Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2018, 21 (2), 130-140
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan
ISSN 1311-0489 (Print)
ISSN 2367-8364 (Online)

Въздействие на климатичните фактори върху химичните свойства на плодове от сортове касис (*Ribes nigrum* L.)

Светлана М. Паунович[1]*, Михаило Николич[2], Раде Милетич[1], Мира Милинкович[1], Жаклина Караклаич-Стаич[1], Йелена Томич[1], Марияна Пешакович[1]

[1]Изследователски институт по овощарство, Чачак, "Краля Петра I", 9, 3200, Чачак, Република Сърбия
[2]Аграрен факултет, Белградски университет, ул. „Неманина“ 6, 11081 Белград-Земун, Република Сърбия

Effect of climatic factors on chemical properties in berries of black currant (*Ribes nigrum* L.) cultivars

Svetlana M. Paunović[1]*, Mihailo Nikolić[2], Rade Miletić[1], Mira Milinković[1], Žaklina Karaklajić-Stajić[1], Jelena Tomić[1], Marijana Pešaković[1]

[1]Fruit Research Institute, Čačak, Kralja Petra I/9, 32000 Čačak, Republic of Serbia
[2]Faculty of Agriculture, University of Belgrade, Nemanjina 6, 11081 Belgrade-Zemun, Republic of Serbia
**E-mail: svetlana23869@gmail.com*

Received: 10.04.2018 *Accepted:* 05.09.2018 *Published:* 20.09.2018

РЕЗЮМЕ

Експериментът оценява въздействието на климатичните фактори (температура на въздуха и валежи) върху химичните свойства (инвертна захар, органични киселини, общи антоцианини, общи феноли и антиоксидантни свойства) в плодовете на седем сорта касис („Бен Ломонд“, „Бен Сарек“, „Цема“, „Титания", „Чачанска Църна", „Тисел" и „Тибен"). Сортовете показват значими различия по между си. В сорт „Бен Ломонд“ са установени високи нива на глюкоза (92.3 mg g^{-1}), фруктоза (133.7 mg g^{-1}) и захароза (19.9 mg g^{-1}). В сорт „Тисел" са установени органични киселини (лимонена киселина - 1.62 mg

SUMMARY

This experiment evaluated the effect of climatic factors (air temperature and precipitation) on the chemical properties (individual invert sugars, organic acids, total anthocyanins, total phenols, and antioxidant capacity) of the fruit of seven black currant cultivars (‘Ben Lomond’, ‘Ben Sarek’, ‘Tsema’, ‘Titania’, ‘Čačanska Crna’, ‘Tisel’ and ‘Tiben’).

The cultivars showed highly significant differences. High levels of glucose (92.3 mg g^{-1}), fructose (133.7 mg g^{-1}) and sucrose (19.9 mg g^{-1}) were found in ‘Ben Lomond’, and tested organic acids were recorded in ‘Tisel’ (citric acid - 1.62 mg g^{-1} and malic acid -

g^{-1} и ябълчена киселина - 0.40 mg g^{-1}). От друга страна, „Чачанска Църна" и „Титания" съдържат най-високото количество на вторични метаболити. Климатичните фактори оказват значително въздействие върху химичните свойства на плодовете. Високите температури на въздуха и ниските количества валежи по време на образуването на плода и узряването благоприятстват за натрупване на инвертна захар, докато ниските температури на въздуха и високите количества валежи имат положително въздействие върху синтеза на органични киселини и вторични метаболити на плода.

Ключови думи: касис, климатични фактори, химически свойства

0.40 mg g^{-1}). On the other hand, 'Čačanska Crna' and 'Titania' contained on average the highest contents of secondary metabolites.Climatic factors had a significant effect on the chemical properties of the fruit. High air temperatures and low precipitation amounts during berry formation and ripening promoted the accumulation of individual invert sugars, while low air temperatures and high precipitation amounts had a positive effect on the synthesis of organic acids and secondary metabolites in the fruit.

Key words: black currant, climatic factors, chemical properties

УВОД

Черният касис (*Ribes nigrum* L.) е богат източник на захари и органични киселини, важни първични метаболити, които играят ключова роля в клетъчния метаболизъм и репродукция (Hartmann, 2007; WCRF/AICR, 2008). Черният касис се откроява сред меките плодове по отношение на високото съдържание на биологично активни съединения. Той е богат източник на витамин С, който заедно с биоактивните фенолни съединения допринася за високата антиоксидантна активност на плода (Karjalainen et al., 2008; Hummer and Dale, 2010). Черният касис вирее във влажни планински райони, характеризиращи се с хладни лета, високи количества валежи и високи нива на влажност. Климатичните условия в дадено месторастене влияят върху продължителността на живот на растенията, производителността, качеството на плодовете и общата рентабилност на производството на касис (Nikolić and Milivojević, 2010). Химическият състав на плода се определя от генетичните признаци на сорта (Bordonaba and Tery, 2008) и етапа на зрялост, но и до голяма степен от климатичните фактори (Walker et al., 2010; Vagiri et al., 2013). Zheng et al. (2009) и Kruger et al. (2011) посочват, че съдържанието на фенолни съединения, захари, органични киселини и аскорбинова киселина е повлияно от генотипа, околната

INTRODUCTION

Black currant (*Ribes nigrum* L.) is a rich source of sugars and organic acids, important primary metabolites which play a key role in cell metabolism and reproduction (Hartmann, 2007; WCRF/AICR, 2008). Black currants stand out among soft fruit crops in terms of high contents of biologically active compounds. Also, they are a rich source of vitamin C, which contributes, along with bioactive phenolic compounds, to the high antioxidant activity of the fruit (Karjalainen et al., 2008; Hummer and Dale, 2010). Black currants thrive in humid mountainous areas characterised by cool summers, high rainfall amounts and high humidity levels. Climatic conditions in a particular environment affect plant longevity, productivity, fruit quality and overall profitability of black currant production (Nikolić and Milivojević, 2010).

The chemical composition of the fruit is governed by the genetic predisposition of the cultivar (Bordonaba and Tery, 2008) and maturity stage, but also to a large extent by climatic factors (Walker et al., 2010; Vagiri et al., 2013). Zheng et al. (2009) and Kruger et al. (2011) determined that the contents of phenolic compounds, sugars, organic acids and ascorbic acid are affected by genotype, environment and agronomic practices. Also, среда и агротехниката. Също така, Scalzo et al. (2008) и Veberič et al. (2012) установяват, че биохимичният състав зависи от различни фактори, като генотип, условия на растеж, включително фактори на околната среда и техники на култивиране.

Целта на настоящето изследване е да се оцени влиянието на климатичните фактори върху насаждение с черен касис върху химичните свойства и качеството на плодовете на изследваните сортове

Scalzo et al. (2008) and Veberič et al. (2012) found that biochemical composition is influenced by various factors, such as genotype, growth conditions, including environmental factors, and cultivation techniques.

The objective of this study was to evaluate the effects of climatic factors in a black currant planting on the chemical properties and fruit quality of the tested cultivars.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Проучването е извършено в Изследователски институт по овощарство, Чачак, Западна Сърбия, през периода 2012-2014 г. Включени са седем сорта: „Бен Ломонд“, „Бен Сарек“, „Титания", „Чачанска Църна", „Тисел", „Тибен" и „Цема“. Експериментът е заложен в рандомизиран блок със седем сорта, три репликации и три системи за поддържане на почват и общо на 315 храста с черен касис.

Средните месечни и годишни температури на въздуха за експерименталния период 2012-2014 г. са посочени в Таблица 1, а средната месечна и годишна сума на валежите в Таблица 2.

MATERIAL AND METHODS

The research was conducted at the Fruit Research Institute, Čačak, Western Serbia, during 2012-2014. Seven cultivars were included: ‘Ben Lomond’, ‘Ben Sarek’, ‘Titania’, ‘Čačanska Crna’, ‘Tisel’, ‘Tiben’ and ‘Tsema’. The experiment was laid out in a randomised block design with seven cultivars, three replications and three soil management systems, giving a total of 315 black currant bushes.

The mean monthly and annual air temperatures for the experimental period 2012-2014 are given in Table 1, and the average monthly and annual precipitation totals are presented in Table 2.

Таблица 1. Средни месечни въздушни температури (°C), средни годишни температури на въздуха (В/А) и средни температури на въздуха през вегетационния период (ВП/GS)

Table 1. Mean monthly air temperatures (^{o}C), mean annual air temperatures (A) and mean air temperatures during the growing season (GS)

Година/месец Year/ month	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	A	GS
2012	1.8	2.5	6.8	12.2	17.3	24.1	26.6	25.4	20.9	13.8	9.5	1.4	13.1	20.0
2013	3.5	3.8	6.6	13.2	18.2	20.6	23.3	24.1	17.2	14.5	8.9	2.0	13.0	18.7
2014	4.0	6.6	10.2	12.8	16.1	21.1	22.7	22.1	17.5	13.5	8.9	3.1	13.2	18.0

Таблица 2. Средни месечни стойности на валежите (mm m^{-2}), годишна сума на валежите (А) и сума на валежите по време на вегетативния период (ВП/GS)

Table 2. Average monthly precipitation totals (mm m^{-2}), annual precipitation totals (A) and precipitation totals during the growing season (GS)

Година/месец Year/month	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	A	GS
2012	60	70	10	47	68	38	22	0	7	30	24	88	464	212
2013	51	68	66	37	78	61	10	62	87	17	40	4	581	352
2014	21	6	52	104	125	103	163	56	101	50	19	90	890	702

Химическият анализ на плодовете включва: 1. индивидуални инвертни захари (глюкоза, фруктоза, захароза), определени чрез високоефективна течна хроматография (HPLC, Waters Breeze, Milford, USA), с абсорбция измерена в обхвата от 210 - 327 nm. 2. органични киселини (лимонена киселина, ябълчена киселина), анализирани със система Hewlett-Packard HP1100, оборудвана с детектор с фотодиодна матрица (Palo, Alto, CA, САЩ), с абсорбция, измерена в обхвата 490-600 nm. 3. общи феноли, оценени спектрофотометрично чрез метода Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1999), с абсорбция измерена при 765 nm. 4. общи антоцианини, определени чрез методите за отделно pH и диференциално pH, с абсорбция измерена при 515 nm и 700 nm. 5. антиоксидантен капацитет, оценен спектрофотометрично чрез фосфомолибденовия метод (Prieto et al., 1999), с абсорбция измерена при 695 nm.

Експерименталните данни, получени по време на тригодишния изследователски период, са подложени на статистически анализ, използван е двуфакторен дисперсионен анализ на Fisher - ANOVA. Значителни разлики между средните стойности на изследваните фактори и средствата за взаимодействие са определени чрез LSD тест, като нивата на значимост са определени при P <0,01 и P≤ 0,05.

The chemical analysis of the fruit included the following: 1. individual invert sugars (glucose, fructose, sucrose), as determined by high-performance liquid chromatography (HPLC; Waters Breeze, Milford, USA), with absorbance measured in the range of 210 - 327 nm. 2. organic acids (citric acid, malic acid), as analysed using a Hewlett-Packard HP1100 system equipped with a photo diode array detector (Palo, Alto, CA, USA), with absorbance measured in the range of 490-600 nm. 3. total phenols, as assessed spectrophotometrically by the Folin–Ciocalteu method (Singleton et al., 1999), with absorbance measured at 765 nm. 4. total anthocyanins, as determined by the single pH and pH differential methods, with absorbances measured at 515 nm and 700 nm. 5. antioxidant capacity, as evaluated spectrophotometrically by the phosphomolybdenum method (Prieto et al., 1999), with absorbance measured at 695 nm.

The experimental data obtained during the three-year research period were subjected to statistical analysis using Fisher's two-factor analysis of variance - ANOVA. Significant differences between the mean values of the tested factors and the interaction means were determined by LSD test, with the significance levels set at P≤0.01 and P≤0.05.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Инвертните захари играят ключова роля в структурата на растенията и метаболизма на клетъчно ниво и на целия организъм. Глюкозата, фруктозата и захарозата са главните захари в плодовете от черен касис (Perez et al., 1997; Rubinskiene et al., 2006). Сред органичните киселини преобладава лимонената киселина, докато ябълчната киселина присъства в малки концентрации в плодовете на черния касис (Hummer and Barney, 2002; Rubinskiene et al., 2006). Съдържанието на съединенията в екстрактите от плодовете са идентифицира чрез HPLC-DAD анализ, а съответните резултати за инвертни захари и органични киселини са посочени в Таблица 3.

RESULTS AND DISCUSSION

Individual invert sugars play a central role in plant structure and metabolism at the cellular and whole organism levels. Glucose, fructose and sucrose are the major sugars in black currant fruits (Perez et al., 1997; Rubinskiene et al., 2006). Among organic acids, citric acid is dominant, and malic acid is present in minor concentrations in black currant berries (Hummer and Barney, 2002; Rubinskiene et al., 2006). The contents of compounds in berry extracts were identified by the HPLC-DAD analysis, and the corresponding results on individual invert sugars and organic acids are shown in Table 3.

Таблица 3. Съдържание на инвертни захари и органични киселини в плодовете

Table 3. Contents of individual invert sugars and organic acids in the fruit

Сорт/Година Cultivar/Year		Глюкоза Glucose (mg g^{-1})	Фруктоза Fructose (mg g^{-1})	Захароза Sucrose (mg g^{-1})	Лимонена киселина Citric acid (mg g^{-1})	Ябълчена киселина Malic acid (mg g^{-1})
Сорт (A) Cultivar (A)	'Ben Lomond'	92.3±4.76 a	133.7±3.74 a	19.9±2.79 a	1.04±0.14 c	0.35±0.09 ab
	'Ben Sarek'	75.2±5.26 e	126.9±2.65 b	9.73±1.64 d	1.00±0.11 c	0.35±0.09 ab
	'Tsema' 'Titania'	82.0±6.31 bc	120.6±3.40 c	13.8±3.48 bc	1.23±0.30bc	0.31±0.07 b
	'ČačanskaCrna'	80.9±5.39 cd	125.6±4.35 b	13.9±2.64 bc	1.40±0.25ab	0.32±0.06 b
	'Tisel'	79.9±2.69 cd	135.7±5.46 a	16.5±3.30 ab	1.45±0.21ab	0.38±0.06 a
	'Tiben'	78.2±6.07 d	119.5±3.50 c	12.5±3.32 cd	1.62±0.27 a	0.40±0.07 a
		84.6±3.49 b	128.6±2.90 b	15.2±3.51 bc	1.36±0.20 b	0.35±0.08 ab
Година (B) Year (B)	2012	95.2±1.88 a	140.3±2.08 a	6.24±0.49 a	0.59±0.02 c	0.13±0.01 c
	2013	65.5±2.42 b	117.9±1.99 b	13.6±1.38 b	1.44±0.10 b	0.33±0.03 b
	2014	86.1±1.63 c	125.6±1.59 c	25.3±1.17 c	1.94±0.08 a	0.63±0.02 a
ANOVA						
Cultivar (A)		**	**	**	**	*
Year (B)		**	**	**	**	**
A x B		**	**	ns	*	**

- Стойностите, последвани от различни букви в колоните за сортовете и обработките имат значителни разлики при P ≤ 0.01 и P ≤ 0.05 според LSD теста и резултатите от ANOVA (F-тест)
- Means followed by different letters within the cultivar and treatment columns are significantly different at P ≤ 0.01 and P ≤ 0.05 according to LSD test and ANOVA (F-test) results

Както се вижда от анализа на инвертните захари и органичните киселини в плодовете, фруктозата е преобладаваща захар, а лимонената киселина е основната органична киселина. Количеството фруктоза варира широко и значително сред сортовете на черния касис, което е най-високо в „Чачанска Църна" и „Бен Ломонд", а най-ниско в „Цема" и „Тисел". Също така има значителни разлики между сортовете в нивото на глюкоза и захароза. Най-високо съдържание на глюкоза и захароза са открити в "Бен Ломонд", а най-ниското в "Бен Сарек". Количеството захароза е много ниско във всички сортове. Настоящите резултати са сравними с тези, получени от Milivojević et al. (2009), които отчитат подобно съдържание на инвертна захар. Що се отнася до органичните киселини, „Тисел" има най-високо средно съдържание на лимонена и ябълчна киселина. Резултатите, представени от Mladin et al. (2009) също посочват, че сортовете от черен касис се характеризират с високи нива на органични киселини. Според посоченето от Bordonaba and Terry (2008), съдържанието на захар

As revealed by the analysis of individual invert sugars and organic acids in the fruit, fructose was the dominant sugar, and citric acid was the major organic acid. The amount of fructose varied widely and significantly among black currant cultivars, being highest in 'Čačanska Crna' and 'Ben Lomond', and lowest in 'Tsema' and 'Tisel'. There were also significant differences among cultivars in the levels of glucose and sucrose. The highest glucose and sucrose contents were found in 'Ben Lomond', and the lowest in 'Ben Sarek'. The amount of sucrose was very low in all cultivars. The present results are comparable to those obtained by Milivojević et al. (2009), who recorded similar invert sugar contents. As for organic acids, 'Tisel' had the highest average content of citric and malic acid.

The results presented by Mladin et al. (2009) also indicated that black currant cultivars were characterised by high levels of organic acids. As suggested by Bordonaba and Terry (2008), sugar and acid contents and sugar to acid ratio in и киселина и съотношението захар / киселина в черния касис са важни показатели за възприемания вкус, зрялост и общо качество, което може да служи като оценка от страна на потребителите.

В допълнение към основните метаболити, растенията произвеждат разнообразен набор от органични съединения, известни като вторични метаболити, за да се предпазват от тревопасни животни и микробна инфекция. Резултатите относно вторичните метаболити в сортовете черен касис са представени в Таблица 4.

black currants are important indicators of perceived taste, maturity/ripeness and general quality, which may serve as an index of consumer acceptance.

In addition to primary metabolites, plants produce a diverse array of organic compounds, known as secondary metabolites, to defend against herbivory and microbial infection. The results on secondary metabolites in black currant cultivars are presented in Table 4.

Таблица 4. Съдържание на вторични метаболити в сортовете на черен касис
Table 4. Contents of secondary metabolites in black currant cultivars

Сорт/Година Cultivar/Year		Общи антоцианини Total anthocyanins (mg C3G g^{-1})	Общи феноли Total phenols (mg GA g^{-1})	Обща антиоксид. сп. Total antioxidant capacity (mg AA/ g)
Сорт (A) Cultivar (A)	'Ben Lomond'	2.50±0.43 c	12.2±0.64 b	10.4±0.31 b
	'Ben Sarek'	1.70±0.08 d	12.5±0.75 b	10.6±0.41 b
	'Tsema'	2.42±0.12 c	11.9±0.61 b	10.5 ±0.53 b
	'Titania'	3.22±0.24 b	14.1±0.67 a	12.5±0.51 a
	'ČačanskaCrna'	3.60±0.12 a	14.6±0.92 a	12.4±0.13 a
	'Tisel'	3.26±0.23 b	12.0±0.59 b	10.7±0.16 b
	'Tiben'	3.25±0.26 b	11.9±0.61 b	10.5±0.25 b
Година (B) Year (B)	2012	2.15±0.15 c	8.88±0.47 c	8.55±0.26 c
	2013	3.01±0.16 b	12.7±0.47 b	11.5±0.27 b
	2014	3.46±0.19 a	17.3±0.48 a	13.6±0.28 a
ANOVA				
Cultivar (A)		**	**	**
Year (B)		**	**	**
A x B		**	**	**

- Стойностите, последвани от различни букви в колоните на сортовете и обработките имат значителни разлики при P ≤ 0.01 и P ≤ 0.05 според LSD теста и резултатите от ANOVA (F-тест)
- Means followed by different letters within the cultivar and treatment columns are significantly different at P ≤ 0.01 and P ≤ 0.05 according to LSD test and ANOVA (F-test) results

„Чачанска Църна" и „Титания" съдържат средно най-високо ниво на вторични метаболити (общо антоцианини, общи феноли и общ антиоксидантен капацитет), докато другите сортове показват променливост в изследваните параметри. Плодовете на черния касис имат високи нива на полифенолни съединения, особено антоцианини, производни на фенолната киселина, флавоноли и проантоцианидини, в сравнение с други плодове (например, ягоди и малини) (Karjalainen

'Čačanska Crna' and 'Titania' contained on average the highest contents of the secondary metabolites (total anthocyanins, total phenolics, and total antioxidant capacity), whereas the other cultivars exhibited variability in the studied parameters. Black currant berries had high levels of polyphenol compounds, especially anthocyanins, phenolic acid derivatives, flavonols, and proanthocyanidins, compared to other berries (e.g., strawberries and raspberries) (Karjalainen et al 2009; Mattila et al. 2011). Phenolic et al., 2009; Mattila et al., 2011.). Фенолните съединения са причина за много от положителните, здравословни въздействия на черния касис и допринасят за повечето сензорни свойства на плодовете от черния касис (Schwarz and Hofmann, 2007, Laaksonen et al., 2013).

Най-високи нива на инвертни захари са определени през 2012 г. и най-ниските през 2014 г. Стойностите за органичните киселини и вторичните метаболити са най-високи през 2014 г. и най-ниски през 2012 г. През експерименталните години, температурата на въздуха е била по-висока с 2.1°C и общото количество на валежите през 2012 г. е по-ниско с 122.5 mm m-2 в сравнение с 2014 г., което има стимулиращ ефект върху синтеза на инвертни захари. За разлика от синтезата на органичните киселини и вторичните метаболити, който е по-висок през 2014 г., когато въздушната температура е по-ниска на въздуха, а стойности на валежите са по-високи в сравнение с другите две експериментални години. В условията на Чачак, по-високи нива на захар, но по-ниски нива на киселини са определени в изследваните сортове в сравнение с резултатите от многобройните автори (Zurawicz et al., 2000; Kampuss and Strautina, 2004; Siksnianas et al., 2006; Mladin et al., 2009; Raudsepp et al., 2010), които провеждат изследванията си в северните и североизточните части на Европа на висока надморска височина. Тези разлики в съдържанието на инвертните захари, органичните киселини и вторичните метаболити се дължат на влиянието на климатичните фактори върху биохимичния състав на плодовете от изследваните сортове черен касис. Настоящите резултати са сравними с тези, получени от Rubinskiene et al. (2006), които наблюдават положителна зависимост между температурата на въздуха и съдържанието на захари и отрицателната зависимост между дъждовете и тези параметри. Подобни на нашите резултати са получили Kaldmae et al. (2013), които установяват, че съдържанието на захари се повлиява положително от температурата и отрицателно

compounds are responsible for many of the positive, health-supporting effects of black currants, and contribute to most sensory properties of black currant berries (Schwarz and Hofmann, 2007; Laaksonen et al., 2013).

The highest levels of invert sugars were determined in 2012, and the lowest in 2014. The values for organic acids and secondary metabolites were highest in 2014 and lowest in 2012. Over the experimental years, air temperature was higher by 2.1^{o}C and precipitation totals were lower by 122.5 mm m^{-2} in 2012 than in 2014, which had a stimulating effect on the synthesis of invert sugars. In contrast, the synthesis of organic acids and secondary metabolites was higher in 2014, which had lower air temperatures and higher precipitation amounts compared to the other two experimental years.

Under the environmental conditions of Čačak, higher levels of sugars, but lower levels of acids were determined in the tested cultivars compared to the findings of numerous authors (Zurawicz et al., 2000; Kampuss and Strautina, 2004; Siksnianas et al., 2006; Mladin et al., 2009; Raudsepp et al., 2010), who conducted their research in northern and northeastern parts of Europe at high altitudes.

These differences in the contents of invert sugars, organic acids and secondary metabolites are attributed to the effect of climatic factors on the biochemical composition of the fruit of the studied black currant cultivars. The present results are comparable to those obtained by Rubinskiene et al. (2006), who observed a positive correlation between air temperature and the content of sugars, and a negative correlation between rainfall and these parameters.

Similarly, as determined by Kaldmae et al. (2013), the content of sugars is positively correlated with temperature and negatively от валежите. Vagiri et al. (2013) отчитат по-ниски нива на киселини, но по-високо съдържание на всички антоцианини и феноли при касиса, отглеждан в южната част на Швеция, отколкото в тези, отглеждани в северната част на Швеция. Както е посочено от авторите, получените стойности са резултат от по-високите температури на въздуха по време на узряването което не беше потвърдено в настоящото изследване. Zheng et al. (2009) определят по-високи стойности на инвертните захари и лимонените киселини в черния касис, отглеждан в южната част на Финландия, отколкото в тези, отглеждани в северната част на Финландия. Авторите установяват, че съдържанието на захари и киселини е положително повлияно от температурата на въздуха, но отрицателно свързано с количеството на валежите. Oancea et al. (2011) констатират, че черния касис процъфтява във влажни зони с високи количества валежи и че тези условия на околната среда имат положително въздействие върху нивото на общия антоцианин. От друга страна, Kazimierczak et al. (2008) съобщават, че високите температури на въздуха и ниските количества валежи допринасят за повишеното съдържание на антоцианини. Изводите, направени от тези автори, потвърждават резултатите от настоящия експеримент. Разликата в измереното съдържание може да се обясни със силни вариации в синтеза и натрупването на химични съединения при различни климатични условия.

correlated with rainfall. Vagiri et al. (2013) reported lower levels of acids but higher contents of total anthocyanins and phenols in currants grown in the south of Sweden than in those grown in the north of Sweden. As explained by the authors, the values obtained were the result of higher air temperatures during harvest season, which was not confirmed in the present study. Zheng et al. (2009) determined higher values for invert sugars and citric acids in black currants grown in southern Finland than in those grown in the north of Finland.

The authors found that the contents of sugars and acids were positively correlated with air temperature, but negatively correlated with the amount of rainfall. Oancea et al. (2011) found that black currants thrive in humid areas with high rainfall amounts, and that these environmental conditions have a positive effect on the level of total anthocyanins. On the other hand, Kazimierczak et al. (2008) reported that high air temperatures and low rainfall amounts contributed to the increased content of total anthocyanins. The conclusions drawn by these authors provide a full explanation of the results of the present experiment. The difference in the measured contents can be explained by strong variations in the synthesis and accumulation of chemical compounds under different climates.

ИЗВОДИ

Плодовете на черния касис са изключително богат източник на захари, органични киселини и вторични метаболити; като такива, те са интересна хранителна възможност.

„Бен Ломонд", „Титания" и „Чачанска Църна" проявяват чудесни химични характеристики на плодовете, главно по отношение на тяхната висока антиоксидантна активност, като „Чачанска Църна" се отличава с най-високи стойности за повечето от изследваните параметри.

Климатичните фактори имат важно въздействие върху растителния метабо-

CONCLUSIONS

Black currant berries are an exceptionally rich source of sugars, organic acids and secondary metabolites; as such, they provide an interesting nutritional alternative.

'Ben Lomond', 'Titania' and 'Čačanska Crna' exhibited excellent chemical characteristics of the fruits, primarily in terms of their high antioxidant activity, but 'Čačanska Crna' stood out for its highest values for most of the tested parameters.

Climatic factors have an important effect on plant metabolism, and promote the лизъм и стимулират синтеза на различни химични съединения в плодовете, като по този начин влияят положително върху качеството и търговската стойност на плодовете.

Изследваните сортове са подходящи за агроекологичните условия на Чачак, имайки пред вид добрите им химични характеристики.

Трябва да се вземат предвид климатичните фактори при създаването на овощни градини с касис за търговски цели.

synthesis of different chemical compounds in the fruit, thus positively affecting the quality and commercial value of the fruit.

Given their good chemical characteristics, the tested cultivars are suitable for the agroenvironmental conditions of Čačak.

Climatic factors should be considered when establishing commercial black currant orchards.

БЛАГОДАРНОСТИ

Това проучване е част от проект Ref. № 3109, финансиран от Министерството на образованието, науката и технологичното развитие на Република Сърбия.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study is part of Project Ref. No.31093 financially supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Bordonaba, G.J. and A.L. Terry**, 2008. Biochemical profiling and chemometric analysis of seventeen UK-grown black currant cultivars (*Ribes nigrum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(16), 7422.7430.
2. **Hummer, E.K. and A. Dale**, 2010. Horticulture of *Ribes*. *Forest Pathology*, 40, 251-263.
3. **Hummer, E.K. and L.D. Barney**, 2002.Currants.Crop Reports. *HortTechnology*, 12, 377-387.
4. **Hartmann, T.**, 2007. From waste products to ecochemicals: Fifty years of research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68, 2831-2846.
5. **Kampuss, K. and S. Strautina**, 2004. Evaluation of blackcurrant genetic resources for sustainable production. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*,12, 147-158.
6. **Karjalainen, R., M. Anttonen, N. Saviranta, H. Hilz, D. Stewart, G. J. Mcdougall, P. Mattila and R. Torronen**, 2008. A review on bioactive compounds in black currants (*Ribes nigrum* L.) and their potential health-promoting properties. *Acta Horticulturae*, 839, 301-307.
7. **Karjalainen, K., K. Kemppainen and E. Van Raaij**, 2009. Non Compliant Work Behaviour in Purchasing: An Exploration of Reasons Behind Maverick Buying. *Journal of Business Ethics*, 84, 245-261.
8. **Kaldmae, H., A. Kikas, L. Arus and A. Libek**, 2013. Genotype and microclimate conditions influence ripening pattern and quality of blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) fruit. *Zemdirbyste-Agricuture*, 2(100), 164-174.
9. **Kazimierczak, R., E. Hallmann, A. Rusaczonek and E. Rembialkowska**, 2008. Antioxidant content in black currant from organic and conventional cultivation. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*
http://www.ejpau.media.pl//volume11/issue2/art-28.html
10. **Kruger, E., H. Dietrich, M. Hey and D. C. Patz**, 2011. Effects of cultivar, yield, berry weight, temperature and ripening stage on bioactive compounds of black currants. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 84, 40-46.

11. **Laaksonen, O., L. Mäkilä, R. Tahvonen, H. Kallio and B. Yang**, 2013. Sensory quality and compositional characteristics of blackcurrant juices produced by different processes. *Food Chemistry*, 138, 2421-2429.
12. **Mattila M. L., M. Kielinen, S. L. Linna, K. Jussila, H. Ebeling, R. Bloigu, R. M. Joseph and I. Moilanen**, 2011. Autism spectrum disorders according to DSM-IV-TR and comparison with DSM-5 draft criteria: an epidemiological study. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 50(6), 583-592.
13. **Mladin P., M. Coman, A. Sasnauskas, E. Chitu, G. Mladin, I. Ancu, C. Nicola and M. Sumedrea**, 2009. Contributions to the agro-biological study of the black currant and blueberry within the cultivar evaluation European network. Scientific papers of the R.I.F.G. Pitesti, 25, 15-20.
14. **Milivojević, J., V. Maksimović and M. Nikolić**, 2009. Sugar and organic acids profile in the fruits of black and red currant cultivars. *Journal of Agricultural Sciences*, 54(2), 105-117.
15. **Nikolić, M. and J. Milivojević**, 2010. Small fruit crops. Production technology. Scientific Pomological Society of Serbia, Belgrade.
16. Oancea, S., A. Cotinghiu and L. Oprean, 2011. Studies investigating the change in total anthocyanins in black currant with postharvest cold storage. *Annals of the Romanian Society for cell biology*, 16, 359-363.
17. **Perez, A. G., R. Olias, J. Espada, J. M. Olias and C. Sanz**, 1997. Rapid determination of sugars, nonvolatile acids, and ascorbic acid in strawberry and other fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 3545-3549.
18. **Prieto, P., M. Pineda and M. Aguilar**, 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269, 337-341.
19. **Raudsepp, P., H. Kaldmae, A. Kikas, A. V. Libek and T. Pussa**, 2010. Nutritional quality of berries and bioactive compounds in the leaves of black currants (*Ribes nigrum* L.) cultivars evaluated in Estonia. *Journal of Berry Research*, 1, 53-59.
20. **Rubinskiene, M., P. Viskelis, I Jasutiene, P. Duchovskis and C. Bobinas**, 2006. Changes in biologically active constituents during ripening in black currants. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 14, 237-246.
21. **Singleton, V. L., R. Orthofer and R. M. Lamuela-Raventos**, 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
22. **Schwarz, B. and T. Hofmann**, 2007. Sensory-guided decomposition of red currant juice (*Ribes rubrum*) and structure determination of key astringent compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 1394-1404.
23. **Siksnianas, T., V. Stanys, A. Sasnauskas, P. Viskelis and M. Rubinskiene**, 2006. Fruit quality and processing potential in five new blackcurrant cultivars. *Journal of Fruit Ornamental Plant Research*, 14(2), 265-271.
24. **Scalzoa, J., A. Currieb, J. Stephencs, T. McGhird and P. Alspachc**, 2008. The anthocyanin composition of different *Vaccinium*, *Ribes* and *Rubus* genotypes. *BioFactors*, 34, 13-21.
25. **Vagiri, M., A. Ekholm, E. Oberg, E. Johansson, C. S. Andersson and K. Rumpunen**, 2013. Phenols and ascorbic acid in black currants (*Ribes nigrum* L.): Variation due to genotype, location, and year. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 9298-9306.

26. **Veberič, R., A. Slatnar, J. Jakopič, F. Štampar and M. Mikulič Petkovšek**, 2012. Primary and secondary metabolites in fruits. In: Paper and abstract proceedings 14th Serbian congress of fruit and grapevine producerswith international, Vrnjačka Banja, Serbia, 9, pp. 55-62.
27. **Walker, P.G., R. Viola, M. Woodhead, L. Jorgensen, S. L. Gordon, R. M. Brennan and R. D. Hancock**, 2010. Ascorbic acid content of black currant fruit is influenced by both genetic and environmental factors. *Functional Plant Science and Biotechnology*, 4(1), 40-52.
28. WCRF/AICR (World Cancer Research Fund) 2008. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: A global perspective. American Institute for Cancer Research, Washington.
29. **Zheng, J., B. Yang, S. Tuomasjukka, S. Ou and H. Kallio**, 2009. Effects of latitude and weather conditions on contents of sugars, fruit acids and ascorbic acid in black currant (*Ribes nigrum* L.) juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 2977-2987.
30. **Zurawicz, E., S. Pluta and J. Danek**, 2000. Small fruit breeding at the Research Institute of Pomology and Floriculture in Skierniewice, Poland. *Acta Horticulturae*, 538, 457-461.

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2018, 21 (2), 141-151 ISSN 1311-0489 (Print)
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan ISSN 2367-8364 (Online)

Резултати от изпитване на резитбени операции при растенията на арония (*Aronia melanocarpa* L.)

Емилиян Попеску

Опитна станция по животновъдство и земеделие, ул. Невястата №35, 4700 Смолян, България

Results from testing of pruning operations in plants of chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.)

Emilian Popescu

Experimental Station of Livestock and Agriculture, 35 Nevyastata Str., 4700 Smolyan, Bulgaria

E-mail: popescu@abv.bg

Received: 05.05.2017 *Accepted:* 07.02.2018 *Published:* 20.09.08.2018

РЕЗЮМЕ

Настоящото изследване, проведено през периода 2013-2016 г. в опитното поле на Опитна станция по животновъдство и земеделие - Смолян, има за цел да се установят ефикасни резитбени операции и свързани с тях начини за направление растежа на растенията от арония.

В проучването са взети стари и млади плододаващи насаждения, създадени и отглеждани при почвено-климатичните условия на 1530 m надморска височина.

През вегетационния период са извършвани биометрични измервания и фенологични наблюдения относно височината на растенията и някои репродуктивни прояви – цъфтеж, плододаване.

Данните от изследването сочат, че отстраняването на счупените, заплитаните и клоните на възраст над 6 години, както и съкращаване на силно нарастващите във височина клони до 20-25 cm и респективно ограничаване растежа на страничните основни клони

SUMMARY

This study, conducted in the period 2013-2016 in the experimental field of Experimental Station Stockbreeding and Agriculture-Smolyan, aims to establish efficient pruning operations and related methods for plant growth direction of chokeberry.

In the investigation were taken old and young fruit-bearing plants, created and grown in soil and climatic conditions typical for 1530 m above sea level.

During the vegetation period there are carried out biometric measurements and phenological observations on plant height and some reproductive manifestations – flowering, fruiting.

The data from the study show that the removal of the broken, splicing and branches over the age of 6 years, and shortening the greatly increasing in height tends to 20-25 cm and respectively limit the growth of side main branches by removing 30 to 35 cm from them in old чрез премахване на 30-35 cm от тях в стари плододаващи насаждения от арония създават по-благоприятни условия за растеж и развитие на растенията. В резултат на това се образуват едри и повече цветове и плодове с ограничено периферно разположение.

Премахването на едногодишни издънки в оформени храсти с 4, 5 и 6 основни клони в млади плододаващи насаждения от арония предотвратява образуване на голям брой клони, сгъстяване на храста и спомага за по-добро просветляване на растенията и по-пълноценно използване на пространството около тях. Образуват се по-едри и качествени плодчета.

Ключови думи: арония, стари и млади насаждения, резитбени операции

fruit-bearing plants of chokeberry create more favorable conditions for the growth and development of plants. As a result are formed large and more flowers and fruits, with limited peripheral location.

Removal of annual shoots in the formed bushes with 4, 5 and 6 main branches in the young fruit-bearing plants of chokeberry prevents formation of a large number of branches, compression of the bush and helps for better clearance of the plants and making better use of the space around them. There are formed larger and good quality fruits.

Key words: chokeberry, old and young plantations, pruning operations

УВОД

Резитбата е важно агротехническо мероприятие, чрез което се регулира растежа и плододаването на овощните дървета. При арония към резитба се прибягва през 5-та - 6-та година на отглеждане след като е оформен храст с около 30-35 клони (Mondeshka, 2005; Mondeshka et al., 2008).

В стари плододаващи насаждения от арония, на възраст над 25 години, поддържането на този брой издънки, приет за добро плододаване, се оказва труден процес. Това на първо място се обяснява с развитие на обемисти храсти както в хоризонтално, така и във вертикално направление. Основните клони достигат до 3.0 m дължина, като се допират помежду си вътре в реда и между редовете, и става невъзможно преминаването между тях по време на извършване на агротехнически мероприятия. Клоните с периферно разположение под тежестта на цветовете, плодовете и снега, особено в годините с обилни снегове се навеждат до повърхността на земята и често се пречупват.

Някои от намиращите по-близо до средата на храста клони пък се

INTRODUCTION

Pruning is important agrotechnical measure, which regulates the growth and fruiting of fruit trees. In chokeberry, pruning is needed to be done during the 5^{th} - 6^{th} year of cultivation, after having been formed bush with about 30-35 branches (Mondeshka, 2005; Mondeshka et al., 2008).

In the old fruit-bearing plantations of chokeberry, over the age 25 of years, maintaining this number shoots adopted for good fruiting, appeared difficult process. Firstly, this is explained by the development of bulky shrubs in both horizontal and vertical directions.

The main branches reach up to 3.0 m length, while touching each other in the rows and between the rows, causes the movement between them during conducting of agrotechnical measures become impossible. Branches with peripherial position under the weight of flowers, fruits and snow especially in years with heavy snow bend to the ground and often break down.

Some branches located closer to the middle of the bush are even tangling заплитат и се ориентират неправилно в пространство. Премахването на всички тези клони е съпроводено от развитие на голям брой едногодишни издънки, характеризиращи се със силен растеж. Всичко това влошава условията на просветляване и аериране, което води до слабо плододаване и узряване на плодовете на различни дати. Явно е, че се налага извършване на подходящи резитби, които спомагат за добро развитие, плододаване и по-продължителен живот на растенията.

Целта на изследването е изпитване и установяване на ефикасни резитбени операции и свързани с тях начини на направление растежа на растенията, осигуряващи добро развитие и плододаване.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

В проучването са взети стари и млади плододаващи насаждения от арония, отглеждани при почвено-климатичните условия на опитното поле на станцията, находящо се при 1530 m надморска височина.

1. В стари плододаващи насаждения на възраст над 20 години е проучен ефекта от приложение на следните резитбени операции:

- Премахване на слаби, счупени, застарели и неправилно ориентирани в пространство клони;
- Премахване на гъсто и неравномерно разположени едногодишни издънки;
- Съкращаване на силно нарастващи във вертикално направление клони до 20-25 cm;
- Ограничаване растежа на страничните основни клони чрез съкращаване върха им до 30-35 cm;
- Резитба за подмладяване на растенията, състояща се в премахване на клони на възраст над 2 години.

2. В млади четиригодишни насаждения от арония за поддържане на оформени храсти с 2, 3, 4, 5 и 6 основни клони са проведени следните

and they orient themselves incorrectly in space. Cutting of all these branches is accompanied by development of a large number of annual shoots characterized by vigorous growth. All this worsens the conditions of lightening and aeration, which leads to poor fruiting and ripening of fruits on different dates. It is obvious, it is necessary to carry out suitable pruning that contribute to better development, fruit-bearing and longer life of plants.

The aim of the study is testing and establishment of efficient pruning operations and connected with them ways of direction the plant growing, providing better development and fruit-bearing.

MATERIAL AND METHODS

In the study have been taken young and old fruit-bearing plantations of chokeberry grown in the soil and climatic conditions of the experimental field, located at 1530 m above sea level.

1. In the old fruit-bearing plantations aged over 20 years it has been studied the effect of application of the following pruning operations:

- Removing weak, broken, outdated and incorrectly oriented in space branches;
- Removing densely and evenly spaced annual shoots;
- Shortening the vigorously increasing in a vertical direction branches to 20-25 cm;
- Limiting the growth of side main branches by cutting of their top to 30-35 cm;
- Rejuvenation pruning of plants, consisting of removing branches over the age of 2 years.

2. In young four fruit-bearing plantations of chokeberry for maintaining the formed bushes with 2, 3, 4, 5 and 6 main branches have been conducted the

видове резитба:

• Премахване на счупени и неправилно ориентирани в пространство издънки;

• Премахване на едногодишни издънки.

Растенията са отглеждани на фона на торене с органични торове (2-2.5 t/da оборски тор), приложени през три години и респективно с минерални торове (N – 5-6 kg/da, P_2O_5 – 6-8 kg/da) при ежегодно внасяне.

Резитбените операции са извършени в края на зимния период преди сокодвижение и разлистване на растенията.

Наблюденията и биометричните измервания се състоят в:

• Определяне степента на развитие на клоните и съответно на храстите чрез измерване височината на растенията;

• Проследяване на фазите цъфтеж и плододаване чрез извършване на периодични фенологични наблюдения и претегляне на получената продукцията.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

В *старите плододаващи насаждения от арония* съкращаване на силно нарастващите във височина клони до 20-25 cm и респективно на страничните основни клони до 30-35 cm обуславя развитие на по-ниски (2.55-2.75 m) и с по-ограничен диаметър (1.50-1.55 m) храсти (Таблица 1).Това улеснява преминаването през междуредия по време на извършване на различни агротехнически мероприятия, особено на беритбата. Освен това храстите придобиват известна здравина и стабилност към климатичните фактори както през вегетационния период, така и през зимата.

following pruning:

• Removing broken and incorrectly oriented in space shoots;

• Removing of annual shoots.

The plants are grown in a background of fertilization with organic fertilizers (2-2.5 t/da manure) applied every three years, and respectively with mineral fertilizers (N – 5-6 kg/da, P_{2O5} – 6-8 kg/da) annually introduced.

The pruning operations are performed at the end of the winter period before movement of nutrients and appearance of the leaves.

Observations and biometric measurements consist in:

• Determining the degree of development of the branches and respectively of bushes by measuring the plant height;

• Studying of flowering and fruiting by performing periodic phenological observation and weighing of the resulting production.

RESULTS AND DISCUSSION

In the *old fruit-bearing plantations of chokeberry* the cutting of vigorously increasing) in height branches up to 20-25 cm, and respectively of lateral main branches up to 30-35 cm determines the development of lower (2.55-2.75 m) and with a limited diameter (1.50-1.55 m) bushes (Table 1). This facilitates the passage between the rows while the are performing various agrotechnisal activities, especially harvesting. Moreover, bushes gain strength and stability to climatic factors as well as during the growing season and during the winter.

Таблица 1. Данни за растеж и развитие на растенията от арония, средно за опитния период

Table 1. Data on growth and development of chokeberry plants, average for the experimental period

Вариант Variant	Височина на растенията (храста) Height of the plants (bush) m	Диаметър на храста Diameter of bush m	Цъфтене Flowering		Плододаване Fruitfulness
			Начало на цъфтежа Beginning of flowering	Начин на разположение на цветовете по клони Available way of blossoms on branches	Дата на беритбена зрялост на плодовете Date of harvesting maturity of fruits
Старо насаждение Old plantation					
Контролни растения Control plants	2.80-3.00	2.65-2.70	27.05-3.06	Предимно периферно Mainly peripherial	27.08-3.09 4-7.09
Растения с резитба Plants with pruning	2.55-2.75	1.50-155	27.05-3.06	Тенденция към Равномерно Tendency toward evenly	25-30.08
Младо насаждение Young plantation					
Контролни растения Control plants	1.31	1.27	27.05-3.06	Тенденция към периферно Tendency toward peripherial	25-30.08
Растения с 2 основни клони Plants with 2 main branches	1.20	1.25	27.05-3.06	Равномерно Evenly	25-30.08
Растения с 3 основни клони Plants with 3 main branches	1.25	1.05	27.05-3.06	Равномерно Evenly	25-30.08
Растения с 4 основни клони Plants with 4 main branches	1.36	1.25	27.05-3.06	Равномерно Evenly	25-30.08
Растения с 5 основни клони Plants with 5 main branches	1.40	1.25	27.05-3.06	Равномерно Evenly	25-30.08
Растения с 6 основни клони Plants with 6 main branches	1.38	1.21	27.05-3.06	Равномерно Evenly	25-30.08

Премахване на слабите, счупените и неправилно ориентирани в пространство клони създават условия за добро просветляване и аериране на растенията. В резултат на това се образуват повече равномерно разположени върху клоните цветове. Плодовете стават по-едри и встъпват в беритбена зрялост едновременно (25-30.08).

The removing of weak, broken and incorrectly oriented in space branches create conditions for good lightening and aeration of plants. As a result of this, there are formed more blossoms evenly located on the branches. The fruits are larger, and they enter in harvesting maturity simultaneously (25-30.08).

Изрязването на излишните едногодишни издънки спомага за поддържане на оптимален брой клони в храста (30-32), необходим за добро плододаване. Резитбата за подмладяване довежда до развитие на жизнени растения, като през първите две години се наблюдава силно вегетативно развитие на издънки без образуване на репродуктивни органи.

При контролните растения – без резитба (Фотос 1) се забелязва силно вегетативно развитие, така че основните клони стигат средно до 2.80-3.00 m дължина, а храстите в диаметър са средно 2.65-2.70 m. В резултат на това много от клоните се навеждат до земята и се пречупват вследствие на което преминаването през междуредия е практически невъзможно. Пчелите при летежа си пък са възпрепятствани и повече от тях се ориентират към съцветията и цветовете, разположени в горната и периферната част на растенията.

The excising of annual shoots helps maintaining optimum number of branches in the bush (30-32) needed for good fruit-bearing. The pruning for rejuvenation leads to the development of vital plants as in the first two years it is observed vigorous vegetative growth of shoots without formation of reproductive organs.

In the control plants – no pruning (Photo 1) there is vigorous vegetative development, as the main branches reach average 2.80-3.00 m length, and the bushes in diameter are average 2.65-2.70 m. As a result of this, many of the branches bend to the ground and break in consequence of which the passage through rows is practically impossible. The bees in flight are prevented, as more of them are orientated to the inflorescenses and flowers located at the top and on the periphery of the plants.

Фотос 1. Контролни растения
Photo 1. Control plants

Относно момента на настъпване на цъфтежа не са забелязани различия спрямо растенията с резитба, но узряването на плодовете настъпва на различни дати (27.08-3.09 и 4-7.09).

В *младите четиригодишни плододаващи насаждения от арония* отстраняването на развили се едногодишни издънки е от значение за запазване на оформените през първите две години на развитие храсти с 2, 3, 4, 5 и 6 основни клони (Фотоси 2, 3, 4, 5 и 6).

Regarding the time of the flowering there are no differences compared with pruning plants, but the fruit ripening occurs on different dates (27.08-3.09 and 4-7.09).

In the *four young fruit-bearing plants of chokeberry* the removing of evolved annual shoots is important for maintaing the bushes formed during the first two years of development with 2, 3, 4, 5 and 6 main branches (Photos 2, 3, 4, 5 and 6).

Фотос 2. Растение с 2 основни клони
Photo 2. Plant with 2 main branches

Фотос 3. Растение с 3 основни клони
Photo 3. Plant with 3 main branches

Фотос 4. Растение с 4 основни клони
Photo 4. Plant with 4 main branches

Фотос 5. Растение с 5 основни клони
Photo 5. Plant with 5 main branches

Фотос 6. Растение със 6 основни клони
Photo 6. Plant with 6 main branches

Премахването на счупените разклонения и съкращаване дължината на силно нарастващите клони до 10-15 cm спомага за създаване и поддържане на добра форма на храстите. Характерно за всички тези растения е едновременно цъфтене (27.05-3.06) и узряване на плодовете (25-30.08), и равномерното им разположение по клоните (Таблица 1).

The removing of broken branches and shortening the length of the vigorously growing branches to 10-15 cm helps creation and maintaining good form of bushes. Characteristic for all these plants is simultaneously flowering (27.05-3.06) and ripening of fruit (25-30.08), and their uniform placement on the branches (Table 1).

При храстите с 3 основни клони съществува опасност от пречупване поради създалия се по-голям ъгъл между тях и слабото им спояване в долната част.

Храстите с 4, 5, и 6 основни клони се показват перспективни, като при тях условията за растеж и развитие значително са по-добри. Те се отличават с по-голяма здравина към климатичните фактори вятър, сняг и с това, че тежестта на плодовете и листата е разпределена по-равномерно върху клоните.

Получената продукцията през четвъртата година на отглеждане при храстите с 4 и 5 основни клони достига до 300 kg/da и респективно 350 kg/da, докато при тези с 6 основни клони е между 400-450 kg/da. При растенията с резитба в старо насаждение продукцията е между 350 и 400 kg/da.

In the bushes with 3 main branches there is a risk of breaking due to a greater angle between them and their poor soldering at the bottom.

The bushes with 4, 5, and 6 main branches show themselves as perspective, because for them the conditions for growth and development are considerably better. They are distinguished by higher strength to climatic factors wind, snow and that the weight of fruits and leaves is distributed on the branches more evenly.

The resulting production in the fourth year of cultivation in the bushes with 4 and 5 main branches reaches 300 kg/da respectively 350 kg/da, while in those with 6 main branches it is between 400-450 kg/da. In the plants with pruning in the old plantation the resulting production is between 350 and 400 kg/da.

ИЗВОДИ

- Отстраняване на счупените, заплетените, клоните на възраст над 6 години и излишните едногодишни издънки в стари плододаващи насаждения от арония създават по-благоприятни условия за растеж и развитие на основните клони. Образуват се повече цветове и плодове, разположени равномерно по клоните.
- Отстраняване на едногодишните издънки в храстите с 4, 5 и 6 основни клони в млади плододаващи насаждения от арония предотвратява образуване на голям брой клони и сгъстяване на храста, и спомага за по-добро просветляване на растенията и по-пълноценно използване на пространството около тях. Образуват се по-едри и качествени плодчета.

CONCLUSIONS

- Removing broken, tangling branches over the age of six years and extra annual shoots in old fruit-bearing plantations of chokeberry create more favourable conditions for the growth and development of the main branches. There are formed more flowers and fruits, evenly distributed on the branches;
- Removing of annul shoots in the bushes with 4, 5 and 6 main branches in the young fruit-bearing plants of chokeberry prevents the formation of large numbers of branches and compression of the bush, and helps for better clearance of the plants and making better use of the space around them. There are formed larger and good quality fruits.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Mondeshka, P.**, 2005. Medicinal plants. Zemizdat, Sofia (Bg).
2. **Mondeshka, P., E. Popescu, M. Mondeshka-Nedyalkova**, 2008. Results of a trial of black chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.) growing under the high-mountain soil and climatic conditions of the Smolyan region. *Journal of Mountain on the Balkans*, 11(7), 1546-1568.

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2018, 21 (2), 152-160 ISSN 1311-0489 (Print)
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan ISSN 2367-8364 (Online)

Мониторинг на фитоплазмени инфекции в овощните насаждения на България за периода 2012-2017г.

Дора Панайотова[1], Желю Аврамов[2]*, Марияна Лагинова[1]

[1]Централна лаборатория по карантина на растенията, БАБХ, бул. Н.Мушанов 120, София, България
[2]Лесотехнически университет, бул. „Климент Охридски“ №10, София, България

Monitoring of phytoplasma infections in the orchard plantations of Bulgaria in the period 2012-2017

Dora Panajotova[1], Zhelyu Avramov[2]*, Mariana Laginova[1]

[1]Central Laboratory for Plant Quarantine, BFSA, 120 N. Moushanov Blvd., Sofia, Bulgaria
[2] University of Forestry, 10 Kliment Ohridski Blvd., Sofia, Bulgaria

**E-mail: zhavramov@ltu.bg*

Received: 14.05.2018 *Accepted:* 12.09.2018 *Published:* 20.09.2018

РЕЗЮМЕ

През периода 2012-2017г. се създадоха 1470 ha нови овощни насаждения с европейски и традиционни български сортове. За предотвратяване евентуалното разпространение на карантинни и иконономически важни болести, БАБХ създаде мониторингова програма за карантинни вредители по овощните видове, включваща и фитоплазмените инфекции. Обследването през годините включи 330 овощни насаждения, които с костилкови видове – 235 на площ над 14000 da, семкови плододаващи градини – 84 с площ от около 3500 da, 5 орехови насаждения – 91,5 da, 4 смесени овощни градини – 65,2 da и 2 насаждения от шипка – 644 da. Осъществява се постоянен контрол при движение и внос на овощен посадъчен материал и обследване на всички разсадници в България. В ЦЛКР за фитоплазмен анализ са постъпили 2726 броя растителни проби от ГКПП и 20 ОДБХ и 54 броя насекоми, вектори

SUMMARY

In the period 2012-2017 new orchard plantations of European and traditional Bulgarian varieties were planted on an area of 1470 ha. To prevent a possible spread of quarantine and economically significant diseases, the Bulgarian Food Safety Agency launched a monitoring programme for quarantine pests on fruit trees, including phytoplasma infections. Throughout the years 330 orchard plantations, of which stone fruit varieties – 235 on an area of 1400 ha, pome orchards – 84 on an area of about 350 ha, 5 walnut plantations – 9.15 ha, 4 mixed orchards – 6.52 ha and 2 plantations of dog rose – 64.4 ha were controlled. The circulation and import of orchard planting material was constantly monitored and all nurseries in Bulgaria were controlled. 2726 plant samples (from Border Inspection Points and 20 Regional Directorates) and 54 numbers of insect vectors (*Cacopsylla pyri*, *Psylla pyri,* etc.) were performed in Central Laboratory of на фитоплазми (*Cacopsylla pyri*, *Psylla pyri* и др.). Тотална ДНК беше екстрахирана от растителна тъкан или предварително детерминиран индивид в СТАВ буфер. Лабораторният анализ беше извършван чрез Nested PCR с две двойки универсални праймери (P1P7/U3U5) и специфични такива (f01/r01) с последващ RFLP анализ за окончателна идентификация и видова принадлежност. Резултатите потвърждават разрастването на инфекцията от Apple Proliferation, Pear decline, European Stone Fruit Yellows phytoplasmas чрез откриването им в нови области, а също и разширяване ареала на разпространение на техните вектори в Северна България (Търговище, Видин, Шумен). Районите с установена инфекция и прилагани мерки за ограничаване и унищожаване на причинителите като Кюстендил, Пловдив, Сливен, Бургас, Русе остават с потенциална опасност от разпространение. Причините са последици от неизпълнение на предписанията на фитосанитарните инспектори за унищожаване на инфектираните дървета, забрана за добиване на калеми и липса на превантивни мерки като обеззаразяване на инвентара, контрол на векторите и други.

Ключови думи: фитоплазмени патогени, овощни, България

Plant Quarantine for phytoplasma analysis. Total DNA was extracted from plant tissue or a preliminarily determined specimen in CTAB buffer. The laboratory analysis was performed by Nested PCR with two universal primer pairs (P1P7/U3U5) and specific ones (f01/r01) with following RFLP analysis for final identification and species affiliation.

The results confirm the spread of the following infection: Apple Proliferation, Pear decline, European Stone Fruit Yellows phytoplasmas, which were found in new regions, as well as an extended range of spreading of their vectors in Northern Bulgaria (Targovishte, Vidin, Shumen). The regions where infections were found and measures taken to isolate and destroy the agents, such as Kyustendil, Plovdiv, Sliven, Burgas, Ruse, remain potentially dangerous in terms of disease spreading.

This is the result of the non-compliance with the instructions of the phytosanitary inspectors to destroy the infected trees and ban the collection of cuttings, as well as of the lack of preventive measures such as equipment disinfection, vector control, etc.

Key words: phytoplasma pathogens, fruit threes, Bulgaria

УВОД

В България за пръв път се съобщава за микоплазмени болести по растенията през 1970 г. (Kowachevski, 1971). Такива заболявания са съобщавани и за овощни култури (Trifonov, 1965; Hristova, 1973). С подобряването на методите за идентификация на фитоплазмите се установяват нови видове на територията на България, като например фитоплазмата на крушата (Topchiiska and Sakalieva, 2001), European stone fruit yellows phytoplasma (Topchiiska and Sakalieva, 2002), Stolbur по черешата (Avramov et al., 2011), Pear decline (Etropolska, 2011), Apple proliferation

INTRODUCTION

Mycoplasma diseases in plants in Bulgaria were first reported in 1970 (Kowachevski, 1971). Such diseases were reported in fruit plants as well (Trifonov, 1965; Hristova, 1973). With the improvement of the methods for identification of phytoplasmas, new species have been detected on the territory of Bulgaria such as phytoplasma in pears (Topchiiska and Sakalieva, 2001), European stone fruit yellows phytoplasma (Topchiiska and Sakalieva, 2002), Stolbur in cherries (Avramov et al., 2011), Pear decline (Etropolska, 2011), Apple proliferation (Borisova and

(Borisova and Kemenova, 2016).

През периода 2012-2017 г. се създадоха 14.7 хил. хектара нови овощни насаждения с европейски и традиционни български сортове. За предотвратяване евентуалното разпространение на карантинни и иконономически важни болести, Централна лаборатория по карантина на растенията (ЦЛКР) от Българската Агенция по Безопастност на Храните (БАБХ) създаде мониторингова програма за карантинни вредители по овощните видове, включваща и фитоплазмените инфекции (Etropolska et al., 2012; Avramov et al., 2013). Трите вида фитоплазми, обект на тази програма Apple Proliferation, Pear decline и European Stone Fruit Yellows phytoplasma са карантинни и са описани в Приложение №1 на Наредба № 8 за фитосанитарния контрол (2015). Те са едни от икономически най-важните болести, както за много овощарски райони на Европа, така също и за България.

Цел

Основна цел е да се извършат обследвания на територията на цялата страна за изясняване разпространението на фитоплазмите по овощните култури у нас. Това ще доведе до прогнозиране на фитоплазмена инфекция въз основа на получените резултати и ще подпомогне предприемане на адекватни мерки за контрол в овощните насаждения, създадени с вносен материал и в разсадници, произвеждащи овощен посадъчен материал.

Kemenova 2016).

In the period 2012 – 2017 there were planted 14700 ha of new fruit plants of European and traditional Bulgarian varieties. To prevent the potential spread of quarantine and economically significant diseases, the Central Laboratory of Plant Quarantine with the Bulgarian Food Safety Agency launched a monitoring programme for quarantine pests in fruit plants, including phytoplasma infections (Etropolska et al., 2012; Avramov et al., 2013). The three phytoplasma species included in this programme, namely Apple Proliferation, Pear decline and European Stone Fruit Yellows phytoplasma, are quarantine types and are described in Annex No 1 to Ordinance No 8 on Phytosanitary Control (2015). They are some of the most economically significant diseases both for many regions of Europe, and for Bulgaria itself.

Aim

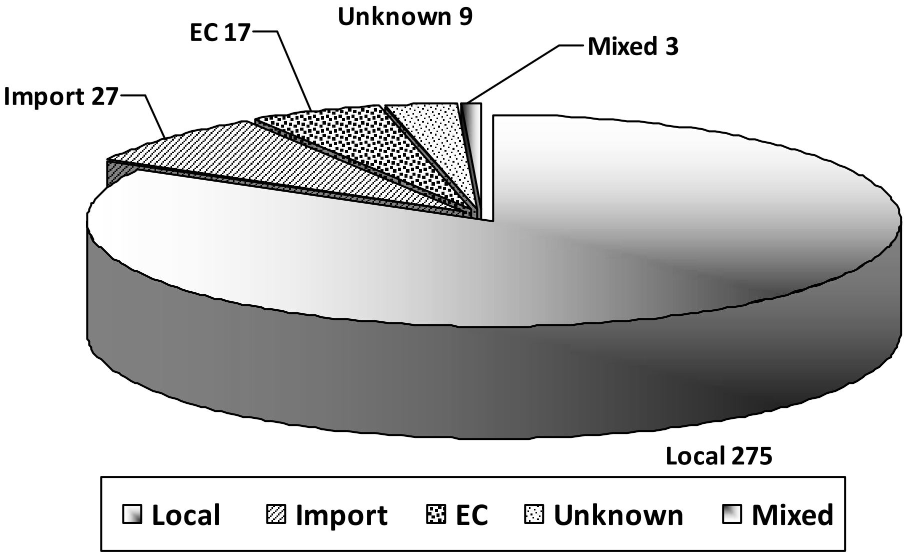
The main purpose is to carry out surveys throughout the country to clarify the distribution of phytoplasma on orchards in Bulgaria. This will lead to prognosis of phytoplasmic infection based on the results obtained and will help to undertake measures of control in orchards created with imported material and in nurseries producing fruit propagation material.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Ежегодно фитосанитарните инспектори от Областните дирекции по безопасност на храните (ОДБХ) извършват обследвания на територията на цялата страна. Обект на изследването са разсадници, произвеждащи овощен посадъчен материал и рискови овощните насаждения. Контрол се осъществява и при внос на посадъчен материал на ГКПП, който обхваща документална и идентификационна проверка, както и пробовземане.

MATERIAL AND METHODS

The phytosanitary inspectors of the Regional Food Safety Directorates (RFSD) perform annual monitoring in the whole country to identify the spread of phytoplasma in Bulgaria and take adequate control measures in the orchard plantations created with imported materials and mainly in nurseries producing fruit trees planting material. Control is exercised also over imports of planting material at border inspection points (BIP) and covers inspection of documents and identification, as well as sampling.



Фиг. 1. Обследвани овощни градини по произход на материала
Fig. 1. Observed orchards by origin of the planting material

Периоди и обекти на обследване

Обследванията са извършвани през есента, когато концентрацията на фитоплазмата в надземната част на растенията е най-висока. Обследването включи 330 овощни насаждения от които с костилкови видове – 235 на площ над 14000 da, семкови видове- 84 с площ от около 3500 da, 4 смесени овощни градини – 65,2 da. и 5 орехови насаждения – 91,5 da, В посочените насаждения през периода 2012-2017 г. са извършени 2044 инспекции и са взети 2726 броя растителни проби. При взимането на пробите вниманието е насочено към разсадници с маточни дървета и питомници 2 година и насаждения, създадени с вносен посадъчен материал, като пробонабирането се извършва от симптоматични и асимптоматични дървета.

Monitoring periods and objects

The monitorings were made in the autumn, when there is highest concentration of phytoplasma in the aerial parts of the plants. The monitoring covered 330 orchard plantations, out of which 235 with drupe varieties on over 1400 ha, 84 with pome varieties on around 350 ha, 4 mixed orchards on 6.52 ha and 5 walnut plantations covering 9.15 ha, In the period 2012-2017 there were 2,044 inspections in the mentioned plantations and 2,726 plant samples were taken. During the sampling the main focus was on nurseries with mother trees and 2nd year nursery plants and on orchards created with imported planting material, and the samples were taken from symptomatic and asymptomatic trees.

Таблица 1. Фитосанитарен контрол през периода 2012-2017 г.
Table 1. Phytosanitary control during the period 2012-2017

Year	Fruit nurseries/plots		Orchards/plots			
			Apple and Pear		Stone fruits	
	Units	da	Units	da	Units	da
2012	262	2526,4	88	3738,1	155	11781,2
2013	276	2207,4	114	4370,9	171	10948,2
2014	274	2168,3	90	4831,2	168	12503,5
2015	264	2328,2	82	3799,1	182	13221,9
2016	264	2210,4	84	3592,5	233	14353,9
2017	243	1988,6	84	3060,4	238	13928,5

Пробовземане

В ЦЛКР за фитоплазмен анализ са постъпили 2726 броя растителни проби от ГКПП (внос предимно от Сърбия и Турция) и ОДБХ и 54 броя насекоми, вектори на фитоплазми (*Cacopsylla pyri*, *Psylla pyri* (Carraro et al., 1998; White et al., 1998; Etropolska, 2011; Etropolska, 2015).

За анализ на растителния материал се взе проводяща тъкан или листни дръжки от 0,5 до 1 g, а от векторите – цели индивиди.

PCR метод

Тотална ДНК беше екстрахирана от растителна тъкан (Doyle and Doyle, 1990) или предварително детерминиран индивид в CTAB буфер следвайки протокол по Marzachi et al., (1998). Лабораторният анализ беше извършван чрез Nested PCR с две двойки универсални праймери P1/P7 (Deng and. Hiruki, 1991; Schneider et al., 1996), U3/U5 (Lorenz et al. 1995) и специфични такива f01/r01 (Lorenz et al., 1995) с последващ RFLP анализ с помоща на RsaI\AluI рестрикционни ензими за окончателна идентификация и видова принадлежност (Lee et al., 1998).

Sampling

For phytoplasma analysis in the Central Laboratory of Plant Quarantine there were submitted 2726 plant samples from border checkpoints (imported mainly from Serbia and Turkey) and from the Regional Food Safety Directorates and 54 insects, phytoplasma vectors (*Cacopsylla pyri*, *Psylla pyri* (Carraro et al., 1998; White et al., 1998; Etropolska, 2011; Etropolska, 2015).

For analysis of the plant material there was taken conductive tissue or stalks of 0.5 to 1 g, and from the vectors – entire insects.

PCR method

Total DNA was extracted from plant tissue (Doyle & Doyle, 1990) or preliminarily determined insect in a CTAB buffer following the protocol of Marzachi et al. (1998). The laboratory analysis was made through Nested PCR with two pairs of universal primers P1/P7 (Deng &. Hiruki, 1991; Smart et al., 1996; Schneider et al., 1996), U3/U5 (Lorenz et al. 1995) and specific primers f01/r01 (Lorenz et al., 1995) with a subsequent RFLP analysis with the help of RsaI\AluI restriction enzymes for conclusive identification and species identification (Lee et al., 1998).

РЕЗУЛТАТИ

На постъпилите за лабораторна експертиза общо 2780 броя проби в Централна лаборатория по карантина на растенията за наличие на фитоплазмена

RESULTS

A total of 2817 PCR analyses were made on the 2780 samples submitted to the Central Laboratory of Plant Quarantine for laboratory tests for инфекция са извършени общо 2817 анализа чрез PCR метод.

В проби, постъпили от ГКПП при внос на посадъчен материал бяха установени зарази от Pear Decline Phytoplasma MLO в круши, сорт Анкара, внесени от Турция и Apricot chlorotic Leaf Roll MLO /syn. ESFY/ във вишни, сорт Облачинска, внесени от Сърбия.

В страната бе през периода 2012-2017 беше установена следната инфекция:

- от Apple Proliferation в районите на Кюстендил, Пазарджик и Пловдив;
- от Pear Decline Phytoplasma в районите на Кюстендил, Пазарджик, Пловдив, Стара Загора, Хасково, Ямбол, Шумен, Силистра, Русе и Монтана;
- от Apricot chlorotic Leaf Roll phytoplasma /European Stone Fruit Yellows/ в районите на Благоевград, Пазарджик, Пловдив, Стара Загора, Сливен, Бургас, Силистра, Търговище, Ловеч, Велико Търново, Монтана и Видин.

phytoplasma infections.

In the samples taken at border checkpoints upon imports of planting material there were identified infections with Pear Decline Phytoplasma MLO in Ankara pears imported from Turkey and Apricot chlorotic Leaf Roll MLO /syn. ESFY/ in Oblacinska sour cherries imported from Serbia.

In the country the following infection was identified over the period 2012-017:

- with Apple Proliferation in the regions of Kyustendil, Pazardzhik and Plovdiv;
- with Pear Decline Phytoplasma in the regions of Kyustendil, Pazardzhik, Plovdiv, Stara Zagora, Haskovo, Yambol, Shumen, Silistra, Ruse and Montana;
- with Apricot chlorotic Leaf Roll phytoplasma /European Stone Fruit Yellows/ in the regions of Blagoevgrad, Pazardzhik, Plovdiv, Stara Zagora, Sliven, Burgas, Silistra, Targovishte, Lovech, Veliko Tarnovo, Montana and Vidin.

Таблица 2. Установени зарази по години в ОДБХ
Table 2. Confirmed phytoplasma infection each year in RFSD

ОДБХ/RFSD	2012			2013			2014			2015			2016			2017			Год
Pathogen	AP	Pd	Esfy	AP	Pd	Esfy	AP	Pd	Esfy	AP	Pd	Esfy	AP	Pd	Esfy	AP	Pd	Esfy	Year
Blagoevgrad																		2	2
Kjustendil		1			4			4		2									11
Pazardjik	2				1				3		1			1					8
Plovdiv	3				20										1				24
St. Zagora											1			1				1	3
Haskovo		2			2														4
Yambol		1																	1
Sliven			6		1													1	8
Bourgas			3			3									1				7
Silistra		2						2							1				5
Shumen											2						2		4
Russe		4			5														9
Targoviste																		2	2
Lovech																		1	1
V. Tarnovo												1							1
Montana								2				1					1		4
Vidin																		1	1
Total	5	10	9	0	33	3	0	8	3	2	4	2	0	2	3	0	3	8	95
	24			36			11			8			5			11			

ИЗВОДИ

През периода 2012-2017 година са унищожени общо над 10000 броя растения от маточни дървета, питомници I-ва и II-ра година – облагородени с калеми от инфектирани сортове маточни дървета, както и плододаващи овощни видове. На всички производители на ОПМ, при които е установена фитоплазмена инфекция, предварително е връчено предписание за унищожаване на заразените дървета и за предприемане на превантивни мерки (обеззаразяване на наличния инвентар, водене на борба с листните бълхи и забрана за засаждане на друго растение на мястото на унищоженото дърво). Заразените дървета бяха унищожени, чрез изгаряне. Взети са последващи допълнителни проби.

На база извършения анализ от разпространението на тези вредители, както и някои първи резултати от извършен мониторинг на векторите се наложи разработването на допълнителни мерки в Официалната Мониторингова програма. Цялостната стратегия включваща – повишаване броя на растителните проби и пробите от вектори в рискови райони; разработване на превантивни мерки и акцентиране в мониторинга на върху векторине в цялата страна, за да се получи цялостна картина на разпространението им по райони и за популационната им плътност. Необходимо е изготвянето на ефективна схема за борба, тъй като в момента проблем са малкото регистрирани продукти за растителна защита.

Постоянството, с което се проявяват тези вредители през годините, показва тенденция към трайното им настаняване в овощните насаждения на страната.

Основен проблем според нас в овощарството е липсата на специализирани маточни бази. Наложително е да се предприемат мерки за създаване на такива маточни бази – разположени на места с добра пространствена изолация, с вложен сертифициран изходен материал и прилагане на всички добри практики за опазване здравното състояние на

CONCLUSIONS

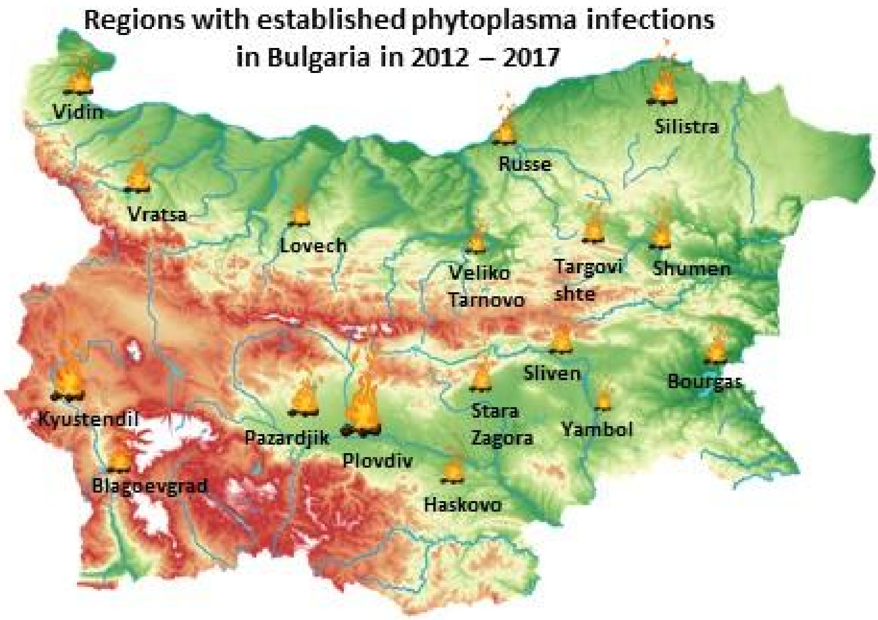
In the period 2012-2017 there were destroyed a total of over 10,000 mother trees and 1st and 2nd year nursery plants – improved with grafts from infected mother tree varieties, and fruit bearing varieties. All producers of orchard planting material where phytoplasma infection was identified were given instructions in advance to destroy the infected trees and to take preventive measures (disinfection of the existing tools, control for *Cacopsylla* vectors and prohibition on planting a new tree on the place where the destroyed tree was planted). The infected trees were destroyed with incineration. Subsequent additional samples were taken as well.

Based on the analysis of the spread of these pests, as well as on some first results of the monitoring of vectors it became necessary to develop additional measures in the Official Monitoring Programme. The overall strategy including – increase of the number of plant samples and vector samples in risk regions; development of preventive measures and focusing the monitoring on vectors in the whole country to obtain a complete picture of their spread by regions and of their population density. There has to be prepared an effective scheme for fighting them, because one of the problems currently is the few registered plant protection products.

The persistence demonstrated by these pests over the years shows a trend of their permanent establishment in the orchard plantations in the country.

A major problem in fruit production in our opinion is the lack of specialized bases for mother trees. There occurs need to be taken measures for the creation of such bases at well-isolated locations with certified base material and application of all the good practices for protection of the trees' health. Such a дърветата. Подобен проект ще се нуждае от законова и финансова подкрепа с участие на всички заинтересовани страни – производители, контролни институции и наука.

project will need a legislative and financial support with the involvement of all stakeholders – producers, control institutions and science.



Фиг. 2. Райони в България с установени фитоплазмени инфекции през 2012-2017 г.
Fig. 2. Regions with established phytoplasma infections in Bulgaria in 2012-2017

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Avramov, Zh., N. Contaldo, A. Bertaccini and·D. Sakalieva**, 2011. First report of stolbur phytoplasmas in Prunus avium in Bulgaria. *Bulletin of insectology*, 64, (Supplement): 71-72.
2. **Avramov, G., A. Etropolska and D. Chavdarova**, 2013. Results from official monitoring of the spread of phytoplasmas in fruit tree species in Bulgaria. *Plant Protection*, 7: 13-14 (Bg).
3. **Borisova, A. and I. Kamenova**, 2016. Occurrence of phytoplasmas of the apple proliferation group in fruit trees in Kyustendil region of Bulgaria. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 22: 465-469 (Bg).
4. **Carraro, L., R. Osler, N. Loi, P. Ermacora and E. Refatti**, 1998; Transmession of European Fruit Yellows Phytoplasma by Cacopsylla pruni. *Journal of Plant Pathology*, 80 (3), 233-239.
5. **Deng, S. and C. Hiruki**, 1991. Amplification of 16S rRNA genesfrom culturable and nonculturable Mollicutes. *Journal of Microbiological Methods*, 14, 53–61.
6. **Doyle, J. J., and, J. L. Doyle**, 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13-15.

7. **Etropolska, A., B. Jarausch, M. Herdemertens and W. Jarausch,** 2011. Development of specific detection primers for „Candidatus Phytoplasma pyri". *Bulletin of Insectology,* 64: 87-88. I
8. **Etropolska, A. and M. Laginova**, 2012. Monitoring distribution of fruit tree phytoplasmas in Bulgaria from 2007 until 2011. 22nd International Conference on Virus and Other Trandmissible Diseases of Fruit Crops, Rome, 03-08 June, pp. 108.
9. **Etropolska, A.**, 2015. Molecular characterization of fruit tree phytoplasmas and their vectors in Bulgaria. Summary of PhD thesis, UF, Sofia, Bulgaria (Bg).
10. **Hristova, D.**, 1973. Mycoplasmas, pests causing diseases on plants. *Ovostarstvo*, 52(10), 34-37 (Bg)
11. **Kowachevski, I.**, 1971. Mycoplasmas – a new group pests, causing diseases on plants. *Priroda*, 20, 2, 67-68. (Bg)
12. **Lee, I-M., D. E. Gundersen-Rindal, R. E. Davis and I. M. Bartoszyk**, 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48, 1153-1169.
13. **Lorenz, K-H., B. Schneider, U. Ahrens and E. Seemüller**, 1995. Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. *Phytopathology*, 85, 771-776.
14. **Marzachi, C., F. Veratti and D. Bosco**, 1998. Direct PCR detection of phytoplasmas in experimentally infected insects. *Annals of Applied Biology,* 133, 45-54.
15. Ordinance № 8 from 27.02.2015 for Phytosanitary Control / *State gazette*, № 10 from 27.I, № 19 from 13.03.2015, in act 13.03.2015, change SG No 31 from 10 April 2018/.
16. **Schneider, B., E. Seemüller, C. Smart and B. Kirkpatrick**, 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasmalike organisms or phytoplasmas. In: Razin, S. and Tully, J.G. Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmology. Academic Press, New York, USA, 369-380.
17. **Topchiiska, M. and D. Sakalieva**, 2001, Detection of Pear decline phytoplasma by Polyerase chain reaction in Bulgaria. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 7(1), 11-14.
18. **Topchiiska, M. and D. Sakalieva**, 2002, PCR procedure for detection and identification of European stone fruit yellows (ESFY) phytoplasma on tree of Prunus varieties, *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 8 (1), 19-22.
19. **Trifonov, D.**, 1965. Viruses on apple, apple proliferation, witches' broom. I. Spreading and damages. *Gradinarstvo i lozarsa nauka*, 2(4), 437-444 (Bg).
20. **White, D. T., L. L. Blackwall, P. T. Scott and K. B. Walsh**, 1998. Phylogenetic positions of phytoplasmas associated with dieback, yellow crinkle and mosaic diseases of papaya, and their proposed inclusion in 'Candidatus Phytoplasma australiense' and a new taxon, '*Candidatus* Phytoplasma australasia'. *International Journal of Systematic Bacteriology,* 48, 941-951.