

РЕЗЮМЕТА НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ

на гл. ас. д-р Величка Володиева Спасова-Апостолова

във връзка с участие в конкурс за заемане на академична длъжност

„доцент” по област на висше образование: 6. Аграрни науки и

ветеринарна медицина; професионално направление: 6.1

Растениевъдство;

научна специалност: "Селекция и семепроизводство на културните растения"

I Научни публикации включени в група от показатели В-4 (1-10)

B.4-1 Petkova, M., Spasova-Apostolova, V., Masheva, V. and Tahsin, N. (2020). Comparison of Endophytic Colonization of Bulgarian Variety of Tobacco by Entomopathogenic Fungi - *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. Ecologia Balkanica, 12 (1)., 31-40, Q4, http://web.uni-plovdiv.bg/mollov/EB/2020_vol12_iss1/031-040_eb.20115.pdf

Abstract: In the modern breeding programs, the application and utilization of endophytic potential of microorganism is an opportunity to reduce damage from different pests and viruses on tobacco plants. In the present study, 48 plants of 56 day seedlings of oriental tobacco (Krumovgrad 58) plants treated with 2 strains 538 and 730 of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and a strain 646 of *Beauveria brongniartii*. Two different inoculation techniques were applied by spraying the leaves and by directly placing the inoculant in the soil near the root of the plants. In order to compare the effectiveness of the colonization techniques of different tobacco tissues roots, stems and leaves, samples were taken for analysis on 7, 21 and 28 days after inoculation. Results have proven that all three strains of *Beauveria* endophytically colonize different tobacco tissues within 28 days after inoculation. The outcomes of the present study show the potential of *B. bassiana* and *B. brongniartii* to use for prevention and protection of tobacco plants.

Резюме: В съвременните селекционни програми прилагането и оползотворяването на ендофитния потенциал на микроорганизмите е възможност за намаляване на вредите от различни вредители и вируси върху тютюневите растения. В настоящото изследване са третирани 48 растения от 56-дневен разсад на ориенталски тютюн (Крумовград 58) с 2 щамове 538 и 730 на ентомопатогенните гъби *Beauveria bassiana* и щам 646 на *Beauveria brongniartii*. Бяха приложени две различни техники за инокулиране чрез пръскане на листата и чрез директно поставяне на инокуланта в почвата близо до корена на растенията. За да се сравни ефективността на техниките за колонизация на корени, стъбла и листа от различни тютюневи тъкани, бяха взети проби за анализ на 7, 21 и 28 дни след инокулацията. Резултатите са доказали, че и трите щамове на *Beauveria* ендофитично колонизират различни тъкани на тютюна в рамките на 28 дни след инокулацията. Резултатите от настоящото проучване показват потенциала на *B. bassiana* и *B. brongniartii* да се използват за профилактика и защита на тютюневите растения.

B.4-2 Spasova-Apostolova, V., Masheva, V., Petkova, M. and Tahsin N. (2021). Endophytic colonization of tobacco plants (*N. tabacum*, L., ssp. *orientalis*) by the strain 538 of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Comptes Rendus de l'Academie Bulgare des Sciences, 74(6), 928-936, Q3, https://www.proceedings.bas.bg/cgi-bin/mitko/0DOC_abs.pl?2021_6_16

Abstract: The fungus *Beauveria bassiana*; strain 538 was isolated from larvae of *Chrysomelidae* spp., family *Coleoptera*; and identified by the Biolog® FF plate™ system. Biolog profiles were used as a source of taxonomic characteristic by producing a specific pattern with a different carbon source. The potential endophytic colonization of tobacco plants variety Krumovgrad 58 from the fungus was tested in laboratory pots and field experiments. Two inoculation techniques were applied in the pot experiments - leaf spraying and soil drench near the roots. To establish the endophytic colonization of tobacco by *B. bassiana*; strain 538, plants were tested on the 7th, 21st, and 28th day after inoculation. For determination of the period for preservation of the fungus in plant tissues till the 105th day after planting, explants from leaves and capsules were inoculated on selective culture medium. The current experiment has proved that the tested strain endophytically colonized the tissues of tobacco up to the 28th day after treatment with both inoculation techniques. Isolate 538 has a higher percentage and a longer time of colonization when plants were treated by foliar spray. In the field experiment, *B. bassiana*; was not found in the middle, upper leaves and capsules.

Резюме: Гъбата *Beauveria bassiana*; щам 538 е изолиран от ларви на *Chrysomelidae*; spp., семейство *Coleoptera*; и идентифицирани от системата Biolog® FF plate™. Биологичните профили бяха използвани като източник на таксономична характеристика чрез създаване на специфичен модел с различен източник на въглерод. Потенциалната ендофитна колонизация на тютюневите растения сорт Крумовград 58 от гъбата е тествана в лабораторни саксии и полеви опити. При опитите в саксии бяха приложени две техники за инокулиране - пръскане на листата и напояване на почвата близо до корените. Да се установи ендофитната колонизация на тютюна от *B. bassiana* 538, растенията бяха тествани на 7-ия, 21-ия и 28-ия ден след инокулацията. За определяне на периода за запазване на гъбата в растителните тъкани до 105-ия ден след засаждането, експлантите от листата и капсулите се инокулират върху селективна хранителна среда. Настоящият експеримент доказва, че тестваният щам ендофитно колонизира тъканите на тютюна до 28-ия ден след третиране с двете техники на инокулация. Изолат 538 има по-висок процент и по-дълго време на колонизация, когато растенията са третирани чрез листно пръскане. В полеви експерименти *B. bassiana*; не е открит в средните, горните листа и капсулите.

B.4-3 Petkova, M., Spasova-Apostolova, V., Masheva, V., Atanasova, D. and Tahsin, N. (2021). Endophytic colonization of *Solanaceae* family plants by fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* strain 339 to control Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say). Bulg. J. Agric. Sci., 27 (Suppl. 1), 143-149, Q3. <https://www.agrojournal.org/27/01s-19.html>

Abstract: In the current study, molecular identification of *Beauveria bassiana* isolate 339 was done by partial sequence analysis of ITS1-5.8-ITS2 region of the nuclear ribosomal DNA with universal primers. Biochemical characterization was conducted by Biolog FF MicroPlate. The efficiency of the endophytic colonization of *B. bassiana* strain 339 was studied by two methods of inoculation – leaf spraying and soil drench in tobacco, tomatoes, eggplant and pepper. The distribution of the fungus within the plant parts was established by incubation of explants on a selective nutrient medium. Colonization of the stems, roots and leaves of the plants from *B. bassiana* strain 339 was

reported on the 7th, 14th and 28th day after inoculation. The results showed that *B. bassiana* strain 339 endophytically colonized various tissues in the studied plants of the *Solanaceae* family within 28 days after inoculation. The second objective of the study focused on the efficacy of *B. bassiana* strain 339 against adults and larvae of the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) in the laboratory experiment. There was a gradual increase in the entomopathogenic effect on the 7th day after treatment, when 90% mortality of larvae and 40% mortality of adult insects were reported. These studies show the possibility of expanding the use of the entomopathogenic fungus *B. bassiana* to control pests of plants of the family *Solanaceae*.

Резюме: В настоящото изследване молекулярната идентификация на изолат 339 на *Beauveria bassiana* е извършена чрез частичен анализ на последователността на ITS1-5.8-ITS2 региона на ядрената рибозомна ДНК с универсални праймери. Биохимичното характеризиране беше проведено от Biolog FF MicroPlate. Ефективността на ендофитната колонизация на *B. bassiana* щам 339 е изследвана чрез два метода на инокулация – листно пръскане и напояване на почвата при тютюн, домати, патладжан и пипер. Разпределението на гъбата в частите на растението се установява чрез инкубиране на експлантите върху селективна хранителна среда. Колонизация на стъблата, корените и листата на растенията от *B. bassiana* щам 339 се съобщава на 7-ия, 14-ия и 28-ия ден след инокулацията. Резултатите показват, че *B. bassiana* щам 339 ендофитно колонизира различни тъкани в изследваните растения от семейство *Solanaceae* в рамките на 28 дни след инокулацията. Втората цел на изследването се фокусира върху ефикасността на *B. bassiana* щам 339 срещу възрастни и ларви на колорадски бръмбар (*Leptinotarsa decemlineata* Say) в лабораторния експеримент. Наблюдава се постепенно засилване на ентомопатогенния ефект на 7-ия ден след третирането, когато се отчита 90% смъртност на ларвите и 40% смъртност на възрастните насекоми. Тези изследвания показват възможността за разширяване на употребата на ентомопатогенната гъба *B. bassiana* за контрол на вредителите по растенията от семейство *Solanaceae*.

B.4-4 Petkova, M., Petrova, S., Spasova-Apostolova, V. and Naydenov M. (2022). Tobacco Plant Growth-Promoting and Antifungal Activities of Three Endophytic Yeast Strains. *Plants*, 11(6), Q1, <https://www.mdpi.com/2223-7747/11/6/751>

Abstract: In this research, the biosynthetic and biocontrol potential of endophytic yeast to improve the growth and development of tobacco has been elucidated. Three yeast strains were enriched and isolated from different plant tissues. Partial sequence analysis of ITS5-5.8-ITS4 region of the nuclear ribosomal DNA with universal primers identified YD5, YE1, and YSW1 as *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), *Zygosaccharomyces bailii* (*Z. bailii*), and *Saccharomyces kudriavzevii* (*S. kudriavzevii*), respectively. When cultivated in a medium supplemented with 0.1% L-tryptophan, isolated yeast strains produced indole-3-acetic acid (IAA). The capacities of those strains to improve the mobility of phosphorus and synthesize siderophores has been proven. Their antimicrobial activities against several *Solanaceae* plant pathogenic fungi (*Alternaria solani* pathovar. *tobacco*, *Rhizoctonia solani*, and *Fusarium solani* pathovar. *phaseoli*) were determined. *S. Cerevisiae* YD5, *Z. Bailii* YE1, and *S. Kudriavzevii* YSW1 inhibited the growth of all tested pathogens. Yeast strains were tested for endophytic colonization of tobacco by two different inoculation methods: soil drench (SD) and leaf spraying (LS). To establish colonization in the various tissues of tested tobacco (*Nicotiana tabaccum* L.) plants, samples were taken on the seventh, fourteenth, and twenty-first days after treatment (DAT), and explants were inoculated on yeast malt agar (YMA). Both techniques of inoculation showed a high frequency of

colonization from 83.33% to 100%. To determine the effectiveness of the microbial endophytes, their effect on some physiological processes in the plant were analyzed, such as photosynthesis, stomatal conductivity, and transpiration intensity. The effect of single and double treatment with yeast inoculum on the development and biochemical parameters of tobacco was reported. Plants have the ability of structural and functional adaptation to stress effects of different natures. All treated plants had a higher content of photosynthetic pigments compared to the control. Photosynthesis is probably more intense, and growth stimulation has been observed. The chlorophyll a/b ratio remained similar, and the total chlorophyll/carotenoid ratio slightly increased as a result of elevated chlorophyll levels. The most significant stimulating effect was recorded in tobacco plants treated by foliar spraying with *Z. bailii* YE1 and *S. cerevisiae* YD5. In contrast, *S. kudriavzevii* YSW1 had a better effect when applied as a soil drench. Thus, *S. cerevisiae* YD5, *Z. bailii* YE1, and *S. kudriavzevii* YSW1 have a high potential to be used as biocontrol agents in organic agriculture.

Резюме: В това изследване е изяснен биосинтетичният и биоконтролен потенциал на ендофитните дрожди за подобряване на растежа и развитието на тютюна. Три щамове дрожди бяха обогатени и изолирани от различни растителни тъкани. Частичен последователен анализ на ITS5-5.8-ITS4 регион на ядрената рибозомна ДНК с универсални праймери идентифицира YD5, YE1 и YSW1 като *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), *Zygosaccharomyces bailii* (*Z. bailii*) и *Saccharomyces kudriavzevii* (*S. kudriavzevii*), съответно. Когато се култивират в среда, допълнена с 0,1% L-триптофан, изолирани щамове дрожди произвеждат индол-3-оцетна киселина (IAA). Доказан е капацитетът на тези щамове да подобряват мобилността на фосфора и да синтезират сидерофори. Определена е тяхната антимикробна активност срещу няколко растителнопатогенни гъби по сем. *Solanaceae* (*Alternaria solani* patovar. *tobacco*, *Rhizoctonia solani* и *Fusarium solani* patovar. *phaseoli*). *S. cerevisiae* YD5, *Z. bailii* YE1 и *S. kudriavzevii* YSW1 инхибират растежа на всички тествани патогени. Щамовете дрожди бяха тествани за ендофитна колонизация на тютюн чрез два различни метода на инокулация: напояване на почвата (SD) и пръскане на листа (LS). За да се установи колонизация в различните тъкани на тествани растения тютюн (*Nicotiana tabacum* L.), бяха взети проби на седмия, четиринадесетия и двадесет и първия ден след третирането (DAT) и експлантите бяха инокулирани върху дрождев малцов агар (YMA). И двете техники на инокулация показват висока честота на колонизация от 83,33% до 100%. За да се определи ефективността на микробните ендофити, беше анализиран ефектът им върху някои физиологични процеси в растението, като фотосинтеза, устична проводимост и интензивност на транспирация. Докладва се ефектът от еднократно и двукратно третиране с дрождев инокулум върху развитието и биохимичните показатели на тютюна. Растенията имат способността за структурна и функционална адаптация към стресови въздействия от различно естество. Всички третирани растения имат по-високо съдържание на фотосинтетични пигменти в сравнение с контролата. Фотосинтезата вероятно е по-интензивна и се наблюдава стимулиране на растежа. Съотношението хлорофил a/b остава подобно, а общото съотношение хлорофил/каротеноид леко се повишава в резултат на повишените нива на хлорофил. Най-значимият стимулиращ ефект е отчетен при тютюневи растения, третирани чрез листно пръскане със *Z. bailii* YE1 и *S. cerevisiae* YD5. За разлика от това, *S. kudriavzevii* YSW1 има по-добър ефект, когато се прилага като напояване на почвата. По този начин *S. cerevisiae* YD5, *Z. bailii* YE1 и *S. kudriavzevii* YSW1 имат висок потенциал да бъдат използвани като агенти за биоконтрол в органичното земеделие.

B.4-5 Aziz, S., Spasova-Apostolova, V., Masheva, V. and Tomlekova N. (2022). Assessing polymorphism within common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) mutant lines originated from variety “Mastilen 11b” using Inter Simple Sequence Repeats markers”, Bulgarian Journal of Agricultural, 28 (4)., 709- 716, Q3, <https://www.agrojournal.org/28/04-17.html>

Abstract: The common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is an economically important crop on a global scale, including in Bulgaria as well. It is an excellent source of vegetable protein and other nutrients. One of the methods of modern plant breeding aimed at creating genetic diversity in beans is induced mutagenesis. Molecular techniques are a suitable tool for characterizing induced mutations. The objective of this work is to evaluate the genetic diversity of a collection of EMS-induced mutant bean lines and to identify specific profiles, using ISSR molecular markers. The initial variety “Mastilen 11b” and 15 mutant lines from the collection of the Maritsa Vegetable Crops Research Institute are analyzed with 14 ISSR reactions. A total of 187 fragments with lengths from 190 bp to 3100 bp are generated. Three of the reactions (ISSR 6, ISSR 8, ISSR 9) led to a generation of monomorphic profiles, and the remaining eleven reactions (ISSR 1, ISSR 2, ISSR 2T, ISSR 3, ISSR 4, ISSR 5, ISSR 7, ISSR 10, ISSR 12, UBC 807, UBC 809) amplified polymorphic profiles. The polymorphism ranged from 18.65 % to 87.50 % in the analyzed genotypes. The results showed that the applied ISSR markers are effective for assessing the existing genetic diversity of the studied bean mutant lines.

Резюме: Обикновеният фасул (*Phaseolus vulgaris* L.) е икономически важна култура в световен мащаб, включително и в България. Той е отличен източник на растителен протеин и други хранителни вещества. Един от методите на съвременното растениевъдство, насочен към създаването на генетично разнообразие при фасула, е индуцираната мутагенеза. Молекулярните техники са подходящ инструмент за характеризиране на индуцирани мутации. Целта на разработката е да се оцени генетичното разнообразие на колекция от EMS-индуцирани мутантни линии фасул и да се идентифицират специфични профили, използвайки ISSR молекулярни маркери. Анализирани са изходният сорт „Мастилен 11b“ и 15 мутантни линии от колекцията на Научноизследователския институт по зеленчукови култури „Марица“ с 14 ISSR реакции. Генерирани са общо 187 фрагмента с дължини от 190 bp до 3100 bp. Три от реакциите (ISSR 6, ISSR 8, ISSR 9) генерират мономорфни профили, а останалите единадесет реакции (ISSR 1, ISSR 2, ISSR 2T, ISSR 3, ISSR 4, ISSR 5, ISSR 7, ISSR 10, ISSR 12, UBC 807, UBC 809) амплифицираха полиморфни профили. Полиморфизмът варира от 18,65% до 87,50% в анализираните генотипове. Резултатите показват, че приложените ISSR маркери са ефективни за оценка на съществуващото генетично разнообразие на изследваните мутантни линии от фасул.

B.4-6 Masheva, V., Spasova-Apostolova, V., Aziz, S. and Tomlekova N. (2022). Variations in proline accumulation and relative water content under water stress characterize bean mutant lines (*P. vulgaris* L.). Bulgarian Journal of Agricultural, 28 (3)., 430-436, Q3, <https://www.agrojournal.org/28/03-10.html>

Abstract: Drought stress linked with climate change is one of the major reasons limiting the productivity of crop species. This investigation was intended to characterize 19 bean mutant (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes for water-deficit tolerance, by determining their relative water content and proline accumulation. The drought stress was simulated by Polyethylene Glycol (PEG₆₀₀₀). The response of the two populations with initial genotypes – variety Evros and variety

Mastilen 11b were evaluated in pots arranged in a three-plot design. The pots were placed in a greenhouse with full sunlight. The plants were watered using liquid $\frac{1}{2}$ Murashige and Skoog (MS) nutrient solution every 2 days (50 mL per pot). After the plants have three trifoliate leaves (± 14 days after planting) the solution was combined with PEG (20% PEG equivalent to $-1,2$ Mpa osmotic potential) solution treatment and the volumes were increased up to 100 mL. The control plants were watered with a $\frac{1}{2}$ MS nutrient solution without PEG. During the treatment with PEG changes of RWC % in leaves and roots were observed. Drought stress resulted in a significant reduction in fresh and dry leaf and root weights and relative water content (RWC %). Proline content of the studied mutant lines increased when plants were subjected to water deficit. The results indicated that M3 mutant lines (variant 9, variant 16, and variant 20) exhibited the best drought tolerance and are good candidates for further evaluation to release mutant varieties or to be used as donor parents in a bean crop improvement program towards drought tolerance.

Резюме: Стресът от суша свързан с изменението на климата е една от основните причини, ограничаващи продуктивността на земеделските култури. Изследването има за цел да характеризира 19 мутантни генотипа фасул (*Phaseolus vulgaris* L.) за толерантността им към воден дефицит, чрез определяне на тяхното относителното водно съдържание и натрупване на пролин. Стресът от суша беше симулиран чрез полиетилен гликол (PEG₆₀₀₀). Оценен е отговорът на двете популации с изходни генотипи – сорт Еврос и сорт Мастилен 11b. Изведен е съдов опит във вегетационна къща в три повторения. Растенията се поливат с течен хранителен разтвор $\frac{1}{2}$ Murashige and Skoog (MS) на всеки 2 дни (50 mL на съд). След развитие на три трилистни листа (± 14 дни след засаждането), разтворът се комбинира с PEG (20% PEG, еквивалентен на $-1,2$ Мпа осмотичен потенциал) и третирането с разтвор и обемите се увеличават до 100 mL. Контролните растения се поливат с $\frac{1}{2}$ MS хранителен разтвор без PEG. При третирането с PEG се наблюдават промени в RWC% в листата и корените. Стресът от засушаване доведе до значително намаляване на теглото на пресни и сухи листа и корени, както и на относителното водно съдържание (RWC %). Съдържанието на пролин в изследваните мутантни линии се увеличава при растенията подложени на воден дефицит. Резултатите показват, че M₃ мутантни линии (вариант 9, вариант 16 и вариант 20) показват най-добра толерантност на засушаване. Направения скрининг позволява образците да бъдат използвани за получаване на мутантни сортове фасул или като родителски донори в селекционните програми за устойчивост на суша.

B.4-7 Spasova-Apostolova, V., Masheva, V., Kasheva, M., and Velinov, I. (2023). Study of morphological and qualitative indicators of new oriental tobacco lines from ecotype Krumovgrad. Bulgarian Journal of Crop Science, 60(6), 19-26 (Bg), https://agriacad.eu/ojs/index.php/bjcs/article/view/1633?article_id=1129

Abstract: In recent years, oriental tobacco varieties from the Krumovgrad ecotype have been among the most preferred by commercial companies in Bulgaria. The creating and study of genetic material with their participation is important to meet the needs and requirements of the sector. During a three-year period in the conditions of experimental field (EF) - Markovo were studied biometric (number of leaves, plant height, length and width of 14 and 21 leaves) and quality (yield and distribution by classes) indicators of four lines of oriental tobacco, created with the Krumovgrad ecotype participation. As control was used variety Krumovgrad 90. As a result of the studied biometric and qualitative indicators, it was established, that according to the indicators plant height, the studied lines are in the oriental tobacco range, but form a greater number of leaves

from the control variety (the largest numbers of leaves and smaller by size in line 72). Line 71 has a statistically proven longest length on the 14th and 21st leaves. Lines 71 and 73 have the highest average yield (kg/da) for the three years and exceed the yield of the control variety by 10-15%. The class distribution results show, that lines 72 and 73 have the highest percentage of Ist class, and line 71 has the highest percentage of IInd class and the lowest percentage of IIIrd class. From the assessment made lines 71 and 73 have the best values of the biometric and quality indicators

Резюме: През последните години сортовете ориенталски тютюн от екотип Крумовград са сред най-предпочитаните от търговските фирми в България. Създаването и проучването на генетичен материал с тяхно участие е от значение за покриване нуждите и изискванията на сектора. През тригодишен период в условията на опитно поле (ОП) – с. Марково са изследвани биометрични (брой листа, височина на растението, дължина и ширина на 14 и 21 лист) и качествени (добив и разпределение по класи) показатели на четири линии ориенталски тютюн създадени с участието на екотип Крумовград. Като контрола е използван сорт Крумовград 90. В резултат от изследваните биометрични и качествени показатели е установено, че по признака височина на растението изследваните линии са в диапазона за ориенталски тютюн, но формират по-голям брой листа от контролния сорт (най-голям брой и по-малки по размер при линия 72). Линия 71 е със статистически доказана най-голяма дължина на 14-ти и на 21-ви лист. С най-висок среден добив (kg/da) за трите години са линии 71 и 73 и превишават добива на контролния сорт с 10-15%. Резултатите за разпределението по класи показват, че линии 72 и 73 са с най-висок процент I-ва класа, а линия 71 - с най-висок процент на II^{-pa} и най-нисък процент III^{-та} класа. От направената оценка линии 71 и 73 са с най-добри стойности на биометричните и качествени показатели.

B.4-8 Spasova-Apostolova, V., Kasheva, M., Masheva, V., and Radev, Zh. (2023). Study of main chemical indicators nicotine, total sugar and total nitrogen in tobacco lines of Krumovgrad ecotype. Bulgarian Journal of Crop Science, 60(6), 27-36 (Bg), <https://agriacad.eu/ojs/index.php/bjcs/article/view/1634>

Abstract: Dry tobacco quality determined by the content of the main chemical indicators nicotine, total sugars, total nitrogen and the ratio between them. Strengthening regulations by the World Health Organization (WHO) to the chemical composition of tobacco, define the need to create a suitable breeding material. During the period 2020-2022 in the Accredited Testing Laboratory Complex at TTPI were determined the values of the main chemical indicators - nicotine, total sugars and total nitrogen in the first and second class dry tobacco from four oriental tobacco lines of the Krumovgrad ecotype, studied in the conditions on an experimental field (EF) - in Markovo village. Two controls from the Krumovgrad ecotype - variety Krumovgrad 90 and from the Eastern Balkan ecotype - variety Elenski 817 were used. The results show, the highest percentage of total nitrogen and nicotine, and respectively the lowest of total sugars, were reported in harvest for the 2021, characterized by higher average monthly temperatures and less rainfall during the plants vegetation period. According to the nicotine indicator, the studied lines (except for line 73) have average values between the two controls for harvests in the 2021 and 2022. The highest percentage of nicotine in 2020 and 2021, and an average of the three experimental years was reported in line 71, and the lowest in line 70. The lowest variation of the studied chemical indicators was established in line 71. The studied lines are valuable breeding material corresponding to the diverse needs of the tobacco industry.

Резюме: Качеството на сухия тютюн се определя от съдържанието на основните химични показатели никотин, общи захари, общ азот и съотношението между тях. Засилване на регулациите от Световната Здравна Организация (СЗО) към химичния състав на тютюна, определят необходимостта от създаване на подходящ селекционен материал. През периода 2020-2022 г. в Акредитиран Лабораторен Комплекс (ЛКИ) към ИТТИ са определени стойностите на основните химични показатели - никотин, общи захари и общ азот при първа и втора класа сух тютюн на четири линии ориенталски тютюн от екотип Крумовград, изследвани в условията на опитно поле (ОП) – с. Марково. Използвани са две контроли от екотип Крумовград – сорт Крумовград 90 и от екотип Източен Балкан - сорт Еленски 817. Резултатите показват, че най-висок процент на общ азот и никотин, и съответно най-нисък на общи захари са отчетени за реколтата 2021 г., характеризираща се с малко по-високи средномесечни температури и по-малко количество валежи в периода на вегетация на растенията. По показателя никотин, изследваните линии (с изключение на линия 73) са със средни стойности между двете контроли за реколта 2021 и 2022 г. Най-висок процент на никотин за 2020 и 2021, и средно от трите експериментални години е отчетен при линия 71, а най-нисък при линия 70. Най-слабо вариране на всички изследвани химични показатели е установено при линия 71. Изследваните линии са ценен селекционен материал, отговарящ на разнообразните нужди на тютюневата индустрия.

B.4-9 Petkova, M., Petrova, S., Spasova-Apostolova, V., Naydenov, M. and Masheva, V. (2023). Biosynthetic and biocontrol potential of endophytic yeast strains YP6 and YBS14 for improvement the growth and development of Solanaceae plants. Scientific Papers. Series A. Agronomy, Vol. LXVI, No. 1: 508-518, Q4, <https://agronomyjournal.usamv.ro/index.php/scientific-papers/current?id=1596>

Abstract: YP6 was isolated from *Triticum aestivum* L. seeds and YBS14 was isolated from the roots of *Helichrysum italicum* L. Partial sequence analysis of ITS5-5.8-ITS4 region of the nuclear ribosomal DNA with universal primers identified YP6 as *Pichia fermentans* and YBS14 as *Saccharomyces cerevisiae*. Both yeast strains produced indole-3-acetic acid when cultivated in a medium supplemented with 0.2 % L-tryptophan. The antimicrobial activity of yeast strains against plant pathogenic fungi was determined. YP6 and YBS14 were tested for endophytic colonization of *Solanaceae* plants by soil drenching and leaf spraying. To establish colonization in the various tissues of tested plants, samples were taken and explants were inoculated on yeast malts agar. The effect of the microbial endophytes on photosynthesis, stomatal conductivity, and transpiration intensity was analyzed by using the portable photosynthetic system for CO₂ analysis in plants. In all treated plants photosynthesis was intense and growth stimulation was observed. The final aim of the present study is to evaluate endophytic yeast and demonstrate their PGP activity.

Резюме: YP6 беше изолиран от семена на *Triticum aestivum* L. и YBS14 беше изолиран от корените на *Helichrysum italicum* L. Частичен анализ на последователността на ITS5-5.8-ITS4 региона на ядрената рибозомна ДНК с универсални праймери идентифицира YP6 като *Pichia fermentans* и YBS14 като *Saccharomyces cerevisiae*. И двата щама дрожди произвеждат индол-3-оцетна киселина, когато се култивират в среда, допълнена с 0,2 % L-триптофан. Установена е антимикробната активност на щамове дрожди срещу растително-патогенни гъби. YP6 и YBS14 бяха тествани за ендофитна колонизация на растения *Solanaceae* чрез напояване на почвата и пръскане на листата. За да се установи колонизация в различните тъкани на тестваните растения, бяха взети проби и експлантите бяха

инокулирани върху дрождев малцов агар. Ефектът на микробните ендوفити върху фотосинтезата, проводимостта на устицата и интензитета на транспирация беше анализиран с помощта на преносима фотосинтетична система за анализ на CO₂ в растенията. Във всички третирани растения фотосинтезата е интензивна и се наблюдава стимулиране на растежа. Крайната цел на настоящото изследване е да се оценят ендофитните дрожди и да се демонстрира тяхната PGP активност.

B.4-10 Spasova-Apostolova, V., Garapova, A., Docheva, M. and Kirkova, D., (2025). A comparative study of phenolic acids and flavonoids in Bulgarian oriental tobacco genotypes, *Bulgarian Journal of Crop Science.*, 62 (5) (Bg) (in print).

Absrtact: Phenolic acids and flavonoids are secondary metabolites that perform a number of functions, some of which are related to stress and plant adaptation to different environmental conditions. In this study, the content of phenolic acids and flavonoids in Bulgarian oriental tobacco was studied in two consecutive growing years - 2023 and 2024, characterized by different climatic conditions, determining the need for different numbers of irrigations. A total of 19 tobacco genotypes were studied. A change of the phenolic acids and flavonoids content was found during the two studied growing seasons. Slightly lower temperatures and precipitation in 2023, combined with fewer irrigations, resulted in a higher content of phenolic acids and flavonoids compared to the samples tested in 2024. The conditions in 2024 are compensated by more irrigation during the growing season. This is one of the probable causes leading to a decrease in the content of phenolic acids and flavonoids.

Резюме: Фенолните киселини и флавоноидите са вторични метаболити, които изпълняват редица функции, част от които свързани със стреса и адаптацията на растенията към различни условия на околната среда. В настоящото изследване е проучено съдържанието на фенолни киселини и флавоноиди в български ориенталски тютюн в две последователни вегетационни години – 2023 г. и 2024 г., характеризиращи се с различни климатични условия, обуславящи необходимостта от различен брой поливки. Изследвани са общо 19 генотипа тютюн. Установена е промяна в съдържанието на фенолни киселини и флавоноиди през двете изследвани вегетации. Малко по-ниските температури и количество валежи през 2023 г. съчетани с по-малко на брой поливки обуславя по-високо съдържание на фенолни киселини и флавоноиди, в сравнение с изследваните проби от 2024 г. Климатичните условия през 2024 г. са компенсирани с повече поливки по време на вегетацията. Това е една от вероятните причини водещи до намаляване съдържанието на фенолни киселини и флавоноиди.

II Научни публикации включени в група от показатели Г-7 (1-13)

Г.7-1 Tomlekova, N., Spasova-Apostolova, V., Panchev, I. and Sarsu, F. (2021). Mutation Associated with Orange Fruit Color Increases Concentrations of β -Carotene in a Sweet Pepper Variety (*Capsicum annuum* L.). *Foods*, 10(6), 1225, 2021, doi: 10.3390/foods10061225, Q1, <https://www.mdpi.com/2304-8158/10/6/1225>

Absrtact: Pepper is the second most important vegetable crop in Bulgarian agriculture and has become the subject of extensive breeding programs that frequently employ induced mutagenesis. The success of breeding programs can be enhanced by the efficient and integral application of different biochemical and molecular methods to characterize specific mutant alleles. On the other

hand, identifying new cost-effective methods is important under a limited-resources environment. In this paper we compare the levels of five health-related carotenoid compounds of fruits (α -carotene, β -carotene, lutein, β -cryptoxanthin, zeaxanthin) between a mutant variety Oranzheva kapia (possessing high β -carotene concentration) and a corresponding initial pepper variety Pazardzhishka kapia 794. Both varieties are intended for fresh consumption. Pepper is a major natural source of β -carotene. It was observed that fruit at both commercial and botanical maturity from mutant variety had greater α -carotene and β -carotene concentrations to the initial variety (7.49 and 1.94 times higher, respectively) meaning that the mutant was superior in fruit quality to the initial genotype. Two hydroxylase enzymes, converting α - and β -carotene to lutein and zeaxanthin, respectively, are known to exist in pepper and are encoded by two genes on chromosomes 3 and 6-*CrtZ_{chr03}* and *CrtZ_{chr06}*. The molecular characterization of the mutant variety through locus-specific Polymerase chain reaction amplification, gene cloning and sequencing as well as expression was performed. Our results suggest that the increased β -carotene accumulation in the mutant variety Oranzheva kapia results from a biosynthetic pathway breakdown due to deletion of *CrtZ_{chr03}* gene.

Резюме: Пиперът е втората най-важна зеленчукова култура в българското земеделие и е станал обект на обширни селекционни програми, които често използват индуциран мутагенезис. Успехът на селекционните програми може да бъде подобрен чрез ефективното и интегрално прилагане на различни биохимични и молекулярни методи за характеризиране на специфични мутантни алели. От друга страна, идентифицирането на нови рентабилни методи е важно в среда с ограничени ресурси. В тази статия сравняваме нивата на пет свързани със здравето каротеноидни съединения в плодовете (α -каротен, β -каротен, лутеин, β -криптоксантин, зеаксантин) между мутантен сорт Оранжева капия (притежаващ висока концентрация на β -каротен) и съответния изходен сорт пипер Пазарджишка капия 794. И двата сорта са предназначени за консумация в пряно състояние. Пиперът е основен естествен източник на β -каротен. Наблюдавано е, че плодовете от мутантния сорт, както в търговска, така и в ботаническа зрялост имат по-високи концентрации на α -каротен и β -каротен в сравнение с изходния сорт (съответно 7,49 и 1,94 пъти по-високи), което означава, че мутантът е с по-високо качество на плодовете от изходния генотип. Известно е, че в пипера съществуват два хидроксилазни ензима, които превръщат α - и β -каротена съответно в лутеин и зеаксантин. Те са кодирани от два гена на хромозоми 3 и 6 - *CrtZ_{chr03}* и *CrtZ_{chr06}*. Извършено е молекулярно характеризиране на мутантния сорт чрез локус-специфична полимеразна верижна реакция, клониране и секвениране на гени, както и чрез експресия. Нашите резултати показват, че повишеното натрупване на β -каротен в мутантния сорт Оранжева капия е резултат от нарушаване на биосинтетичния път поради делеция на гена *CrtZ_{chr03}*.

Г.7-2 Masheva, V. and Spasova-Apostolova V. (2023). Influence of activated charcoal and different concentrations of vitamins on the 7 androgenesis of tobacco from the Krumovgrad ecotype. Bulgarian Journal of Crop Science, 60 (1), 54-59, <https://agriacad.eu/ojs/index.php/bjcs/article/view/1448>

Absrtact: *In vitro* androgenesis is a technique for shortening the breeding process, but the factors of influence is many and is particularly specific to the different crop. This necessitated long-term experimental specification of individual components and concentrations of culture media for each specific genotype. The effect of active charcoal (AC) and different concentrations of B - complex

vitamins on the initial stages of androgenic culture of tobacco Krumovgrad ecotype, in 6 different media (with standard prepared Nitsch and Nitsch vitamins, vitamin B - complex with and without added activated charcoal (AC) in solid state) were study. The experiment was conducted in two years with of 135 flower buds - Krumovgrad ecotype. *In vitro* growth was reported in all media, and nutrient growth rates of 1, 2, 4 and 5 are close, showing that B-complex vitamins could be used instead of standard ones. The strongest development of regenerants was reported at higher concentrations of B-complex. The probable combination of low concentrations of vitamins with active charcoal (AC) has a favorable effect on the initial stages of development of androgenesis in tobacco plants of the Krumovgrad ecotype.

Резюме: *In vitro* андрогенезата е техника за съкращаване на селекционния процес, но факторите на влияние са много и специфични за различните култури. Това предполага дългосрочно експериментално уточняване на индивидуалните компоненти и концентрации на хранителните среди за всеки специфичен генотип. Проучен е ефектът на активния въглен (АК) и различните концентрации на витамини от група В - комплекс върху началните етапи на антерни култури на тютюн от екотип Крумовград. В изследването са включени 6 различни хранителни среди (ХС) в твърдо състояние (Nitsch и Nitsch със стандартни витамини без активен въглен в твърдо състояние (АС); Nitsch и Nitsch със стандартни витамини + активен въглен (АС); хранителна среда с витамин В-комплекс в ниска концентрация без активен въглен (АС); хранителна среда с витамин В-комплекс в ниска концентрация + активен въглен (АС); хранителна среда с витамин В-комплекс във висока концентрация без активен въглен (АС); хранителна среда с витамин В-комплекс във висока концентрация + активен въглен (АС). Опитът е проведен в продължение на две години със 135 цветни бутоната от екотип Крумовград. Отчетени са регенеранти във всички хранителни среди, а отчетения растеж от ХС 1, 2, 4 и 5 са близки, което показва, че витамините от група В могат успешно да се използват вместо стандартните. При използване на по-високи концентрации на В-комплекс е отчетно по-бързо развити регенеранти. Вероятно комбинация от ниски концентрации на витамини с активен въглен (АК) има благоприятен ефект върху началните етапи от развитието на антерни култури от тютюневите растения от екотипа Крумовград.

Г.7-3 Spasova-Apostolova, V., Bozukov, H., and Kasheva, M. (2024). Monitoring of main characteristics to maintain the typicality of the Krumovgrad 58 variety. Bulgarian Journal of Crop Science, 61(4), 35-41 (Bg), <https://agriacad.eu/ojs/index.php/bjcs/article/view/1352>

Absrtact: The maintenance of varietal typicality is essential for the productions and provide source material for breeding targets. Krumovgrad 58 is the most wanted tobacco varieties on the tobacco market from commercial companies in Bulgaria. Cultivation of the variety in untypical areas and significant climatic changes affect its phenotypic characteristics. This necessitates a more detailed and in-depth assessment of the main biometric and quality characteristics of the tobacco. In the present study in experimental field (EF)-Kozarsko were monitoring yield, biometric and quality indicators of 71 generations (from a total of 100) of the selected plants under the EF-Markovo conditions and compared with control plants growing from base seeds of the variety. In order to maintain the genetic structure and narrow the amplitude of possible deviations of the Krumovgrad 58 was made a selection according to typical of the variety parameters. As a result, it was found that the average values of the investigated characteristics of the generations and the average values

of the controls were very close, suggesting that the differences were the result of the environmental conditions and not of significant variations in the variety.

Резюме: Поддържането на типичността на сортовете е от съществено значение за производството и осигуряването на изходен материал за селекционни цели. Крумовград 58 е най-търсеният сорт на пазара на тютюн от търговските фирми в България. Отглеждането на сорта в нетипични райони и осезаемите климатични промени се отразяват върху фенотипните му характеристики. Това налага по-детайлна и задълбочена преценка на основните биометрични и качествени характеристики на тютюна. В настоящото изследване в ОП - с. Козарско са проследени добив, биометрични и качествени показатели на 71 (от общо 100) потомства на избрани в условията на ОП - с. Марково растения и са сравнени с контролни растения от базови семена на сорта. С цел поддържане на генетичната структура и стесняване на амплитудата на евентуални отклонения, на Крумовград 58 е направен отбор по типични за сорта показатели. В резултат се установи, че средните стойности на изследваните показатели от потомствата и средните стойности от контролите са много близки, което предполага, че разликите са в резултат на условията на средата, а не на съществени вариации в сорта.

Г.7-4 Spasova-Apostolova, V. (2024). Comparative study of oriental tobacco varieties from four ecotypes in the conditions of an experimental field – Markovo. Bulgarian Journal of Crop Science, 61(2), 61-69 (Bg), <https://agriacad.eu/ojs/index.php/bjcs/article/view/1315>

Absrtact: Varieties from different oriental tobacco ecotypes are a great sensitivity to the conditions of the environment. In recent years, some varieties of tobacco have been grown in areas other than those for which they were selected. This necessitates to study their plasticity, morphology and quality in different untypical conditions. During the period 2021-2022, biometric, quality and some basic chemical indicators were investigated in the dry tobacco of the four varieties of Krumovgrad 90, Elenski 817, Dupnitsa 160 and Dzebel 576 belonging to four different ecotypes (Ecotype Krumovgrad, Ecotype Eastern Balkans, Ecotype Dupnitsa and Ecotype Dzebel Basma). The experiments were conducted in an experimental field (EF)-Markovo. The values of chemical indicators were determined in an Accredited Laboratory Complex (s) to TTPI. The results show that climatic conditions are a determining factor for plant development and for the quality of the raw material formed, with better biometric indicators reported in 2022. The investigated varieties have a relatively high percentage of the Ist class. In the conditions of EF - Markovo, the highest nicotine values were reported in the variety Elenski 817. Nicotine values in Dupnitsa 160 and Krumovgrad 90 varieties are lower in tobacco from the 2022 harvest. Climate conditions have a great impact on morphological and chemical indicators in the studied varieties.

Резюме: Сортовете от различните екотипове ориенталски тютюн проявяват голяма чувствителност към условията на средата. В последните години някои сортове тютюн се отглеждат в райони различни от тези, за които са селектирани. Това налага изучаване на тяхната пластичност, морфология и качество в различни нетипични условия. През периода 2021-2022 г. са изследвани биометрични, качествени и някои основни химични показатели при сух тютюн на четирите сорта: Крумовград 90, Еленски 817, Дупница 160 и Джебел 576, принадлежащи към четири различни екотипа (екотип Крумовград, екотип Източен Балкан, екотип Дупница и екотип Джебел Басма). Опитите са проведени в опитно поле (ОП) - с. Марково. Стойностите на химичните показатели са определени в Акредитиран Лабораторен Комплекс (ЛКИ) към ИТТИ. Резултатите показват, че

климатичните условия са от определящо значение за развитието на растенията и за качеството на формираната суровина, като по-добри биометрични показатели са отчетени през 2022 г. Изследваните сортове са със сравнително висок процент на I^{ba} класа. В условията на ОП - с. Марково най-високи стойности на никотин са отчетени при сорт Еленски 817. Стойностите на никотин при сортове Дупница 160 и Крумовград 90 са пониски при тютюна от реколта от 2022 г. Климатичните условия оказват голямо влияние на морфологичните и химичните показатели на изследваните сортове.

Г.7-5 Petkova, M., and Spasova-Apostolova, V. (2024). Biological activities of 20 isolates of entomopathogenic fungi of the genus *Beauveria*. Bulgarian Journal of Soil Science Agrochemistry and Ecology, 58(1), 27-38 (Bg), https://agriacad.eu/ojs/index.php/bjssae/article/view/838?article_id=381

Absrtact: Enzymes such as chitinase, proteinase and lipase are involved in the breakdown of insect cuticles. Their pathogenicity, virulence and specificity largely depend on the secretion of these enzymes by different microorganisms. Thus, the level of enzyme activity may also represent a diagnostic tool for selecting an effective biological control agent. In the present study, 20 different isolates of entomopathogenic fungi of the genus *Beauveria* were used and their lipolytic, chitinolytic and proteolytic activities were determined. Enzyme activities are assessed qualitatively according to the presence of a zone of lightening due to their degrading action and quantitatively expressed as a ratio between the zone of enzyme activity and the diameter of the colony. PCR analysis with gene-specific primers located in the sequence of the *Beauveria bassiana* chitinase - chitinase (*chit1*) gene (ACC AY145440) was also carried out. Amplifications of fragments with an expected length of 1225 bp were detected in the majority of *Beauveria* isolates studied. The studied isolates of the genus *Beauveria* differ in their lipolytic, proteolytic and chitin-degrading abilities. The highest total activity was found in four of them 336, 340, 487 and 501 and could be related to their virulence. The information on the enzymatic activities of the studied isolates will be necessary for the development of an efficient preparation for the biological control of the enemies.

Резюме: Ензими като хитиназа, протеиназа и липаза участват в разграждането на кутикулата на насекомите. От отделянето на тези ензими от различни микроорганизми зависи до голяма степен тяхната патогенност, вирулентност и специфичност. По този начин, нивото на ензимна активност може да представлява диагностичен инструмент за избор на ефективен агент за биологичен контрол. В настоящето изследване се използват 20 различни изолата на ентомопатогенни гъби от род *Beauveria* и се определи тяхната липолитична, хитинолитична и протеолитична активност. Ензимните активности се оценяват качествено според наличието на зона на просветляване вследствие на тяхното разграждащо действие и количествено се изразява като съотношение между зоната на ензимна активност и диаметъра на колонията. Проведен е и PCR анализ с ген-специфични праймери локализирани в секвенцията на *Beauveria bassiana* хитиназа - chitinase (*chit1*) ген (ACC AY145440). При по-голямата част от изследваните изолати на род *Beauveria* се установяват амплификации на фрагменти с очаквана дължина 1225 bp. Изследваните изолати от род *Beauveria* се различават по своите липолитични, протеолитични и хитин-разграждащи способности. Най-висока обща активност се установява при четири от тях 336, 340, 487 и 501 и може да бъде свързана с тяхната вирулентност. Информацията за ензимните

активности на проучените изолати ще бъде необходима за разработването на ефикасен препарат за биологичен контрол на неприятелите.

Г.7-6 Spasova-Apostolova, V. and Petkova, M. (2024). Molecular Identification and SCAR Detection of Entomopathogenic Fungi of the Genus *Beauveria*. C.R.Acad.Bulg. Sci., 77(10), 1458–1465, Q3, <https://www.proceedings.bas.bg/index.php/cr/article/view/625>

Absrtact: In recent years, there has been increasing interest in identifying and studying beneficial microorganisms that can be used in organic farming as fertilizers and plant protection agents. Entomopathogenic fungi with an endophytic nature of the genus *Beauveria* are quite promising and their identification and detection in the plant and soil samples are of great importance. Molecular identification of fungi of the genus *Beauveria* was conducted by sequencing the internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene (ITS) regions with universal primers. As a result of the sequencing, it was found that the analyzed strains belong to four genera of *Beauveria* with the following percentage distribution: *B. bassiana* (68.18%), *B. pseudobassiana* (13.64%), *B. varroae* (9.09%) and *B. tenella* (9.09%). The largest percentages of the strains were identified as *B. bassiana*. Sequence-characterized amplified regions (SCAR) have been applied for the detection of *Beauveria* strains in the field samples. The efficiency and ability of three pairs of SCAR markers to differentiate the studied strains were tested. The applied SCAR markers generated fragments with expected length in more than 90% of the investigated strains and could be used as markers for the detection of the fungi from the genus *Beauveria* in field samples. In the selected experimental conditions only *B. varroa* 501 and *B. tenella* 593 lack fragments with used SCAR markers.

Резюме: През последните години се наблюдава нарастващ интерес към идентифицирането и изучаването на полезни микроорганизми, които могат да се използват в биологичното земеделие като торове и средства за растителна защита. Ентомопатогенните гъби с ендофитна природа от рода *Beauveria* са доста обещаващи и тяхното идентифициране и откриване в растителни и почвени проби е от голямо значение. Молекулярната идентификация на гъбите от рода *Beauveria* е проведена чрез секвениране на вътрешните транскрибирани спейсър 1 и 5.8S рибозомни РНК генни (ITS) региони с универсални праймери. В резултат на секвенирането се установи, че анализираниите щамове принадлежат към четири рода *Beauveria* със следното процентно разпределение: *B. bassiana* (68,18%), *B. pseudobassiana* (13,64%), *B. varroae* (9,09%) и *B. tenella* (9,09%). Най-голям процент от щамовете са идентифицирани като *B. bassiana*. За откриване на щамове на *Beauveria* в полеви проби се прилагат секвенционно характеризирани амплифицирани регион (SCAR) маркери. Тествана е ефективността и способността на три двойки SCAR маркери да диференцират изследваните щамове. Приложените SCAR маркери генерираха фрагменти с очаквана дължина в повече от 90% от изследваните щамове и биха могли да бъдат използвани като маркери за откриване на гъби от рода *Beauveria* в полеви проби. С избраните експериментални условия само при щамове *B. varroa* 501 и *B. tenella* 593 не са амплифицирани фрагменти с тестваните SCAR маркери.

Г.7-7 Radev, Z., Spasova-Apostolova, V. and Petkova, M. (2024). Bio-insecticidal Efficacy of *Beauveria bassiana* Vuill. Strains against *Tettigonia viridissima* L. in Tobacco. C. R. Acad. Bulg.Sci., 77 (9), 1417–1422, Q3, <https://www.proceedings.bas.bg/index.php/cr/article/view/620>

Absrtact: The green grasshopper (*Tettigonia viridissima* L.) is a species which attacks tobacco plants. The purpose of the present study was to establish the bio-insecticidal efficacy of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* Vuill. strains 214, 644, and 733 on the growth and development of *T. viridissima* in tobacco. The research was conducted under laboratory conditions. The study found insecticidal effects of the *B. bassiana* strains 214, 644, and 733 against *T. viridissima*. Surviving of larvae was monitored at 5-day intervals until the 15th day after treatment with a spore suspension of the tested *Beauveria* strains. The highest virulence of the tested fungi was shown by strain 644, followed by strains 214 and 733. On the 5th day after treatment, no efficacy against *T. viridissima* larvae was detected. On the 10th day post-treatment strain 644 showed 66.7% efficacy, while efficacy against larvae of grasshoppers for the other two strains 214 and 733 was significantly lower: 33.3%. Efficacy gradually increased and on the 15th day post-treatment 100% mortality of *T. viridissima* was observed for all isolates. The results obtained from the virulence test of *B. bassiana* 214, 644, and 733 ascertain their application as biocontrol agents in tobacco production under field conditions.

Резюме: Зеленият скакалец (*Tettigonia viridissima* L.) е вид, който атакува тютюневите растения. Целта на настоящото изследване е да се установи био-инсектицидната ефикасност на ентомопатогенните гъби *Beauveria bassiana* Vuill, щамове 214, 644 и 733, върху растежа и развитието на *T. viridissima* по тютюна. Изследването е проведено в лабораторни условия. В проучването се установиха инсектицидни ефекти на щамовете 214, 644 и 733 на *B. bassiana* срещу *T. viridissima*. Преживяването на ларвите е наблюдавано на 5-дневни интервали до 15-ия ден след третирането със спорова суспензия от тестваните щамове *Beauveria*. Най-висока вирулентност е отчетена със щам 644, следван от щамове 214 и 733. На 5-ия ден след третирането не е установена ефикасност срещу ларвите на *T. viridissima*. На 10-ия ден след третирането с щам 644 е отчетена 66,7% ефикасност, докато ефикасността срещу ларвите на скакалците с другите два щама 214 и 733 е значително по-ниска: 33,3%. Ефикасността постепенно се увеличава и на 15-ия ден след третирането е наблюдавана 100% смъртност на *T. viridissima* с всички изолати. Резултатите, получени от теста за вирулентност на *B. bassiana* 214, 644 и 733, установява приложението им като биоконтролни агенти в производството на тютюн в полеви условия.

Г.7-8 Spasova-Apostolova, V. and Petkova, M. (2024). Assessment of iPBS and ISSR Markers to Establishment of Genetic Diversity of Entomopathogenic Fungi of Genus Beauveria. Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 27 (5), 519–537, <https://jmabonline.com/bg/article/T6VtfhgmrIffX5pqmEtM>

Absrtact: Endophytic entomopathogenic fungi of the genus *Beauveria* are widely used in various aspects of agricultural practice. The present study evaluated the applicability of two molecular-marker techniques for the study of 23 strains of the genus *Beauveria* from other hosts and areas. Using different conditions of the PCR reactions with the investigated 19 iPBS and 7 ISSR molecular markers, from 2 to 14 fragments were amplified in the different reactions. The iPBS molecular markers technique is effective for the study genetic diversity of fungal species. Three iPBS markers with a greater percentage of polymorphism were selected for study the genetic diversity of the strains. The three selected iPBS reactions (iPBS 2386, iPBS 2277 and iPBS 2390) generated 30-40% polymorphic profiles according to the total number of tested strains and the number of profiles generated by them. The most polymorphic profiles were established with reaction iPBS 2277, which was able to distinguish between most of the studied strains. The results

summarized in the dendrogram showed that the most identical profiles were generated in *Beauveria* 759, 743, 733, 648 and 640. In strains 214, 270, 426-8, 487, 495, 501, 561-re, 592, 593, and 623 with varying degrees of similarity are amplified and individual profiles. The dendrogram was built based on genetic similarities and distance among *Beauveria* species. iPBS and ISSR markers provide a quick, reliable informative system for DNA fingerprinting. The selected three iPBS reactions allow the identification at the species level of the different *Beauveria* species that can be applied as a biocontrol agent against different pests.

Резюме: Ендофитните ентомопатогенни гъби от рода *Beauveria* се използват широко в различни аспекти на селскостопанската практика. В настоящето изследване е оценена ефективността на две молекулярно – маркерни техники за изследване на 23 щама от род *Beauveria* от различни гостоприемници и области. При използване на различни условията на PCR реакциите с изследваните 19 iPBS и 7 ISSR молекулярни маркера, бяха амплифицирани от 2 до 14 фрагмента при различните реакции. Техниката на iPBS молекулярните маркери е ефективна за изследване на генетичното разнообразие на гъбични видове. Избрани са три iPBS маркера с по-голям процент полиморфизъм за изследване на генетичното разнообразие на щамове. Трите избрани iPBS реакции (iPBS 2386, iPBS 2277 и iPBS 2390) генерират 30-40% полиморфни профили според общия брой изследвани щамове и броя генерирани от тях профили. Най-полиморфните профили бяха установени с реакцията iPBS 2277, която успя да направи разлика между повече изследвани щамове. Резултатите, обобщени в дендрограмата, показват, че най-идентични профили са генерирани при *Beauveria* 759, 743, 733, 648 и 640. При щамове 214, 270, 426-8, 487, 495, 501, 561-re, 592, 593 и 623 с различна степен на сходство се амплифицират и индивидуални профили. Дендрограмата е изградена въз основа на генетични прилики и разстояние между видовете *Beauveria*. iPBS и ISSR маркерите осигуряват бърза, надеждна информационна система за ДНК отпечатъци. Избраните три iPBS реакции позволяват идентифицирането на ниво вид на различните видове на *Beauveria*, които могат да бъдат прилагани като средство за биоконтрол срещу различни вредители.

Г.7-9 Petkova, M., Spasova-Apostolova, V. and Tahsin, N. (2024). Antagonistic effect of *Beauveria* against *Alternaria solani* and *Rhizoctonia solani*. Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 27 (5), 582–600, <https://jmabonline.com/bg/article/3QcypUeTIWrwQWV88Kbq>

Abstract: The mechanism of plant disease suppression by *Beauveria* sp. includes endophytism, competition, antibiosis, mycoparasitism and induced systemic resistance. The production of a wide range of volatile organic compounds, hydrolytic enzymes and various secondary metabolites affects its antimicrobial properties against various plant pathogens. The primary infection by the fungal diseases *Alternaria* and *Rhizoctonia* is transmitted by soil, wind, and irrigation water. It affects all stages of growth and organs of plants of the family *Solanaceae*. Symptoms of *Rhizoctonia solani* are characterized by lesions that begin on the leaves and extend up the stem. *Alternaria solani* is an airborne fungus that shows the strongest symptoms on the stem, leaves and fruits of *Solanaceous* plants, resulting in severe defoliation affecting the rate of photosynthesis, stunted growth and consequently loss of yield. Primary screening of 23 isolates of the genus *Beauveria* was performed for growth inhibition of both fungal phytopathogens. Co-cultivation of *Beauveria* isolates with the phytopathogenic fungi *Alternaria solani* and *Rhizoctonia solani* showed varying degrees of suppression by co-cultivation of mycelium, cell-free supernatant (with and without filter) and with methanolic extraction of secondary metabolites. Screening was also performed for indole 3-acetic acid production from the studied *Beauveria* isoalates. From the

results of antifungal activity and indole 3-acetic acid production, it was summarized that *Beauveria* isolate 270, 561, 593, 743, and 759 showed the highest activity. This work provides a workflow for selecting useful *Beauveria* isolates for plant growth promotion and biological defence.

Резюме: Механизмът за потискане на болестите по растенията от *Beauveria* sp. включват ендифитизъм, конкуренция, антибиоза, микопаразитизъм и индуцирана системна резистентност. Производството на широк спектър от летливи органични съединения, хидролитични ензими и различни вторични метаболити задейства неговите антимикробни свойства срещу различни растителни патогени. Първичната инфекция от гъбните болести *Alternaria* и *Rhizoctonia* се идва от почвата, предава се чрез вятъра и поливната вода и засяга всички фази на растеж и органи на растенията от сем *Solanaceae*. Симптомите на *Rhizoctonia solani* се характеризират с лезии, които започват от листата и се простират нагоре по стъблото. *Alternaria solani* е гъба, която се пренасяна от въздуха и показва най-силни симптоми по стъблото, листата и плодовете на растенията от сем. Картофови, което води до сериозно обезлистване, засягащо скоростта на фотосинтезата, забавен растеж и съответно загуба на добив. Извършен е първичен скрининг на 23 изолата от рода *Beauveria*, за инхибиране на растежа и на двата гъбни фитопатогена. Съвместното култивиране на изолатите от *Beauveria* с фитопатогенните гъби *Alternaria solani* и *Rhizoctonia solani* показва различна степен на потискане чрез съвместно култивиране на мицел, безклетъчен супернатант (с и без филтър) и с метанолова екстракция на вторични метаболити. Беше извършен и скрининг на за производство на индол 3-оцетна киселина от изследваните изолати от род *Beauveria*. От резултатите от противогъбната активност и производство на индол 3-оцетна киселина беше обобщено, че *Beauveria* 270, 561, 593, 743 и 759 показват най-висока активност. Тази работа предоставя работен процес за избор на полезни изолати *Beauveria* за насърчаване на растежа на растенията и биологичната защита на растенията.

Г.7-10 Kirkova, D., Malinova, S., Docheva, M. and Spasova-Apostolova, V. (2024). Chemical Composition of Oriental Tobacco Varieties and Lines of the Dupnitsa Ecotype by Harvest Groups. Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 27 (5), 561–581, <https://jmabonline.com/bg/article/9AB88h1PKoA9wi9fRlnz>

Absrtact: Three varieties (Dupnitsa 160, Rila 544 – standard and Katerini – introduced variety) and two selection lines (Line 503 and Line 504) of oriental tobacco from the Basmi variety group, Dupnitsa ecotype, were studied. The chemical composition of tobacco leaves was determined by harvesting groups (from the second to the fifth). It was found that the nicotine content decreases in the upper harvesting groups from $3.25 \pm 0.02\%$ (in the second harvesting group at Line 503) to $0.97 \pm 0.02\%$ (in the fifth harvesting group at the Rila 544 variety). The amount of total nitrogen in individual samples varies in different degree by harvesting groups – from $1.13 \pm 0.02\%$ (in the fourth harvesting group at Line 503) to $2.53 \pm 0.02\%$ (in the second harvesting group at Dupnitsa 160). The protein substances are unevenly distributed in the different harvesting groups. The content of total sugars is highest in the middle harvesting zone (third and fourth harvest group) – $33.20 \pm 0.20\%$ (Line 504, third harvesting group) and lower in the upper (fifth harvest group) harvesting zone – $14.49 \pm 0.20\%$ (variety Dupnitsa 160). The content of total sugars is inversely related to the distribution of nicotine. There is an uneven distribution of chlorides, ash and silicate residues (sand) by harvesting groups, which will be followed in the next harvests. The highest sand content was found in the second harvesting group, which is also the closest to the soil – between $3.14 \pm 0.10\%$ (variety Rila 544) and $7.04 \pm 0.10\%$ (Line 503).

Резюме: Изследвани са три сорта (Дупница 160, Рила 544 – стандарт и Катерини – интродуциран сорт) и две селекционни линии (Линия 503 и Линия 504) ориенталски тютюн от сортова група Басми, екотип Дупница. Определен е химичният състав на тютюневите листа по беритбени групи (от втора до пета). Установено е, че съдържанието на никотин намалява в по-горните беритбени групи от $3.25 \pm 0.02\%$ (във втора беритбена група при Линия 503) до $0.97 \pm 0.02\%$ (в пета беритбена група при сорт Рила 544). Количеството на общ азот при отделните образци варира в различна степен по беритбени групи – от $1.13 \pm 0.02\%$ (в четвърта беритбена група при Линия 503) до $2.53 \pm 0.02\%$ (във втора беритбена група при Дупница 160). Белтъчните вещества са разпределени неравномерно в различните беритбени групи. Съдържанието на общи захари е най-високо при средния беритбен пояс (трета и четвърта беритбена група) – $33.20 \pm 0.220\%$ (Линия 504, трета беритбена група) и по-ниско при горен (пета беритбена група) беритбен пояс – $14.49 \pm 0.20\%$ (сорт Дупница 160). Съдържанието на общи захари е в обратна зависимост спрямо разпределението на никотин. Наблюдава се неравномерно разпределение на хлориди, пепел и силикатни остатъци (пясък) по беритбени групи. Най-високо съдържание на пясък е установено във втора беритбена група, който е и най-близкия до почвата – между $3.14 \pm 0.10\%$ (сорт Рила 544) и $7.04 \pm 0.10\%$ (Линия 503)

Г.7-11 Kirkova, D., Docheva, M., Malinova, S. and Spasova-Apostolova, V. (2024). Determination of Nitrogen-Containing Substances in the Gene Pool of Tobacco Ecotype Dupnitsa by Continuous Flow Analysis. Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 27 (6), 591–608, <https://jmabonline.com/bg/article/irbTLk9xrEFEY2Qx8WXc>

Abstract: Nitrogen-containing substances in tobacco (most often presented as total nitrogen) include alkaloids, proteins, amino acids, nitrates, ammonia, etc., with the largest relative share being occupied by alkaloids and proteins. The use of modern analytical methods significantly increases the accuracy and precision of the analysis and reduces the time for sample preparation. The aim of the study is to determine the content of nitrogen-containing substances such as proteins, nitrates and ammonia in the gene pool of tobacco ecotype Dupnitsa. The study was conducted in the period 2022-2023 in the experimental field – Rila, at the Tobacco and Tobacco Products Institute, village of Markovo. Two selection lines (Line 503 and Line 504) and three established varieties (variety Dupnitsa 160, variety Rila 544 and introduced variety Katerinis) were studied. The determination of nitrogen-containing substances (total nitrogen, proteins, nitrates and ammonia) is carried out by continuous flow analysis method according to standardized and validated methods. An optimal content of proteins was established in all studied tobaccos ($4.59 \pm 0.04\%$ Line 503, harvest.2023 – $6.42 \pm 0.06\%$ Katerinis, harvest 2023) and a low content of nitrates ($0.03 \pm 0.01\%$ Line 504, harvest 2022 – $0.08 \pm 0.01\%$ Dupnitsa 160, harvest 2022) and ammonia ($0.08 \pm 0.01\%$ Line 503, harvest 2023; Katerinis, harvest 2022 – $0.19 \pm 0.01\%$ Dupnitsa 160, harvest.2022). The obtained results show a high quality of the tobacco raw material. In addition, the breeding lines outperformed the established varieties due to the lower amount and weaker variation of nitrogen-containing substances during the studied harvests.

Резюме: Азот-съдържащите вещества в тютюна (най-често представени като общ азот) включват алкалоиди, белтъчни вещества, аминокиселини, нитрати, амоняк и др., като най-голям относителен дял заемат алкалоидите и белтъчните вещества. Използването на съвременни аналитични методи значително повишава точността и прецизността на анализа и намалява времето за пробоподготовка. Целта на изследването е да се определи

съдържанието на азот-съдържащи вещества като белтъци, нитрати и амоняк в генофонда от тютюни екотип Дупница. Изследването е проведено в периода 2022-2023г. в опитното поле – Рила към Институт по тютюна и тютюневите изделия с. Марково. Изследвани са две селекционни линии (Линия 503 и Линия 504) и три утвърдени сорта (сорт Дупница 160, сорт Рила 544 и интродуциран сорт Катерини). Определянето на азот-съдържащи вещества (общ азот, белтъчни вещества, нитрати и амоняк) се извършва чрез метод анализ в поток по стандартизирани и валидирани методи. Установено е оптимално съдържание на белтъчни вещества във всички изследвани тютюни ($4.59 \pm 0.04\%$ Линия 503, р.2023 – $6.42 \pm 0.06\%$ Катерини, р.2023) и ниско съдържание на нитрати ($0.03 \pm 0.01\%$ Линия 504, р.2022 – $0.08 \pm 0.01\%$ Дупница 160, р.2022) и амоняк ($0.08 \pm 0.01\%$ Линия 503, р.2023; Катерини, р.2022 – $0.19 \pm 0.01\%$ Дупница 160, р.2022). Получените резултати показват високо качество на тютюневата суровина. В допълнение, селекционните линии превъзхождат утвърдените сортове поради по-ниското количество и по-слабото вариране на азотсъдържащи вещества през изследваните реколти.

G.7-12 Spasova-Apostolova, V. and Petkova, M. (2024). Siderophore Synthesis and Biocontrol Potential of Entomopathogenic Fungi of the Genus *Beauveria* against *Fusarium graminearum*. Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 27 (6), 507–526, <https://jmabonline.com/bg/article/nn8OvmkxgnXrkY9DKHTX>

Absrtact: In recent years, priority has been given to organic farming and the search for ecological methods to deal with plant diseases caused by phytopathogenic fungi. *Fusarium graminearum* causes serious economic losses in cereal production. It produces deoxynivalenol, a type of mycotoxin that exhibits a wide range of toxic effects in humans and animals. In this study, 23 strain of the genus *Beauveria* were tested for their antagonistic potential against *F. graminearum* by using different co-cultivation methods (mycelium, cell-free supernatant and methanol extracts of their secondary metabolites). Screening of selected isolates of the genus *Beauveria* for siderophore synthesis was performed by culturing the fungi on CAS agar (Chrome Azurol S) with the addition of 2% malt extract. The highest siderophore synthesis was observed in isolates 501, 644, 648 and 733. Isolates 214, 262, 336, 426-8 and 640 exhibited highest total activities against *F. graminearum* in all co-culture methods applied. The present study highlights the potential application of entomopathogenic fungi of the genus *Beauveria* and their metabolites as biocontrol agents against *F. graminearum*.

Резюме: През последните години се дава приоритет на органичното земеделие и търсенето на екологични методи за справяне с болестите по растенията, причинени от фитопатогенни гъби. *Fusarium graminearum* причинява сериозни икономически загуби в производството на зърнени култури. Произвежда деоксиниваленол, вид микотоксин, който проявява широк спектър от токсични ефекти при хора и животни. В това проучване 23 щамове от рода *Beauveria* са тествани за техния антагонистичен потенциал срещу *F. graminearum* чрез използването на различни методи на съвместно култивиране (мицел, безклетъчен супернатант и метанолови екстракти от техните вторични метаболити). Скринингът на избрани изолати от рода *Beauveria* за синтез на сидерофори беше извършен чрез култивиране на гъбите на CAS агар (Chrome Azurol S) с добавяне на 2% малцов екстракт. Най-висок синтез на сидерофори се наблюдава при щамове 501, 644, 648 и 733. Изолати 214, 262, 336, 426-8 и 640 проявяват най-висока обща активност срещу *F. graminearum* при всички прилагани методи на съвместно култивиране. Настоящото изследване подчертава

потенциалното приложение на ентомопатогенни гъби от рода *Beauveria* и техните метаболити като биоконтролен агент срещу *F. graminearum*.

Г.7-13 Spasova-Apostolova, V., Kasheva, M. and Bozukov, H. (2025). Biometric, qualitative and chemical studies of four lines of oriental tobacco, 62 (6), (Bg) (in print).

Absrtact: The tangible changes in climatic conditions and the dynamics in legal and market requirements, require the creation, evaluation and maintenance of a rich genetic resource of lines and varieties, that meet diverse needs and serve as the basis for various breeding target. In the period 2023-2024 in the conditions of the experimental field (EF) - of Markovo were studied biometric indicators, yield (kg/da), distribution by classes and some basic chemical indicators of dry tobacco of four lines of oriental tobacco. As a result, it was found that the highest average values of the indicators plant height, number and width of leaves were reported in line 73. Line 71 has the greatest leaf length. Lines 73 and 41 had the highest average yield from both years. The highest percentage of I-st class and the lowest of III-rd was found at line 71. It also has the highest nicotine percentage. Line 41 has the most balanced chemical composition. The results obtained show that the values of some basic indicators of the studied lines are better than the control variety, which characterizes them as diverse and valuable breeding material.

Резюме: Осезаемите промени в климатичните условия и динамиката в изискванията на закона и пазара налагат създаване, оценка и поддържане на богат генетичен ресурс от линии и сортове отговарящи на разнообразните нужди и служещи като основа за различни селекционни цели. В периода 2023-2024 г. в условията на ОП-с. Марково са изследвани биометрични показатели, добив (kg/da), разпределение по класи и някои основни химични показатели при сух тютюн на четири линии ориенталски тютюн. В резултат се установи, че най-високи средни стойности на показателите височина на растенията, брой и ширина на листа са отчетени при линия 73. Линия 71 е с най - голяма дължина на листата. С най-висок среден добив от двете години са линиите 73 и 41. Най-висок процент I-ва класа и най-нисък на III-та класа е установен при линия 71. Тя е и с най-висок процент на никотин. С най-балансиран химичен състав е линия 41. От получените резултати се вижда, че стойностите на някои основни показатели на изследваните линии превъзхождат контролния сорт, което ги характеризира, като разнообразен и ценен селекционен материал.

III Научни публикации включени в група от показатели Г-8 (1)

Г.8-1 Spasova-Apostolova, V. and Masheva, V. (2020). Influence of medium components on tobacco androgenesis. Proceedings of national scientific conference with international participation, Ecology and Health, Plovdiv, I-st section: 76, 81, https://hst.bg/Ekologia%20i%20zdраве_25_26.06.2020_sbornik.pdf

Absrtact: The achievements of *in vitro* techniques to develop haploid plants were essential for shortening the breeding process. The clarification of the medium components (vitamins and hormones) effect was important for correctly application and use of the androgenesis potential in breeding practice. To study the influence of kinetin, folic acid and the possibility of using complex vitamins from the group - B in the androgenesis of 39 varieties and lines of Bulgarian tobacco (total 135 colored buttons), were prepared five different *in vitro* mediums according to the Nitsch and Nitsch (1969) recipe with different composition. The results showed the growth of plants in

all five medium, but the highest total percentage in medium with B vitamin, without kinetin. In *in vitro* medium including kinetin except plants growing has been reported also callus formation. Growing, both on aboveground parts of plants and too the root system was observed mainly on medium with kinetin, B- complex and folic acid. This allowed the plants to adapt without the need to reseed them for rhizogenesis medium. The most adapted plants was found in nutrient media with B-complex folic acid and kinetin. The obtained results contributed to the clarification of the kinetin addition effect on anther cultures and show the possibility of used the B complex vitamins in the androgenesis medium.

Резюме: Постиженията на *in vitro* техниките за създаване на хаплоидни растения са от съществено значение за съкращаване на селекционния процес. Уточняване влиянието на компонентите на хранителната среда (ХС) (витамини и хормони) е важно за правилното прилагане и използване на потенциала на андрогенезата в селекционната практика. За да се изследва влиянието на кинетин, фолиева киселина и възможността за използване на комплексни витамини от групата - В при андрогенезата на 39 сорта и линии български тютюн (общо 135 цветни бутона) са приготвени пет *in vitro* хранителни среди по рецепта на Nitsch and Nitsch (1969 г.) с различен състав. Резултатите показват прорастване на растения във всички пет ХСи. С най-висок общ процент при ХС с витамини от групата В без добавяне на кинетин. При ХС с кинетин освен директна органогенеза е отчетено и образуване на калус. Прорастване, както на надземни части на растения, така и на коренова система се наблюдава предимно на ХСи с кинетин, В-комплекс и фолиева киселина. Това позволява растенията да се адаптират без да е необходимо препосвяването им на ХС за ризогенез. Най-голям брой адаптирани растения са установени на ХС с В- комплекс, фолиева киселина и кинетин. Получените резултати допринасят за изясняване на влиянието на кинетина върху антерните култури и показват възможността за използване на комплексни витамини от групата В в средите за андрогенез.