60: 483-495.
43. **Tanović, B., I. Potočnik, B. Stanisavljević, M. Đorđević and E. Rekanović**, 2006. Response of *Verticillium fungicola* var. *fungicola*, *Mycogone perniciosa* and *Cladobotryum* sp. Mushroom Pathogens to Some Essential Oils. *Pesticides & phytomedicine*. Belgrade, 21, 231-237.
44. **Torres, M. E., A. Velasco-Negueruela, M. J. Pérez-Alonso and M. G. Pinilla**, 1997. Volatile Constituents of Two Salvia Species Grown Wild in Spain. *Journal of Essential Oil Research*, 9(1), 27-33.
45. **Ulubelen, A., G. Topcu, C. Eri, U. Sönmez, M. Kartal, S. Kurucu and C. Bozok-Johansson**, 1994. Terpenoids from Salvia sclarea. *Phytochemistry*, *36*(4), 971-974.
46. **Vale-Silva, L., M. J., Silva, D. Oliveira, M. J. Gonçalves, C. Cavaleiro, L. Salgueiro and E. Pinto**, 2012. Correlation of the Chemical Composition of Essential Oils from Origanum vulgare subsp. virens with Their in vitro Activity against Pathogenic Yeasts and Filamentous Fungi. *Journal of medical microbiology*, 61(2), 252-260.
47. **Van den Dool, H. and P. D. Kratz**, 1963. A Generalization of the Retention Index System Including Linear Temperature Programmed Gas-Liquid Partition Chromatography (No. RESEARCH).
48. **Vasić, T.**, 2007.*Colletotrichum trifolii* (Bain et Essary), Antracnose Inducer Alfalfa, Disease Complex in Serbia. Master's thesis. Faculty of Agriculture, University of Belgrad, Zemun-Belgrade, pp. 1-88.
49. **Velluti, A., V. Sanchis, A.J. Ramos, J. Egido and S. Marin**, 2003. Inhibitory Effect of Cinnamon, Clove, Lemongrass, Oregano and Palmorose Essential Oils on Growth and Fumonisin B1 Production by *Fusariumproliferatum* in Maize Grain. *International Journal of Food Microbiology*, 89: 145-154.
50. **Werker, E., U. Ravid and E. Putievsky**, 1985. Glandular Hairs and Their Secretions in the Vegetative and Reproductive Organs of Salvia sclarea and S. dominica. *Israel Journal of Plant Sciences*, 34(2-4), 239-252.

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2020, 23 (4), 230-242
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan
ISSN 1311-0489 (Print)
ISSN 2367-8364 (Online)

Влияние на органични листни торове върху развитието на стевия *Stevia rebaudiana* (Bertoni)

Ахмед Мехмед, Станимир Енчев*

Земеделски институт, 9700 Шумен, България

Influence of Organic Foliar Fertilizers on Stevia Development (*Stevia rebaudiana* B.)

Ahmed Mehmed, Stanimir Enchev*

Agricultural Institute, 9700 Shumen, Bulgaria
**E-mail: stanimir_en@abv.bg*

Original scientific paper

РЕЗЮМЕ

През периода 2017-2018 година в опитното поле на Земеделски институт - Шумен е проведено изследване за влиянието на листното третиране с органичните торове: Fertileder Rame 0,1 l/da, Vitalosol Gold 0,6 l/da и Eurovix Propolis 0,3 l/da. Проучени са 10 произхода стевия, част от генофонда на института. Анализирани са следните параметри: свежи листа и стъбла на едно растение (g); сухи листа и стъбла на едно растение (g) и височина на растенията (cm).

В резултат на проведения опит се установи, че и трите органични продукта за листно третиране са повлияли положително върху височината и стопанските качества от стевия. Най-осезаемо е увеличаването на масата на свежите листа и стъбла. Най-съществено отражение върху свежата маса на листата и стъблата и върху сухата маса на листата и стъблата се констатира след третирането с Vitalosol Gold и Eurovix Propolis. Височината на растенията при сорт Стела се повлияват в значителна степен след прилагането на Vitalosol Gold

Ключови думи: стевия, органични торове, добив

SUMMARY

During the period 2017-2018, in the experimental fields of Agricultural Institute - Shumen, a study on the influence of organic foliar fertilization with: Fertileder Rame 0,1 l/decare Vitalosol Gold 0,6 l/decare and Eurovix Propolis 0,3 l/decare was conducted. Ten Stevia origins, part of the genepool of the Institute, were studied and the following parameters were analyzed: fresh leaves and stems of one plant (g); dry leaves and stems of one plant (g) and plant height (cm).

The experiment resulted in the following: All the three foliar fertilizers have affected positively. The most significant was the increase of the fresh leaves and stem mass. Less significant was the measured positive effect on the plant's height. The treatment with the foliar fertilizers Vitalosol Gold and Eurovix Propolis gave the highest positive effect on the fresh leaves and stem mass, as well as on the dry mass of leaves and stems. The plant's height of the Stela variety significantly affected by application of foliar fertilizer Vitalosol Gold during the period of our tests.

Key words: Stevia, organic foliar fertilizers, yield

УВОД

Stevia rebaudiana (Bertoni), принадлежи към семейство *Asteraceae*. Тя е многогодишна сладка билка с произход Парагвай. Алтернативен източник е на безкалоричните подсладители (Tanova and Kaschieva, 2018). В световен мащаб съществуват над 230 нейни разновидности – като тревисто, храстовидно и полухрастовидно растение (Cimpeanu et al., 2006). Тя съдържа листни гликозиди като стевиозид, ребаудиозид A, B, C, D и E, дулкозид-A и стевиолбиозид (Carneiro, et al., 1997; Uchkunov et al., 2016). В България стевията се отглежда като едногодишно растение с многогодишна употреба на коренищата (Kaschieva and Todorova, 2017; Kikindonov et al., 2017).

Анализът чрез течна хроматография в съчетание с UV, MS и ELS откриване показа, че стевиола е общ агликонов гръбнак на сладките стевиеви гликозиди (Cacciola et al., 2011). Стевиозидът, отчитан като най-разпространен стевиол гликозид (4-13% w/w), се открива главно в листата на растението, последван от стъблата, семената и корените. Стевиозидът е около 300 пъти по-сладък от захарозата и може да бъде особено полезен за страдащите от затлъстяване, захарен диабет, сърдечни заболявания и зъбен кариес (Robabeh, 2018). Стевията при-добива все по-голям икономически интерес поради наличието на сладки дитерпенови гликозиди, които могат безопасно да се използват от диабетици (Ucar et al., 2018).

Проучванията показват, че добивът на гликозиди, особено стевиозид, силно зависи от общия добив на биомаса, което от своя страна зависи от добрите селскостопанските практики за отглеждане на растението (Hoseini et al., 2015; Yücesan et al., 2016), използването на органични торове по технически начин (Geuns, 2003) и водния режим (Fronza and Folegatti, 2003). За постигане на високо производство на гликозиди,

INTRODUCTION

Stevia rebaudiana (Bertoni), belongs to the *Asteraceae* family. It is a perennial sweet herb of Paraguayan origin and is an alternative source of calorie-free sweetener (Tanova and Kaschieva, 2018). There are over 230 varieties of Stevia in the world as a grass, shrub and semi-shrub plant (Cimpeanu et al., 2006).

It contains foliar glycosides such as stevioside, rebaudioside A, B, C, D, and E, dulcoside-A and steviolbioside (Carneiro et al., 1997; Uchkunov et al., 2016). In Bulgaria, Stevia is grown as an annual plant with perennial use of the rhizomes (Kaschieva and Todorova, 2017; Kikindonov et al., 2017).

The analysis by liquid chromatography coupled with UV, MS and ELS detection showed that the Steviol is a common aglycone backbone of the sweet stevia glycosides (Cacciola et al., 2011). Stevioside, reported as the most abundant stevia glycoside (4-13%w/w) has been found mainly in plant leaves, followed by stems, seeds and roots. Stevioside is about 300 times sweeter than sucrose and can be particularly useful to those suffering from obesity, diabetes mellitus, heart disease and dental caries (Robabeh, 2018). Stevia gains an increasing economic interest due to the presence of sweet diterpene glycosides that can be safely used by diabetics (Ucar et al., 2018).

Studies reveal that the glycosides yield, especially stevioside, greatly depends on the total biomass yield, which in turn depends on agricultural practices for cultivation of stevia plants (Hoseini et al., 2015; Yücesan et al., 2016), use of organic fertilizers in a technical way (Geuns, 2003) and water management (Fronza and Folegatti, 2003). In order to achieve high production of glycosides, various units of its cultivation technology have been developed (Kikindonov and

са разработени различни звена от технологията на отглеждане (Kikindonov and Enchev, 2012; Kikindonov, 2013).

Наред с традиционните широко използвани органични торове (оборски тор, торова течност, компост, торф и др.) се търсят нови източници на органично торене. Решаваща и успешна роля играят биоторове, които са от органичен произход. Те са произведени изцяло от естествени материали и не замърсяват околната среда и продукцията, няма остатъчни вредни вещества и не вредят на здравето на хората (Staneva et al., 2018).

Органичните торове в сравнение с химическите торове съдържат големи количества органични вещества и биха могли да бъдат източник на хранителни вещества, особено азот, фосфор и калий (Fernandez et al., 1993; Hoseini, 2015). Тези елементи постепенно се предоставят на разположение на растенията (Eghball et al., 2004).

Употребата на листни торове, растежни регулатори и биостимуланти е една от перспективните насоки за стимулиране на биологичния потенциал на растенията, тъй като те се определят като допълващ и коригиращ компонент от цялостната система на минерално хранене и алтернатива на химичните торове за по-екологосъобразно увеличение на продуктивността в устойчивото земеделие (Mihova et al., 2017; Yakimov and Ivanov, 2017; Enchev et al., 2018b; Marinova et al., 2019). Засилено е вниманието върху листни торове с органичен произход, съдържащи хуминови киселини, микро и макро елементи (Petkova and Poryazov, 2007; Bozhanska et al., 2017; Enchev et al., 2018a).

Суровините, получени от лечебни билки, в частност от стевия не трябва да съдържат токсични или химически остатъци. С безразборната употреба на химически торове и пестициди се увеличава рискът от опасности за здравето и замърсяване на околната среда. Enchev, 2012; Kikindonov, 2013).

Along with the traditional widely used organic fertilizers (manure, liquid fertilizer, compost, peat, etc.), new sources of organic fertilization are being sought. Biofertilizers, which are of organic origin, play an important and successful role.

They are based entirely on natural products and do not pollute the environment and production. There are no residual harmful substances and no harm to human health (Staneva et al., 2018).

Organic fertilizers, compared to chemical fertilizers contain high amounts of organic matter and could be a source of nutrients, especially nitrogen, phosphorus and potassium (Fernandez et al., 1993; Hoseini, 2015). These elements gradually are placed at the disposal of plants (Eghball et al., 2004).

The use of foliar fertilizers, growth regulators and bio-stimulants is one of the perspective guidelines for stimulating the biological potential of plants owing to the fact that they were determined as an supplementary and corrective component of the overall mineral nutrition system and an alternative to chemical fertilizers for more environmentally friendly yields increase in the sustainable agriculture (Mihova et al., 2017; Yakimov and Ivanov, 2017; Enchev et al., 2018b; Marinova et al., 2019). Enhanced attention has been paid on leaf fertilizers with organic origin, containing humic acids, micro and macro elements (Petkova and Poryazov, 2007; Vasileva et al., 2017; Bozhanska et al., 2017; Enchev et al., 2018a).

The raw materials obtained from medicinal herbs, and in part from Stevia, should be free from any toxic or chemical residues. The risk of health hazards and environmental pollution is increasing with the haphazarded use of chemical fertilizers and pesticides. In case of

В случаите на отглеждане на лечебни растения е необходимо да се премине към устойчива, екологична и безопасна система за биологично земеделие (Umesha et al., 2011).

Предлаганите на пазара хранителни продукти, напоследък се оказват замърсени от множество химически агенти. Това поражда стремеж към все по-голямо търсене на екологично чисти храни (Vitkov, 2015; Pashev and Badjelova, 2019).

Целта на настоящото изследване е да се проучи ефикасността от прилагането на органични листни торове, върху основните структурни елементи на добив зелена и суха маса и продуктивността на 10 произхода стевия от генофонда на Земеделски институт-Шумен.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Изследването е проведено през 2017-2018 г., в опитното поле на Земеделски институт-Шумен. Проучено е влиянието на органични листни торове: Fertileder Rame 0,1 l/da, Vitalosol Gold 0,6 l/da и Eurovix Propolis 0,3 l/da приложени еднократно в периода на активна вегетация на растенията.

Използваният разсад е от сорт стевия „Стела“ и 9 перспективни произхода, част от генофонда на Земеделски институт - Шумен. Растителният материал е произведен в лабораторията по тъканни култури на Института и е адаптиран за полеви условия в оранжерия. Предшественикът е захарно цвекло. Почвеният тип в опитното поле е средно мощен, тежко-песъчливо глинест карбонатен чернозем, формиран върху льосово песъчливи глини. Орният слой съдържа 50 % физическа глина и средно 5% карбонати, хумус - 3.3 %, $CaCO_3$ - 6.5%, pH 7,4-7.8, азот - 35 mg/kg, P_2O_5 - 4.7 mg/100g, K_2O - 34 mg/kg, B - 1.2 mg/kg, Zn - 0.1 mg/kg, Mo - 0.1 mg/kg.

Засаждането на растенията се извършва в началото на май, когато температурата на почвата надвиши 10-12 ^oC,

medicinal plant breeding, switching to a sustainable, eco-friendly and safe organic farming system is necessary (Umesha et al., 2011).

Foods on the market have recently been contaminated by many chemical agents. This raises the pursuit of ever greater demand for organic food (Vitkov, 2015; Pashev and Badjelova, 2019).

The aim of the present study was to investigate the application efficacy of organic leaf fertilizers on the main structural elements of green and dry mass production and the productivity of 10 Stevia origins of the genepool of Agricultural Institute - Shumen..

MATERIAL AND METHODS

The study was carried out in the experimental fields of Agricultural Institute - Shumen, during the period 2017-2018. The influence of the of application of organic leaf fertilizers products Fertileder Rame 0,1 l/da, Vitalosol Gold 0,6 l/da и Eurovix Propolis 0,3 l/da, applied once in the period of active vegetation of the plants was studied.

The seedlings used were of the Stevia variety Stela and 9 another perspectives variants, part of the genepool of Agricultural Institute - Shumen. The plant was produced in the Tissue Cultures Lab of the Institute and adapted for field conditions in a green house. The forerunner crop was sugar beet. The soil type of the test field was moderately heavy, heavy-sandy clayey carbonate black, formed on loess sandy clays. The top layer contained 50% physical clay and 5% carbonate on average, humus - 3.3%, $CaCO_3$ - 6.5%, pH 7.4-7.8, Nitrogen 35 mg/kg, P_2O_5 4.7 mg/100g, K_2O 34 mg/kg, B 1.2 mg/kg, Zn 0.1 mg/kg, Mo 0.1 mg/kg.

Planting was manually done at the beginning of May when the soil temperature surpassed 10-12 ^oC, at 50

на 50 cm междуредово разстояние и 30 cm вътре редово разстояние (Uchkunova and Uchkunov, 2013). По този начин за 1 da се осигуряват 6666 растения. Всеки експериментален парцел е засаден с 10 растения в 4 повторения. Пръскането е извършено с ръчна пръскачка. През вегетацията са направени три ръчни окопавания и почвената влажност е поддържана в рамките на 70-75% от ППВ чрез капково напояване. Всяко растение се окосява ръчно и се изследва индивидуално.

Изследваните параметри са: добив свежа и суха маса листа средно за едно растение в g, добив свежа и суха маса на стъблата средно за едно растение в g и височина на растението в cm.

Изпитани бяха следните варианти:

1. Контрола - без листно торене;
2. Fertileder Rame 0,1 l/da - съдържа 11,9% водоразтворима мед;
3. Vitalosol Gold 0,6 l/da – (ЕО-ТОР) Течна смес на микроелементи с 2,4% обща мед (Cu) 40 g/l, 9,6% общ манган (Mn) 150 g/l и 36 % елементарна сяра (S) 570 g/l
4. Eurovix Propolis 0,3 l/da - чист екстракт от подбран екологично чист прополис 30 g/l п/в. Съдържание, изразено в активни вещества: Общо полифеноли (като галова киселина) повече от 7,000 mg/l, Общо полифеноли (като катехини) повече от 6,500 mg/l, Флавоноиди (Галангин) 750 mg/kg.

cm inter-row distance and 30 cm in-row distance (Uchkunova and Uchkunov, 2013). Using this method in 1 da were planted 6666 plants. Each experimental plot was planted with 10 plants in 4 repetitions. The treatment has been done with a manual sprayer. Three hillings have been made by hand during the vegetation, and the soils humidity has been kept at 70-75% of the marginal soils humidity by drip irrigation. Each plant was manually harvested, and individually studied.

The studied parameters were: average fresh and dry mass of leaves obtained from a single plant in g, average fresh and dry mass of stems obtained from a single plant in g and height of plant in cm.

The following variants were tested:

1. Control variant – non-treated;
2. Fertileder Rame 0,1 l/da - contains water soluble copper (Cu) 11,9%;
3. Vitalosol Gold 0,6 l/da - EC Fertiliser Liquid micronutrient mixture with 2,4 % Total copper (Cu) 40 g/l, 9,6 % Total manganese (Mn) 150 g/l and 36% elemental sulfur (S) 570 g/l.
4. Eurovix Propolis 0,3 l/da - Pure extract of selected environmentally friendly propolis 30 g/l. Content expressed in active substances: Total polyphenols (as gallic acid) more than 7,000 mg/l, Total polyphenols (such as catechins) more than 6,500 mg/l, Flavonoids (Galangin) 750 mg/kg.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

През първата година на изпитването, след сравняване произходите по тегло на свежи листа от третираните растения с Fertileder Rame се установи, че само два произхода (A10 и 28SR) не превишават доказано съответните контроли (Таблица 1). При третирането на произходите с течния тор Vitalosol Gold, при седем произхода се констатира доказано повишение на теглото от свежи листа (Стела, A8, A9, 203/2, 214/2, 10SHZ, 28SR). Доказан положителен

RESULTS AND DISCUSSION

In the first year of the testing, after comparison of the fresh leaves weight of the treated with Fertileder Rame plants, it was established that only two origins (A10 and 28SR) do not exceed the relevant controls with proved differences (Table 1).

The treatment with the fluid fertilizer Vitalosol Gold brought to prove excess of the fresh leaves weight for seven origins (Stela, A8, A9, 203/2, 214/2, 10SHZ, 28SR). Positive effect was received for all

ефект се получава при всички произходи третирани с Eurovix Propolis с изключение на 9E, където реакцията спрямо органично торене е най-слаба.

origins, treated with Eurovix Propolis, with the exception of 9E, where the difference was not proved.

Таблица 1. Добив от свежи и сухи листа, 2017
Table 1. Yield of fresh and dry leaf weight, 2017

Variant	Control		Fertileder Rame		Vitalosol Gold		Eurovix Propolis	
	Fresh	Dry	Fresh	Dry	Fresh	Dry	Fresh	Dry
	g/plant	g/plant	g/plant	g/plant	g/plant	g/plant	g/plant	g/plant
Stella	176,2	62,3	156,4*	52,9	230,0*	72,3	218,0*	71,0
A 8	110,2	55,9	214,6*	100,0*	149,0*	52,8	166,0*	72,3*
A 9	110,0	50,7	182,0*	97,3*	182,4*	93,1*	186,6*	91,4*
A 10	148,4	63,3	110,4	30,4	154,6	54,6	186,4*	74,4
7 E	166,0	88,3	182,2*	89,0	191,0	96,3	291,4*	100,5
9 E	131,0	45,9	163,4*	59,8	157,4	57,9	133,8	54,5
203/2	160,2	46,1	179,6*	43,3	203,2*	53,4	224,0*	54,9
214/2	146,6	48,0	210,8*	86,1*	219,8*	86,9*	226,0*	58,5
10 SHZ	171,0	46,1	210,4*	80,0*	222,2*	73,5*	224,0*	83,1*
28 SR	110,0	28,8	135,6	46,7	191,0*	76,6*	184,4*	77,9*
Average	143,0	53,5	174,5	68,6	190,1	71,7	204,1	73,9
GD 1%	27,2	18,0	27,2	18,0	27,2	18,0	27,2	18,0

Данните за теглото на сухата листна маса сочат, че произходите А9 и 10 SHZ, са реагирали положително и при трите листни тора. Реакцията към органичното торене с Fertileder Rame и Eurovix Propolis е най-силна при произход А8 показа доказана разлика при третирането, съответно 225.4 g и 214 g от едно растение.

Доказана разлика се получава при 214/2 третиран с Fertileder Rame и Vitalosol Gold, а при 28 SR третиран с Vitalosol Gold и Eurovix Propolis.

Прегледът на данните за продуктивността на свежи стъбла сочи, че отзивчиви на органично торене са произход А8, като при Fertileder Rame стойностите достигат до 331 g от растение, при средни стойности от 221 g при Eurovix Propolis и произход 214/2 - 331 g при средно за изпитаните произходи от 282.6 g и при Vitalosol Gold - 260 g

The data for weight of dried leaves indicated that the origins A9 and 10SHZ reacted positively to the three foliar fertilizers treatments. The reaction of the A8 origin to the application of Fertileder Rame and Eurovix Propolis was the greatest, and showed a significant difference, 225.4 g and 214 g, respectively.

A significant difference was obtained in 214/2 treated with Fertileder Rame and Vitalosol Gold, and in 28 SR treated with Vitalosol Gold and Eurovix Propolis.

A review of the data on the productivity of fresh stems indicated that responsive to organic fertilization were origin A8, with Fertileder Rame values reaching 331 g per plant, average values of 221 g for Eurovix Propolis and origin 214/2 - 331 g average for tested origins of 282.6 g and for Vitalosol Gold - 260 g (Table 2). Also effective were the treatments

(Таблица 2). Положителен ефект върху 203/2 са оказали Fertileder Rame и Eurovix Propolis, а при 28SR - Vitalosol Gold и Eurovix Propolis. Eurovix Propolis е оказал положителен ефект и върху A10 и 7E, докато на Стела и 10SHZ са повлияни положително само Vitalosol Gold съответно 286.4 g и 291 g от едно растение.

of 203/2 with Fertileder Rame and Eurovix Propolis, and of 28SR - with Vitalosol Gold and Eurovix Propolis. Eurovix Propolis treatment affected positively the stem's weight of A10 and 7E, while Stela and 10SHZ were positively affected by the Vitalosol treatment only, 286.4 g and 291g, respectively.

Таблица 2. Добив от свежи и сухи стъбла, 2017
Table 2. Yield of fresh and dry stems weight, 2017

Variant	Control			Fertileder Rame			Vitalosol Gold			Eurovix Propolis		
	Fresh	Dry	Height	Fresh	Dry	Height	Fresh	Dry	Height	Fresh	Dry	Height
	g/plant	g/plant	cm	g/plant	g/plant	Cm	g/plant	g/plant	cm	g/plant	g/plant	cm
Stella	250,0	64,2	85,6	168,6	48,5	85,6	286,4*	99,2*	114,7*	229,4	103,5*	107,8*
A 8	155,6	59,2	104,9	331,0*	88,0	127,8*	244,4*	72,2	80,2	274,0*	78,9	87,2
A 9	275,6	94,7	80,2	270,6	95,4	108,0*	244,2	101,9	91,0	294,6	94,3	92,2
A 10	214,2	57,7	100,5	128,2	36,7	71,2	223,0	68,5	95,3	271,0*	69,9	79,5
7 E	234,6	87,2	112,6	190,6	66,9	93,4	227,6	80,3	103,6	395,4*	125,5*	99,7
9 E	253,2	86,7	109,5	240,2	67,4	97,8	218,6	67,9	109,7	183,0	50,7	104,1
203/2	188,2	52,3	87,2	223,0*	60,3	93,8	198,2	64,8	82,2	381,2*	138,8*	101,1
214/2	155,6	47,6	77,3	320,4*	96,1*	95,5	260,2*	74,3*	86,1	331,0*	90,6*	85,5
10 SHZ	234,8	89,7	88,8	226,2	89,3	81,0	291,0*	133,6*	89,9	244,4	87,1	88,2
28 SR	123,4	38,1	77,9	110,0	43,1	72,5	175,4*	82,6*	87,4	222,4*	75,8*	80,0
Average	208,5	67,7	92,5	220,9	69,2	92,7	236,9	84,5	94,0	282,6	91,5	92,5
GD 1%	24,1	22,2	15,7	24,1	22,2	15,7	24,1	22,2	15,7	24,1	22,2	15,7

След изсушаване и претегляне на стъблата, единствено при генотипа 214/2 се констатира доказана разлика след прилагането и на трите листни тора. При Стела и 28SR положително влияние се наблюдава след третирането с Vitalosol Gold и Eurovix Propolis. Произходите 7E и 203/2 са повлияни положително от Eurovix Propolis, а 10 SHZ от Vitalosol Gold.

Доказано влияние върху височината на растенията се установи при Стела третирана с Vitalosol Gold и Eurovix Propolis - 114,7 cm и 107.8 cm съответно, а при произходите A8 - 127.8 cm и A9 - 108.0 cm третирани с Fertileder Rame.

През 2018 г. доказана положител-

After drying and measuring the weight of the dried stems, only the 214/2 showed proved difference after the application of the three foliar fertilizers. For Stela and 28SRE a proved effect was established by treatment with Vitalosol Gold and Eurovix Propolis, while the origins 7E and 203/2 were positively affected by Eurovix Propolis treatment, and 10SHZ – by the application of Vitalosol Gold.

Proved positive effect for the plant's height was established for Stela treated with Vitalosol Gold and Eurovix Propolis - 114,7 cm and 107.8 cm, and for A8 - 127.8 cm and A9 - 108.0 cm - treated with Fertileder Rame.

In 2018 the treatment with the three

на разлика при теглото на свежи листа след третиране с трите тора се получи при следните произходи: А8, А9, 7Е, 9Е, 214/2 (Таблица 3). Листните торове Vitalosol Gold и Eurovix Propolis са оказали положително въздействие при сорт Стела и 28SR. При произходите А10 и 203/2 положително влияние в теглото на свежа листна маса се наблюдава само след третирането с Eurovix Propolis.

foliar fertilizers brought to significant exceed of ther fresh leaves mass of the origins A8, A9, 7E, 9E, 214/2 (Table 3). The fertilizers Vitalosol Gold and Eurovix Propolis affected positively Stela and 28SR. The fresh leaves mass of the origins A10 and 203/2 was significantly higher than that of the control after the sole treatment with Eurovix Propolis.

Таблица 3. Добив от свежи и сухи листа, 2018
Table 3. Yield of fresh and dry leaf weight, 2018

Variant	Control		Fertileder Rame		Vitalosol Gold		Eurovix Propolis	
	Fresh g/plant	Dry g/plant	Fresh g/plant	Dry g/plant	Fresh g/plant	Dry g/plant	Fresh g/plant	Dry g/plant
Stella	180,4	69,3	163,6	63,1	250,0*	83,7	207,0*	66,6
A 8	116,4	42,5	225,4*	97,8*	159,0*	57,2	214,0*	76,3*
A 9	100,0	44,3	178,0*	90,3*	201,0	97,3*	203,4*	93,6*
A 10	151,6	65,3	106,8	28,2	162,0	58,8	180,2*	72,2
7 E	166,6	89,3	204,4*	91,0	194,0*	97,1	303,6*	104,5
9 E	119,0	41,7	163,2*	60,2	162,6*	60,1	146,2*	57,5
203/2	179,8	48,9	199,0	45,3	196,8	50,0	249,4*	57,1
214/2	120,0	43,6	205,8*	83,9*	240,2*	84,7*	227,4*	58,1
10 SHZ	217,8	42,7	218,0	81,6*	237,8	78,1*	201,0	76,9*
28 SR	130,0	31,2	128,4	45,3	209,0*	73,4*	181,6*	78,1*
Average	148,2	51,9	179,3	68,7	201,2	74,0	211,4	74,1
GD 1%	24,3	33,0	24,3	33,0	24,3	33,0	24,3	33,0

След изсушаването на листната маса доказана разлика при третиранията с трите листни тора се получи при произходите А9 и 10SHZ.

Доказан положителен ефект се получи при А 8 третиран с Fertileder Rame и Eurovix Propolis, 214/2 третиран с Fertileder Rame и Vitalosol Gold, 28 SR третиран с Vitalosol Gold и Eurovix Propolis.

При произходите А8, 203/2, 214,2 доказана разлика в теглото на свежи стъбла се установява след третиранията и с трите препарата (Таблица 4). Може да се отбележи, че Vitalosol Gold

The proven difference of dried leaves mass of the origins A9 and 10SHZ was significantly higher than the mass of the control's dried leaves mass, for the treatments with the three foliar fertilizers. A significant positive effect was established for the treated with Fertileder Rame and Eurovix Propolis origin A8, and for the origin 214/2 treated with fertileder Rame and Vitalosol Gold, as well as for 28SR treated with Vitalosol Gold and Eurovix Propolis.

The proven difference in origins A8, 203/2, 214/2 for fresh stems mass was established after treatment with the three foliar fertilizers (Table 4). Vitalosol Gold has significantly increased the mass of

доказано е повишил масата на свежи стъбла при сорт Стела и произход 10 SHZ, а Eurovix Propolis при произходите A9 и A10.

fresh stems of Stela and 10SHZ, while Eurovix Propolis had positive effect on the same index of A9 and A10.

Таблица 4. Добив от свежи и сухи стъбла, 2018
Table 4. Yield of fresh and dry stems weight, 2018

Variant	Control			Fertileder Rame			Vitalosol Gold			Eurovix Propolis		
	Fresh g/plant	Dry g/plant	Height cm	Fresh g/plant	Dry g/plant	Height Cm	Fresh g/plant	Dry g/plant	Height cm	Fresh g/plant	Dry g/plant	Height cm
Stella	253,4	69,2	87,8	171,4	51,5	87,7	293,6*	104,8*	116,9*	245,6	99,1*	100,2
A 8	161,0	45,8	102,7	335,6*	85,4*	125,6*	239,6*	75,8*	82,4	266,0*	81,1*	89,4
A 9	284,4	90,3	76,8	284,4	92,4	105,4*	235,8	98,1	89,1	300,4*	95,7	92,8*
A 10	214,4	59,5	104,5	129,0	34,7	68,8	220,4	64,9	92,7	282,4*	70,1	80,5
7 E	228,0	87,8	114,0	205,4	68,1	96,6	252,4*	83,1	106,4*	399,6*	129,5*	103,9
9 E	251,8	83,3	105,5	211,4	67,6	98,4	213,4	70,1	101,7*	187,0	53,7	104,3
203/2	185,2	54,3	89,2	219,8*	62,5	95,2	208,4*	61,8	80,1	382,2*	141,2*	105,5
214/2	161,0	44,0	72,5	313,0*	93,9*	92,5	263,2*	72,0	85,0	335,6*	89,4*	87,2
10 SHZ	229,6	93,7	90,2	223,8	90,7	85,2	283,6*	138,0*	93,6	242,2	82,9	86,6
28 SR	122,3	39,9	73,5	106,0	40,9	70,2	192,2*	80,0*	85,2	219,6*	76,2*	83,2
Average	209,1	66,8	91,7	220,0	68,8	92,6	240,3	84,9	93,3	286,1	91,9	93,4
GD 1%	15,8	12,5	15,6	15,8	12,5	15,6	15,8	12,5	15,6	15,8	12,5	15,6

Прилагането на органичните торове при произходите A8 и 214/2 води до доказана разлика спрямо контролния вариант относно теглото на сухи стъбла. Третирането с Vitalosol Gold и Eurovix Propolis повишава теглото на сухите стъбла при сорт Стела и произхода 28 SR, Vitalosol Gold при 10SHZ, Eurovix Propolis при 7E и 203/2.

Доказана разлика във височината на растенията се наблюдава при произхода A8 - 125.6 cm, третиран с Fertileder Rame, сорт Стела третиран с Vitalosol Gold - 116.9 cm и A9 третиран с Fertileder Rame - 105.4 cm.

Данните за продуктивността на свежа и суха маса както и на стъблата изразена в kg/da за периода 2017-2018 г, са посочени във Фигура 1. Констатира се положително въздействие на изпитаните органични продукти върху продуктивността на генофонда от стевия.

It was measured significantly higher dry stems mass for the origins A8 and 214/2, when treated with the three foliar fertilizers. The treatment with Vitalosol Gold and Eurovix Propolis resulted in higher dry stems weight of Stela and 10SHZ. A higher dry stems weight was measured for the 10SHZ treated with Vitalosol Gold, for 7E and 203/2 treated with Eurovix Propolis.

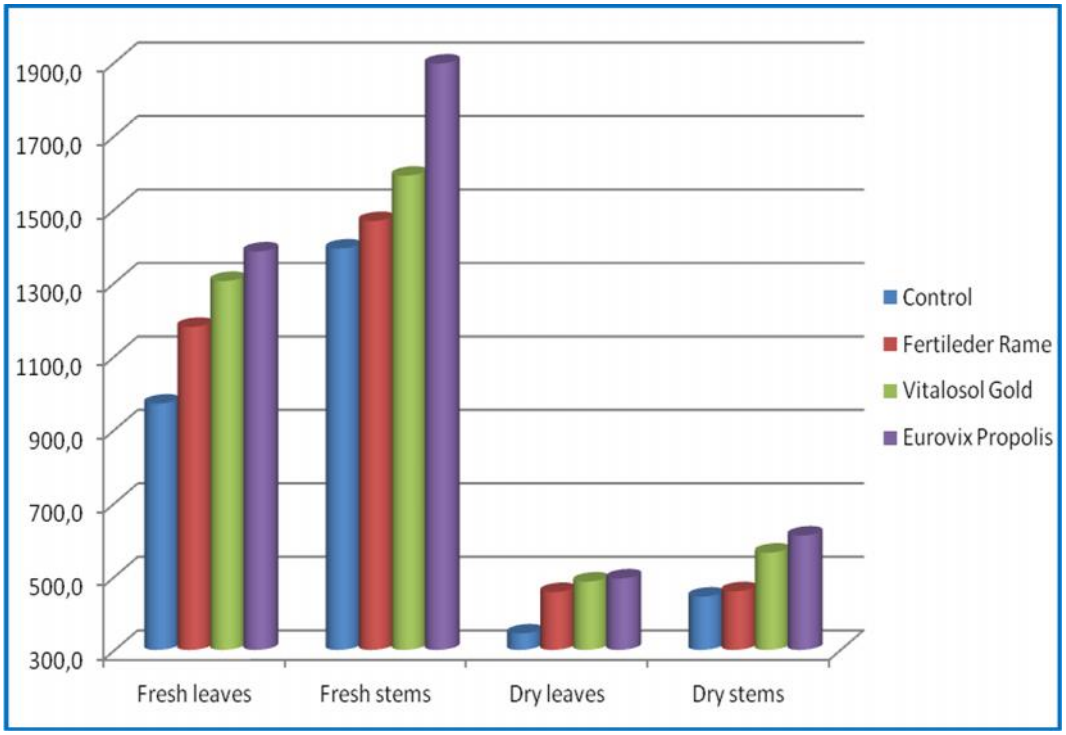
A significant difference was established for the plants height for A8 - 125.6 cm treated with Fertileder Rame, for Stela – treated with Vitalosol Gold - 116.9 cm, and for A9 - 105.4 cm treated with Fertileder Rame.

Figure 1 shows the productivity data for dry and fresh mass as well as stems in kg/ da for the period 2017-2018 (Figure 1). A positive effect of the tested organic products on the productivity of the Stevia's gene pool was found. The use of Eurovix propolis has been shown to

Прилагането на Eurovix propolis доказано увеличава добивът както на свежа листна маса така и на свежите стъбла. Стойностите на показателя добив суха листна маса, са приблизително еднакви при прилагането и на трите органични продукта. Може да се отбележи, че увеличението е най-осезателно след прилагането на Eurovix propolis и най-ниско при растенията третирани с Fertileader Rame. При добива сухи стъбла, третирането с Fertileader Rame не води до осезаем ефект и стойностите са близки до контролния вариант, докато прилагането на Eurovix propolis и Vitalosol Gold води до превишение спрямо контролата с близо 30%.

increase the yield of both fresh leaves and fresh stems. The values of the dry leaf mass yield were approximately the same for the application of all three organic products. It can be noted that the increase was most noticeable after the application of Eurovix propolis and the lowest in plants treated with Fertileader Rame.

In the production of dry stems, the treatment with Fertileader Rame did not lead to a noticeable effect and the values were close to the control variant, while the application of Eurovix propolis and Vitalosol Gold led to an excess over the control of nearly 30%.



Фиг. 1. Продуктивност на стевия при използването на органични листни торове, средно за 2017-2018 г., kg/da
Fig. 1. Productivity of stevia when treated with organic leaf fertilizers on average for 2017-2018, kg/da

ИЗВОДИ

1. Третирането с органични препарати води до доказано положително влияние върху повечето изпитани генотипи стевия, като най-чувствително е увеличението на зелената листна и стъблена маса, по-слабо при сухата маса от листа и стъбла и най-слабо-върху височината на растенията.

2. Най-висок ефект върху стопанските качества на стевия има третирането с листните торове Vitalosol Gold и Eurovix Propolis.

3. Височината на растенията при сорт Стела се повлиява в значителна степен след прилагането на Vitalosol Gold.

4. Прилагането на Eurovix propolis доказано увеличава добивът както на свежа листна маса така и на свежите стръбла и съответно води до най-висока продуктивност на суха листна маса

5. Използването на Eurovix propolis и Vitalosol Gold води до превишение на сухите стъбла спрямо контролата с близо 30%.

CONCLUSIONS

1. Treatment with organic fertilizers led to a proven positive effect on most tested Stevia genotypes, the most sensitive being the increase in fresh leaf and stem mass, weaker in the dry mass of leaves and stems and the weakest in plant height.

2. The highest effect on the economic qualities of Stevia has the treatment with foliar fertilizers Vitalosol Gold and Eurovix Propolis.

3. The height of the plants in the Stella variety is significantly affected after the application of Vitalosol Gold.

4. The application of Eurovix propolis has been shown to increase the yield of both fresh leaf mass and fresh stalks and thus leads to the highest productivity of dry leaf mass

5. The use of Eurovix propolis and Vitalosol Gold led to an excess of dry stems compared to the control by nearly 30%.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Bozhanska, T., B. Chourkova and T. Mihova**, 2017. Influence of Growth Regulators and Bio-fertilizers on Productivity of Perennial Legume Forage Grasses in Central Balkan Mountains. *Journal of Balkan Ecology*, 20 (2), 135-144.
2. **Cacciola, F., P. Delmontea, K. Jaworska, P. Dugo, L. Mondello and J. Rader**, 2011. Employing Ultra-High-Pressure Liquid Chromatography As the Second Dimension in a Comprehensive Two-dimensional System for Analysis of *Stevia rebaudiana* Extracts. *J. Chromatography A*, 1218, 2012-2018.
3. **Carneiro, J. W. P., A. S. Muniz, A. S and T. A. Guedes**, 1997. Greenhouse Bedding Plant Production of *Stevia rebaudiana* (Bert) Bertoni. *Can. J. Plant Sci.,* 77, 473-474.
4. **Cimpeanu, M , I. Toma, G. Zbughin, C. Cimpeanu and G. Capraru**, 2006. Cytogenetics and Morpho-anatomy in *Stevia rebaudiana* Bertoni. In: Proceedings from the Third Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries, Belgrade, Serbia, 5-8 September 2004, pp. 108-112.
5. **Eghball, B., D. Ginting and J. E. Gilley**, 2004. Residual Effects of Manure and Compost Applications on Corn Production and Soil Properties. *Agronomy Journal*, 96, 442-7.
6. **Enchev, S., A. Mehmed and G. Kikidonov**, 2018a. Effect of Mineral and Organic Fertilization on the Production of Stevia (*Stevia rebauduana* B.). *Bulg. J. Agric. Sci.*, 24 (Suppl. 2), 100-103.
7. **Enchev, S., A. Mehmed and G. Kikindonov**, 2018b. Application results of Mineral and Organic Fertilization on economic qualities of Stevia (*Stevia Rebaudiana*

B.). *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans*, 21 (2), 236-246.
8. **Fernandez, R., R. Scull, J. L. Gonzales, M. Crespo, E. Sanchez and C. Carball**, 1993. Effect of Fertilization on Yield and Quality of *Matricaria reculita* L. (Chamomile). Aspects of Mineral Nutrition of the Crop. Memorias 11th Congress Latino Americano de la Ciencia del Suelo. *2 Congresso Cubcno de la Ciencia del Suelo, Berlin, Germany*, pp. 891-894.
9. **Fronza, D. and M. V. Folegatti**, 2003. Water Consumption of the *Stevia* (*Stevia rebaudiana* Bert.) Crop Estimated through Microlysimiter. *Scientia. Agricola*, 60-80.
10. **Geuns, J. M. C.**, 2003. Molecules of Interest Stevioside. *Phytochemistry*, 6, 913-921.
11. **Hoseini, R. Z., E. M. Goltapeh and S. Kalatejari**, 2015. Effect of Bio-fertilizer on Growth, Development and Nutrient Content (Leaf and Soil) of *Stevia rebaudiana* Bertoni*. J. Crop Prot.*, 4 (Supplementary), 691-704.
12. **Kaschieva, M. and P. Todorova**, 2017. *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Breeding in Bulgaria. In: Collection of papers XV conference with international participation "Natural Sciences 2017", 29.09-01.10.2017, Varna, Bulgaria, pp. 92-97 (Bg).
13. **Kikindonov, Tz.**, 2013. Assessment of Initial Material for Stevia (*Stevia rebaudiana* B.) Breeding. *Agricultural Science and Tehnology*, Vol.5, №1, 22-24 (Bg).
14. **Kikindonov, Tz. and St. Enchev**, 2012. Assessment of Seeds Germination of Stevia (*Stevia rebaudiana* B.) Origins. *Agricultural Science*, 45 (3), 18 -23 (Bg).
15. **Kikindonov, Tz., S. Enchev and A. Mehmed**, 2017. Stability of Characters, Forming Foliar Mass Productivity of Elite Population of the New Stevia Variety Stela. *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans*, 20 (1), 363-371.
16. **Marinova, D., S. Stoiyanova, and I. Petrova**, 2019. Study of the Effect of Biostimulants Application on Green Mass and Dry Matter Yield in Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Prista 4 Variety. *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans*, 22 (3), 64-80.
17. **Mihova, T., D. Georgiev, B. Brashlyanova and P. Ivanova**, 2017. Influence of Organic Fertilization on the Biochemical Composition of Fresh and Dried Fruits of Japanese Quince (*Chaenomeles sp.).* In: Proceedings of the VIII International Agricultural Symposium „AGROSYM 2017“, pp. 1654-1659.
18. **Pashev, M. and V. Badjelova**, 2019. Vegetative Actions of Plum Trees, Stanley Variety after Treatment with Innovative Organic Fertilizers. *Bulgarian Journal of Crop Science*, 56 (4), 15-25.
19. **Petkova, B. and I. Poryazov**, 2007. Biological Efficiency of Complex Fertilizer. Hummustim in Beans and Brussels Sprouts. *Plant Breeding Sciences,* 44, 154-158 (Bg).
20. **Robabeh Asghari**, 2018. Effect of Different Plant Beds and Fertilizers on Stevia *(Stevia rebaudiana* Bertoni*)* Production. *Australian Journal Of Crop Science,* 12(01), 51-55.
21. **Staneva, I., G. Kornov and M. Gospodinova**, 2018. Effect of Fertilization with Bio-products on the Yield of the Peach cv. 'Glohaven' under the Conditions of Integrated Plant Production. *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans*, 21 (1), 231-241.
22. **Tanova, K. and M. Kaschieva**, 2018. Testing Alternative Control Means for the Pathogenic Fungus Alternaria alternate f.ssp. stevae, Isolated from Stevia – *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans*, 21 (6), 214-223
23. **Ucar, E., K. Turgut, Y. Ozyigit, T. Ozek and G. Ozek**, 2018. The Effect of Different Nitrogen Levels on Yield and Quality of Stevia (*Stevia rebaudiana* bert.). *Journal of Plant Nutrition*, 41 (9), 1130-1137.
24. **Uchkunov, V., I. Uchkunov and K. Slanev**, 2016. Defining the Level of

Steviol Glycosides in the Stevia Leaves (*Stevia Rebaudiana* B.) in Different Genotypes. *Scientific work of college - Dobrich*, vol. IX, 113-119 (Bg).
25. **Uchkunova, K. and V. Uchkunov**, 2013. Influence of the Planting Density on the Economical Qualities of Stevia (*Stevia rebaudiana* B.). *Plant Sciece*, 50, 34-36.
26. **Umesha, K., G.R. Smitha, B.S. Sreeramu and A.A. Waman**, 2011. Organic Manures and Bio-fertilizers Effectively Improve Yield and Quality of Stevia (*Stevia rebaudiana*). *Journal of Applied Horticulture,* 13 (2), 157-162.
27. **Vitkov, V.**, 2015. Reproductive Manifestations of Some Apple Cultivars and Forms from the Local Gene Pool in the Region of the Town of Apriltsi. *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans,* 18 (1), 112-136.
28. **Yakimov, D. and L. Ivanov**, 2017. Influence of New Foliar Organic Fertilizers on the Yield and the Value-Added of Maize (*Zea mays* L.). IV. International Balkan and Near Eastern Social Sciences Congress Series - Russe / Bulgaria, pp. 251-255.
29. **Yücesan, B., R. Büyükgöçmen, A. Mohammed, M. Sameeullah, C. Altuğ, S. Gürel and E. Gürel**, 2016. An Efficient Regeneration System and Steviol Glycoside Analysis of *Stevia rebaudiana* Bertoni, a Source of Natural High-intensity Sweetener. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant,* 52: 330-337. DOI 10.1007/s11627-016-9765-6

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2020, 23 (4), 243-250
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan
ISSN 1311-0489 (Print)
ISSN 2367-8364 (Online)

Технологични решения за получаване на нетрадиционен високоенергиен хляб с повишено съдържание на протеини, влакнини, мазнини и минерален състав

Илиана Лазова-Борисова

Институт по криобиология и хранителни технологии, 1407 София, България

Technological Solutions for the Production of Unconventional High-energy Breads with High Protein, Fiber, Fat and Mineral Content

Iliana Lazova-Borisova

Institute of Cryobiology and Food Technology, 1407 Sofia, Bulgaria
***E**-mail: iliana_lazova@abv.bg*

Original scientific paper

РЕЗЮМЕ

Иновативния продукт диабетичен хляб е разработен на основата на пълнозърнесто био ръжено брашно с добавка на брашно от био тютюнево семе *(сорт Ориенталски),* сол, суха мая, ръжена закваска. Целта на изследването е да се разработи иновативна технология за високоенергиен хляб с обогатено съдържание на протеини, мазнини, влакнини, минерален състав, за сметка на въглехидратната компонента, който е предназначен за специфични здравословни нужди. От направеното проучване се установи, че протеиновото съдържание в хляба от пълнозърнесто ръжено брашно и брашно от тютюнево семе е 8,15%, а в ръжения хляб без добавка е 5,95%. По отношение на мазнините в био ръжено-тютюневия хляб съдържанието е 2,72%, а в хляба без добавка е 0,66%. Количеството на влакнини в нетрадиционния хляб е 8,60%, а в ръжения е 4,72%.

SUMMARY

The innovative product diabetic bread is developed on the basis whole meal organic rye flour with the addition of organic tobacco seed flour (Oriental variety), salt, dry yeast, rye yeast.

The aim of the study is to develop an innovative technology for high-energy bread with enriched content of protein, fat, fiber, mineral composition, at the expense of the carbohydrate component, which is intended for specific health needs. From the study, it was found that the protein content of wholegrain rye bread and flour tobacco seed is 8,15% and rye bread without addition is 5.95%.

As regards fat in organic rye-tobacco bread, the content is 2.72% and in bread without additives it is 0.66%. The amount of fiber in non-traditional bread is 8.60% and in the rye it is 4.72%.

Въглехидратната компонента в новия хляб е занижена на 25,55% от 39,9 % при ръжения. Енергийната стойност на био пълнозърнестия хляб е 220 kcal/100 g продукт, а на ръжения е 204 kcal/100 g продукт.

По отношение на желязото в иновативния продукт е 16,48 mg/kg, респ.при ръжения хляб е 14,33 mg/kg. Цинкът в иновативния продукт е 15,33 mg/kg, респ.при ръжения хляб е 14,87 mg/kg.

Хлябът е предназначен за хора, със специфични здравословни нужди – страдащи от диабет тип 2, стомашно-чревни заболявания, активно спортуващи, както и с профилактична цел.

Ключови думи: био, пълнозърнест, нетрадиционен, хляб, диабет тип 2

The carbohydrate component in the new bread is reduced to 25.55% from 39.9% in rye. The energy value of organic whole grain bread is 220 kcal / 100 g of product, and of rye is 204 kcal / 100 g of product.

In terms of Fe, the innovative product is 16.48 mg / kg, or 14.33 mg / kg for rye bread. For Zn, the innovative product is 15.33 mg / kg, respectively for rye bread it is 14.87 mg / kg.

The bread is intended for people with specific health needs - suffering from type 2 diabetes, gastrointestinal diseases, active sports, and for prophylactic purposes.

Key words: organic, whole grain, unconventional, bread, type 2 diabetes

УВОД

Производството на хляб за специфични здравни нужди представлява голям дял от общото производство. Това е хляб, който освен нормалната си хранителна стойност, убедително показва, че има здравословен ефект върху една или повече функции на организма. Науката за храните може да осигури технологични решения за здравословни и функционални храни, които при дългосрочна употреба имат благоприятен ефект върху човешкото тяло стимулират имунната система и играят превантивна роля срещу незаразните заболявания. Проучванията през последните години показват защитната роля на пълнозърнестите храни при някои заболявания на съвременните общества, като диабет тип 2 (Collar et al., 2001; Mangova, 2003; Renzetti et al., 2008), сърдечно-съдови заболявания (Mihalkova, 2009) и някои видове карциноми (Collar et al., 2001). Диетичните фибри са основен компонент на зърнените култури (Mihalkova, 2008). Това предполага разработването на специфични технологии за изброените видове хляб, които имат тези защитни функции. Пълнозърнестите храни също са

INTRODUCTION

The production of bread for specific health needs accounts for a large share of total production. This is bread, which in addition to its normal nutritional value, convincingly shows that it has a healthy effect on one or more functions of the body. Food science can provide technological solutions for healthy and functional foods that, with long-term use, have a beneficial effect on the human body - stimulate the immune system and play a preventive role against non-communicable diseases.

Studies in recent years have shown the protective role of whole grains in some diseases of modern societies, such as type 2 diabetes (Collar et al., 2001; Mangova, 2003; Renzetti et al., 2008), cardiovascular disease (Mihalkova, 2009) and some types of carcinomas (Collar et al., 2001).

Dietary fiber is a major component of cereals (Mihalkova, 2008). This implies the development of specific technologies for these types of bread, which have these protective functions. Whole grains are also a source of phytoestrogens,

източник на фитоестрогени, фенолни съединения, антиоксиданти, фитинова киселина и стероли (Banu and Aprodu, 2012).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

- Органолептична оценка на диабетичния хляб - външен вид, цвят, вкус, аромат (БДС15612-83).
- Определяне съдържанието на общ белтък в хляба - метод на Келдал (БДС 13490-76)
- Екстракцията на общи липиди в хляба е извършена по метода на Bligh & Dyer (Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 1959), като метиловите естери на мастните киселини /FAME/ се анализират с помощта на газов хроматограф Shimadzu-2010 (Kyoto, Japan), снабден с пламъчно-йонизационен детектор и автоматична инжекционна система.
- Определяне съдържанието на маслини в хляба - апарат „Soxtec“ (БДС 1671-89).
- Определяне съдържанието на обща пепел в хляба (БДС ISO 2171:1999).
- Определяне съдържанието на влакнини в хляба(БДС ISO 5498:1999).
- Енергийна стойност на 100g продукт kJ/kcal/ - изчисляване на базата на химичния състав в хляба.
- Макро- и микроелементите в хляба са определени с помощта на Атомно-емисионен фотометър ICP-MS ”Agilent ” 8900.
- Към основното био ръжено брашно са добавени 5 % брашно от био тютюнево семе. Енергийната стойност на хляба варира в зависимост от изходните брашна от 400 до 500 kcal/100 g продукт.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Направени са редица пробни лабораторни изпичания на хляб от пълнозърнесто био ръжено брашно, суха мая, готварска сол и добавка на био брашно от тютюнево семе.

phenolic compounds, antioxidants, phytic acid and sterols (Banu and Aprodu, 2012).

MATERIAL AND METHODS

- Organoleptic evaluation of diabetic bread - appearance, color, taste, aroma (BDS15612-83).
- Determination of total protein content in bread - Keldal's method (BDS 13490-76)
- The extraction of total lipids in bread was performed by the method of Bligh & Dyer (Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 1959),as the methyl esters of fatty acids /FAME/ were analyzed using a gas chromatograph Shimadzu-2010 (Kyoto, Japan), equipped with a flame ionization detector and an automatic injection system.
- Determination of the fat content in the bread - Soxtec apparatus (BDS 1671-89).
- Determination of total ash content in bread (BDS ISO 2171: 1999).
- Determination of fiber content in bread (BDS ISO 5498: 1999).
- Energy value per 100g of product kJ /kcal/ - calculation based on the chemical composition in the bread.
- The macro- and microelements in bread are determined using the Atomic Emission Photometer ICP-MS "Agilent" 8900.
- 5% organic tobacco flour is added to the basic organic rye flour. The energy value of bread varies depending on the starting flours from 400 to 500 kcal/100 g of product.

RESULTS AND DISCUSSION

A number of test laboratory baking of wholemeal organic rye flour bread, dry pressed yeast, table salt and addition of organic tobacco seed flour were made.

Рецептурен състав на тестото
Контрола

основни суровини: пълнозърнестото био ръжено брашно – 100%, готварска сол - 2,0 %, суха мая – 2,0%

Проба

основни суровини: пълнозърнестото био ръжено брашно – 95%, готварска сол - 2,0 %, суха мая – 2,0 %

допълнителна суровина: тютюнево брашно - 5%.

Технологична подготовка

Направена е предварителна подготовка на сухия микс от пълнозърнесто био ръжено брашно и брашно от тютюнево семе. Замесва се тесто от брашната и останалите компоненти с температура на водата 38 ^{o}C.

Характеристика на тестата след замесване

Контрола - лепи, меко , бухнало тесто, светлобежов цвят

Проба - нормална консистенция, по-малко лепи от проба 1, добре развито, бледобежов цвят

Ферментацията е проведена за 20 минути при 36 ºC, премесване и ферментация за още 30 минути. Окончателната ферментация е 80 минути.

Характеристика на тестата след окончателна ферментация

Контрола - лепи, меко, бухнало тесто, светлобежов до кремавцвят

Проба - нормална консистенция, лепи по-малко от проба 1, добре развито, бухнало тесто, бледобежов цвят

Изпичането на хляба е проведено за 50 минути при 200 ºC.

Recipe composition of the dough
Control

main raw materials: whole grain organic rye flour - 100%, table salt - 2.0%, dry pressed yeast - 2.0%

Sample

main raw materials: whole grain organic rye flour - 95%, table salt - 2.0%, dry pressed yeast - 2.0%

additional raw material: tobacco flour - 5%.

Technological preparation

Preliminary preparation of the dry mix of whole grain organic rye flour and tobacco seed flour was made. Knead the dough from the flour and the other components with a water temperature of 38 ^{o}C.

Characteristics of the test after kneading

Control - soft consistency, puffy dough, light beige colour

Sample - normal consistency, less sticky than sample 1, well developed, pale beige colour

The fermentation was carried out for 20 minutes at 36 ºC, stirring and fermentation for another 30 minutes. The final fermentation is 80 minutes.

Characteristics of the test after final fermentation

Control - soft consistency, puffy dough, light beige to creamy

Sample - normal consistency, sticks less than sample 1, well-developed, puffy dough, pale beige colour

The bread was baked for 50 minutes at 200 ºC.

Таблица 1. Качествена оценка на хляба
Table 1. Quality assessment of bread

Вид хляб Type of bread	Маса Mass g	Обем Volume cm^3	Спец. обем Specific volume cm^3/g	Дължина Length mm	Височина Height mm	Ширина Width mm	Влага на сърцевината Moisture in the middle, %
Контрола/Control Ръж/Rye	248,4	410	1,65	123	50	82	48,20
Проба/Sample ръж+тютюн rye+tobacco	259,4	390	1,50	123	52	83	48,65

На Таблица 1 е показана влагата на контролата и пробата, която няма съществена разлика. С по-голяма маса е пробата (259,4 g), обема на пробата е по-нисък (390 **cm^3**).

Характеристика и сензорна оценка на изпечения хляб

Контрола – Правоъгълно хлебче с правилна форма, леко напукана горна кора. Цветът на кората е златисто-кафяв. Шупливостта на средината е дебелостенна, дребна. Средината е мека на пипане, при натиск възстановява обема си. Цветът на средината е светло-кафяв с червеникав оттенък. Вкусът е приятен и характерен без привкус, леко лепи при сдъвкване. Мирисът е типичен.

Проба – Правоъгълно хлебче с правилна форма с леки грапавини по горната кора. Цветът на кората е светло кафяв. Шупливостта на средината е средна, развита. Средината е измесена, не лепи. Вкусът е типичен за състава, приятен. Мирисът е характеренза вида суровини.

На Таблица 2 е показан физико-химичния състав на диабетичния хляб.

Table 1 shows the control moisture and the sample, which did not differ significantly. The larger the sample (259.4 g), the lower the sample volume (390 cm^3).

Characteristics and sensory evaluation of baked bread

Control - Rectangular bread with a regular shape, slightly cracked top crust. The colour of the bark is golden brown. The porosity of the middle is thick-walled, small. The middle is soft to the touch, when pressed it regains its volume. The colour of the middle is light brown with a reddish tinge. The taste is pleasant and characteristic without aftertaste, slightly sticky when chewed. The smell is typical.

Sample - A rectangular loaf of regular shape with slight roughness on the upper crust. The colour of the bark is light brown. The porosity of the middle is medium, developed. The middle is mixed, not sticky. The taste is typical of the composition, pleasant. The smell is characteristic of the type of raw material.

Table 2 shows the physicochemical composition of diabetic bread.

Таблица 2. Физико-химичен състав на хляба
Table 2. Physico-chemical composition of bread

Вид хляб Type of bread	**Влага Moisture** %	**Протеини Protein** %	**Мазнини Fat** %	**Влакнини Fiber** %	**Пепел Ash** %	**БЕВ Carbo-hydrates** %	**Енергийна стойност kcal/100g продукт Energy value kcal/100g product**
Контрола Control Ръж/Rye	46,53	5,95	0,66	4,72	0,63	39,90	**204**
Проба Sample ръж +тютюн rye+tobacco	48,56	8,15	2,72	8,60	1,53	25,55	**220**

По отношение на протеините при контролата (5,95%) е с 3 % по-малко от съдържанието в хляба с добавка на тютюнево брашно (8,15%). Съдържанието на мазнини при ръжения хляб с добавка на тютюнево брашно(2,72%),

In terms of protein in the control (5.95%) is 3% less than the content in bread with the addition of tobacco flour (8.15%). The fat content of rye bread with the addition of tobacco flour (2.72%) increased compared to the control 4 times

нараства спрямо контролата 4 пъти (0,66%). Съдържанието на влакнините при ръжения хляб с добавка на тютюнево брашно (8,60%), нараства спрямо контролата 1,5 пъти (4,72%). Пепелното съдържание при пробата (1,53%), нараства 2 пъти спрямо контролата (0,63%). Въглехидратната компонента намалява при пробата (25,55%), с 14,35% спрямо контролата (39,90%). Енергийната стойност при пробата нараства с 16 kcal/100g продукт (220 kcal/100g продукт) спрямо контролата (204 kcal/100g продукт).

На Таблица 3 са показани динамичните изменения свързани с влагата на хляба.

(0.66%). The fiber content of rye bread with the addition of tobacco flour (8.60%) increased compared to the control 1.5 times (4.72%). The ash content of the sample (1.53%) increased 2 times compared to the control (0.63%).

The carbohydrate component decreased in the sample (25.55%), by 14.35% compared to the control (39.90%). The energy value of the sample increased by 16 kcal/100g product (220 kcal/100g product) compared to the control (204 kcal/100g product).

Table 3 shows the dynamic changes related to bread moisture.

Таблица 3. Динамика на хляба – влага 1-я, 3-я, 6-я ден
Table 3. Dynamics of bread - moisture 1st, 3rd, 6th day

Вид хляб Type of bread	Влага/Moisture,% 1 ден / 1st day	Влага/Moisture,% 3 ден / 3rd day	Влага/Moisture,% 6 ден / 6th day
Контрола/Control Ръж/Rye	46,53±0,02	43,57±0,02	40,73±0,02
Проба/Sample ръж+тютюн / rye+tobacco	48,56±0,02	47,19±0,02	44,13±0,02

Направен е анализ свързан с динамичните промени на влагата в готовия хляб, при което се установява, че при всеки следващ ден влагата намалява - хлябът старее.

От Таблица 4 е видно съдържанието на макроелементите в хляба.

An analysis was made related to the dynamic changes in the moisture in the finished bread, which found that with each passing day the humidity decreases - the bread ages.

Table 4 shows the content of macronutrients in bread.

Таблица 4. Съдържание на макроелементи в хляба
Table 4. Content of macronutrients in bread

Вид хляб Type of bread	Ca mg/kg	P g/kg	Na g/kg	K g/kg	Mg g/kg	S g/kg
ръжен / rye	48,43	1,31	4,44	2,20	0,38	0,67
ръж+тютюн / rye+tobacco	55,23	1,32	4,19	2,16	0,41	0,66

Анализът на макроелементите показва ограничен трансфер на калций в ръжения хляб. Добавката на тютюнево брашно променя в незначителна степен нивото на елемента, което достига до 55 mg/kg. Изхождайки от

The analysis of macronutrients shows a limited transfer of Ca in rye bread. The addition of tobacco flour slightly changes the level of the element, which reaches 55 mg/kg.

консумацията на човека в организма чрез ръжения хляб постъпват от 110 до 120 mg,което представлява 10% от необходимата потребност. Останалите макроелементи са добре балансирани в хляба и варират от 0,66 g/kg при сярата до 4,44 g/kg при натрия. Завишените нива на натрий се дължат на допълнително вложеното количество на готварска сол по рецептура.

От Таблица 5 е видно съдържанието на микроелементите в хляба.

Based on human consumption in the body through rye bread receive from 110 to 120 mg, which is 10% of the required need.

The other macronutrients are well balanced in bread and range from 0.66 g / kg at S to 4.44 g/kg at Na. The increased levels of Na are due to the additional amount of table salt used in the recipe.

Table 5 shows the content of trace elements in bread.

Таблица 5. Съдържание на микроелементния състав на хляба
Table 5. Content of the microelement composition of bread

Вид хляб **Type of bread**	**Cu** mg/kg	**Zn** mg/kg	**Mn** mg/kg	**Fe** mg/kg	**Co** µg/kg	**Se** µg/kg	**I** µg/kg
ръжен / rye	1,61	11,16	20,28	26,88	20,93	21,39	38,50
ръж+тютюн / rye+tobacco	1,69	11,06	19,79	14,50	21,52	19,55	34,98

Зърнените храни са бедни на мед, цинк, селен и йод, което рефлектира в изследваните асортименти. Особено силно изразен е дифицитът при цинка, селена и кобалта. При консумацията на хляб със и без добавка на тютюнево семе се осигуряват до 8 % на потребностите на човешкия организъм. Суплементирането на горепосочените елементи е препоръчително при разработката на ръжен хляб с органична добавка (тютюнево семе).

Cereals are poor in copper, zinc, selenium and iodine, which is reflected in the studied range. Zinc, selenium and cobalt deficiencies are particularly pronounced. When consuming bread with and without the addition of tobacco seeds, up to 8% of the needs of the human body are provided. The supplementation of the above elements is recommended in the development of rye bread with an organic additive (tobacco seed).

Таблица 6. Съдържание на някои токсични елементи в хляб
Table 6. Content of some toxic elements in bread

Вид хляб **Type of bread**	**Al** mg/kg	**Cr** mg/kg	**Ni** mg/kg	**Mo** mg/kg	**Sn** µg/kg	**Pb** µg/kg
Контрола/Control ръжен / rye	3,62	0,06	0,10	0,16	30,06	65,46
Проба Sample ръж+тютюн / rye+tobacco	3,14	0,06	0,11	0,16	10,25	33,70

От Таблица 6 е видно, че продуктът с органична добавка е беден на никел, хром и молибден. При влагането на тютюнево брашно към ръженото (10,25 µg/kg), нивото на калая се намалява 3 пъти спрямо контролата (30,06 µg/kg). При влагането на тютюнево брашно към ръженото (33,70 µg/kg),

Table 6 shows that the product with organic additive is poor in Ni, Cr and Mo.

When tobacco flour was added to rye (10.25 µg/kg), the Sn level decreased 3 times compared to the control (30.06 µg/kg). When tobacco flour was added to rye (33.70 µg/kg), the Pb level was

нивото на оловото се намалява 2 пъти спрямо контролата (65,46 µg/kg).

reduced 2-fold compared to the control (65.46 µg/kg).

ИЗВОДИ

Включването на био пълнозърнесто тютюнево брашно към био пълнозърнесто ръжено, води до увеличаване на съдържанието на мазнини, влакнини, протеини, пепелното съдържание, както и енергийната стойност за сметка на въглехидратната компонента, което ги определя като здравословни и полезни за човешкия организъм.

Нарастват нивата на желязото в иновативния продукт (16,48 mg/kg, респ. при ръжения хляб е 14,33 mg/kg). Цинкът в иновативния продукт е 15,33 mg/kg, респ.при ръжения хляб е 14,87 mg/kg.

Хлябът е предназначен за хора, със специфични здравословни нужди – страдащи от диабет тип 2, стомашно-чревни заболявания, активно спортуващи, както и с профилактична цел.

CONCLUSIONS

The inclusion of organic wholemeal tobacco flour to organic wholemeal rye leads to an increase in fat, fiber, protein, ash content and energy value at the expense of the carbohydrate component, which defines them as healthy and useful for the human body.

The levels of Fe in the innovative product increase (16.48 mg/kg, respectively for rye bread it is 14.33 mg/kg). For Zn in the innovative product is 15.33 mg/kg, respectively for rye bread is 14.87 mg/kg.

The bread is intended for people with specific health needs - suffering from type 2 diabetes, gastrointestinal diseases, active sports, as well as for prophylactic purposes.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Banu, I. and I. Aprodu**, 2012. Studies Concerning the Use of Lactobacillus helveticus and Kluyveromyces marxianus for Rye Sourdough Fermentation. *European Food Research Technology*, 234, 769-777.
2. BDS 13490-76, Determination of Total Protein Content - Keldal's Method.
3. BDS 1671-89, Determination of Fat Content - Soxtec Device.
4. BDS ISO 2171: 1999, Determination of the Content of Total Ash.
5. BDS ISO 5498: 1999, Determination of Fiber Content.
6. BDS15612-83, Organoleptic Evaluation of the Bread - Appearance, Color, Taste, Aroma.
7. **Blight, E. G. and W. J. Dyer***,* 1959. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Canadian Journal* of *Biochemistry* and *Physiology*, 37(8), 911-917. https://doi.org/10.1139/y59-099
8. **Collar, C., J.C. Martinez and C.M. Rosell**, 2001. Lipid Binding of Fresh and Stored Formulated Wheat Breads. Relationship with Dough and Bread Technological Performance. *Food Science and Technological International*, 7, 501-510.
9. **Mangova, M.**, 2003. Technological Quality and Nutrient Value of Rye, Cultivar *Hrana I ishrana*, 44 (1-2), 22-23.
10. **Mihalkova, N.**, 2008. Study of Soluble and Insoluble Fiber in Wheat, Corn, Barley, Oats and Rye,Scientific conference with international participation "Food Science, Engineering and Technology", Plovdiv, LV (1), 117-121.
11. **Mihalkova, N.**, 2009. Another Scientific Proof of the Positive Effect of Rye Bread on Human Health.
12. **Renzetti, S., J. Behr, R.F. Vogel and E.K. Arendt**, 2008. Transglutaminase Polymerisation of Buckwheat (Fagopyrum esculentum Moench) Proteins. *Journal of Cereal Science*, 48: 747-754.