

Резюмета на рецензираните публикации

на гл.ас. д-р Мариета Христозкова

на български език и на един от езиците, които традиционно се ползват в съответната научна област

1. **Hristozkova M.**, Orfanoudakis M. (2023). Arbuscular mycorrhiza and its influence on crop production. *Agriculture*, 13(5), 925. Q2 IF=3,6;
doi.org/10.3390/agriculture13050925;

ABSTRACT:

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) have become attractive as bio stimulants in agriculture due to plant nutrient uptake enhancement and stress tolerance. Plants frequently interact with microbes under natural conditions, which directly mediate plant responses to environmental adversities. As a crucial element of soils, microbes are an integral part of the agricultural ecosystem. AMF are ubiquitous widespread soil microorganisms that can form symbiotic associations with most of agricultural plants. These beneficial microbes can offer an array of advantages to host plants. The focus of this Special Issue is to consider different points of view relating to the use of AMF as an environmentally friendly tool both in greenhouse and field crop production. This perspective is emphasized by the published studies on the application of mycorrhizal fungi to enhance crop performance and production as well as on the role of these soil microorganisms in crop stress tolerance and sustainability improvement.

РЕЗЮМЕ:

Арбускуларните микоризни гъби (АМГ) са атрактивни като биостимуланти в селското стопанство поради уникалното си влияние върху усвояването на хранителни вещества от растенията и устойчивостта на стрес. Растенията често взаимодействат с почвените микроорганизми при естествени условия, които директно медиат реакциите на растенията към неблагоприятните условия на околната среда. Като ключов елемент на почвите, микроорганизмите са неразделна част от агро-екосистемите. АМГ са повсеместно разпространени почвени микроорганизми, които могат да образуват симбиотични асоциации с повечето селскостопански растения. Тези полезни микроорганизми могат да предложат набор от предимства на растенията гостоприемници. Фокусът на това специално издание е да разгледа различни гледни точки, свързани с използването на АМГ като екологичен инструмент, както в оранжерийното, така и в полското производство. Публикуваните проучвания подчертават прилагането на микоризни гъби за подобряване на производителността на културите, както и ролята на тези почвени микроорганизми в толерантността на културите към стрес и повишаване на устойчивостта им.

2. Geneva M., **Hristozkova M.**, Kirova E., Sichanova M., Stancheva I. (2023). Response to drought stress of *in vitro* and *in vivo* propagated *Physalis peruviana* L. plants inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi. *Agriculture*, 13(2), 472. Q2 IF=3,6
doi:<https://doi.org/10.3390/agriculture13020472>

ABSTRACT

Physalis peruviana L. is one of the most favorable tropical fruit due to its fast growth and nutritional properties. The current research outlined the response to drought stress of *golden berry* plants inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi *Claroideoglossum claroideum* and propagated *in vitro* as well as from seeds. The implementation of mycorrhizal symbiosis was determined by root colonization, glomalin content, and alkaline and acid phosphatases in roots and soil. The plant protection was assured by enzyme and non-enzyme antioxidants. The adapted *in vitro* propagated plants demonstrated higher resistance to drought than plants developed from seeds indicated by increased growth parameters (shoot, root biomass, fruit number), plastid pigment content, antioxidant activity, and less enhancement of oxidative markers levels in water-deficient conditions. The findings in the present research are relevant to obtain the optimal mycorrhizal association and type of propagation in an adverse environment for *golden berry* development and will lead to the establishment of a database and model of varied plant responses to stressful conditions such as drought.

РЕЗЮМЕ

Physalis peruviana L. е един от най-благоприятните за отглеждане тропически плодове поради бързия си растеж и хранителни свойства. Настоящите изследвания очертаха отговора на стреса към засушаване на отглежданите растения физалис, инокулирани с арбускуларни микоризни гъби *Claroideoglossum claroideum* и размножени *in vitro*, както и от семена. Осъществяването на микоризната симбиоза се определя от колонизацията на корените, съдържанието на гломалин и алкалните и киселите фосфатази в корените и почвата. Защитата на растенията е осигурена от ензимни и неензимни антиоксиданти. Адаптираните растения след *in vitro* размножаване, демонстрират по-висока сухоустойчивост отколкото растенията, развити от семена, показвайки повишаване в параметрите на растеж (биомасата на надземни части и корени, брой плодове), съдържанието на пластидни пигменти, антиоксидантната активност и по-слабо повишаване нивата на оксидативните маркери в условия на дефицит на вода. Констатациите в настоящото изследване са от значение за получаване на оптимална микоризна асоциация и тип размножаване в неблагоприятна среда за развитие на физалис и ще доведат до създаването на база данни и модел на реакциите на растенията към стресови условия като засушаване.

3. Geneva M., Zayova E., **Hristozkova M.**, Stancheva I. (2022). Antioxidant capacity of *Origanum heracleoticum* L. flower and leaf extracts and their essential oil profiles of plants from micropropagation and collection from natural habitats. *Current applied science and technology*, 10-55003. Q4 SJR=0,18; doi.org/10.55003/cast.2022.01.22.015

ABSTRACT

The composition of the essential oils and the antioxidant properties of *Origanum heracleoticum* L. leaves and flowers collected from four different natural populations in Bulgaria (two locations in Kresna Gorge and two locations in Rhodopes Mountain) were studied and compared with those of micropropagated and field-adapted plants. Explants for micropropagation from wild-growing plants from Gorna Breznitsa (Kresna Gorge) were used. The enzyme antioxidant potential characterised by the activity of superoxide dismutase, catalase, guaiacol peroxidase, ascorbate peroxidase as well as the non-enzyme antioxidant potential characterized by the content of phenols, flavonoids, water- and lipid-soluble antioxidant metabolites, were affected by environmental conditions and type of propagation (wild or micro). The highest enzyme antioxidant potential was observed in the flowers and leaves of the micropropagated plants, followed by the plants collected from Gorna Breznitsa. The variation in the content of metabolites with antioxidant potential in the Greek oregano collected from the two locations from each two areas of Bulgaria was detected. The higher content of phenols and flavonoids was detected in micropropagated plants as well as in wild-plants collected from two localities from Kresna Gorge, when compared with the wild-plants collected from Eastern Rhodopes. Forty-five compounds in the *O. heracleoticum* essential oil collected from the native populations were identified. Based on the essential oil composition, and especially on the carvacrol and thymol contents, the *O. heracleoticum* plants from all investigated natural populations in Bulgaria belonged to the carvacrol chemotype. Besides environmental conditions, another factor that affected the composition of *O. heracleoticum* essential oil was the existence of chemotypes.

РЕЗЮМЕ

Съставът на етеричните масла и антиоксидантните свойства на листата и цветовете на *Origanum heracleoticum* L., събрани от четири различни природни популации в България (две местоположения в Кресненското дефиле и две местоположения в Родопите), бяха изследвани и сравнени с тези на микроразмножени и адаптирани растения в полеви условия. Използвани са експланти за микроразмножаване от диворастящи растения от Горна Брезница (Кресненското дефиле). Ензимният антиоксидантен потенциал, характеризиращ се с активността на супероксид дисмутаза, каталаза, гваякол пероксидаза, аскорбат пероксидаза, както и неензимният антиоксидантен потенциал, характеризиращ се със съдържанието на феноли, флавоноиди, водо- и липидоразтворими антиоксидантни метаболити, бяха повлияни от околната среда, условията и вид на размножаване (див или микро). Най-висок ензимен антиоксидантен потенциал се наблюдава в цветовете и листата на микроразмножените растения, следвани от растенията, събрани от Горна Брезница. Установени са вариации в съдържанието на метаболити с антиоксидантен потенциал в гръцкия риган, събран от двете локации от всяка от двете области на България. По-високо съдържание на феноли и флавоноиди е установено в микроразмножени растения, както и в диви растения, събрани от две находища от Кресненското дефиле, в сравнение с диви растения, събрани от Източни Родопи. Бяха идентифицирани четиридесет и пет съединения в етеричното масло от *O. heracleoticum*, събрани от местните популации. Въз основа на състава на етеричното масло и особено на съдържанието на карвакрол и тимол, растенията *O. heracleoticum* от всички изследвани природни популации в България принадлежат към

хемотипа карвакол. Установено бе, че освен условията на околната среда, друг фактор, който повлиява състава на етеричното масло от *O. heracleoticum*, е съществуването на различни хемотипове.

4. Todorova D., Katerova Z., Dimitrova R., Petrova M., **Hristozkova M.**, Sergiev I. (2020). Exogenous spermine application increases quantity of rosmarinic acid and carnosic acid in salt-treated *Salvia officinalis* L. plants in pot experiments. *Comptes Rendus de l'Academie Bulgare des Sciences*, 73(6), 800-808. Q2 IF=0,378
doi:10.7546/CRABS.2020.06.07

ABSTRACT

Sage (*Salvia officinalis* L.) is a medicinal plant commonly used in the traditional medicine. Polyamines are reported to protect various plant species against salinity stress. The aim of the present investigation was to assess the ability of foliar spermine application to decrease the adverse effects of salinity in *Salvia officinalis* plants with special focus on rosmarinic and carnosic acids – sage's active substances with pharmacological value. Salinity provoked inhibition of sage growth accompanied by loss of turgor. NaCl treatment considerably increased the concentrations of malondialdehyde, free proline and free thiol-containing compounds, but decreased the levels of hydrogen peroxide (H₂O₂), total phenolics, rosmarinic acid, and carnosic acid. Pretreatment with spermine diminished the effects of salinity on the measured parameters and increased the content of rosmarinic and carnosic acids. The results suggest that in pot experiments the foliar application of spermine partially alleviated the negative consequences of salt stress in sage.

РЕЗЮМЕ

Градинският чай (*Salvia officinalis* L.) е лечебно растение, често използвано в традиционната медицина. Съобщава се, че полиамините предпазват различни растителни видове от солеви стрес. Целта на настоящото изследване беше да се оцени способността на листното прилагане на спермин за намаляване на неблагоприятните ефекти от засоляване в *Salvia officinalis* с акцент върху натрупването на розмаринова и карнозинова киселина – активни вещества в градинския чай с фармакологична стойност. Засоляването провокира инхибиране на растежа на градинския чай, придружено от загуба на тургор. Третирането с NaCl значително повишава концентрациите на малондиалдехид, свободен пролин и свободни тиол-съдържащи съединения, но намалява нивата на водороден пероксид (H₂O₂), общи феноли, розмаринова киселина и карнозинова киселина. Предварителната обработка със спермин намалява ефектите на засоляване върху измерените параметри и повишава съдържанието на розмаринова и карнозинова киселина. Резултатите показват, че при листното прилагане на спермин частично се облекчават негативните последици от солевия стрес при градински чай.

5. Zayova E., Geneva M., Miladinova-Georgieva K., **Hristozkova M.**, Stancheva I. (2019). Impact of plant growth regulators on Greek oregano micropropagation and antioxidant activity. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 16(2), 297. Q4 SJR=0,136
doi:<http://dx.doi.org/10.13005/bbra/2746>

ABSTRACT:

This study highlights the development and achievements made for the micropropagation of Greek oregano (*Origanum heracleoticum* L.) using stem tip explants. The shoots were cultured on Murashige and Skoog (MS) medium followed different concentrations of plant growth regulators (PGR) - 6-benzyl aminopurine, thidiazuron and zeatin at concentrations (0.5 or 1.0 mg L⁻¹). The induction of multiple shoots from stem tip segments was the highest in MS medium supplemented with 1.0 mg L⁻¹ zeatin. It was the most effective medium for shoot formation, which produced multiple shoots (2.7) with an average height of 3.5 cm. These shoots were transferred on half strength MS medium containing three different auxins: indole-3-butyric acid, α -naphthalene acetic acid or indole-3-acetic acid (0, 0.1 and 0.5 mg L⁻¹) for rooting. Multiple shoots were the most efficiently rooted on ½ MS medium supplemented with 0.5 mg L⁻¹ indole-3-butyric acid. Rooted plants showed the best adaptation on pots containing peat: perlite (2: 1 v/v). The higher rates of shoots number and height per plant have a positive relationship with the production of metabolites with antioxidant potential as phenols and flavonoids as well as with ferric reducing antioxidant potential.

РЕЗЮМЕ:

Това проучване подчертава развитието и постиженията, направени за микроразмножаване на гръцки риган (*Origanum heracleoticum* L.), използвайки експланти от върха на стъблото. Те се култивират върху среда Murashige и Skoog (MS) в различни концентрации на регулатори на растежа (PGR) - 6-бензил аминопурин, тидиазурон и зеатин в концентрации (0,5 или 1,0 mg L⁻¹). Индуцирането на множество разклонения от сегменти на върха на стъблото е най-висока в MS среда, допълнена с 1,0 mg L⁻¹ зеатин. Това беше най-ефективната среда за образуване на разклонения (2,7) със средна височина 3,5 cm. Те бяха прехвърлени върху ½ MS среда, съдържаща три различни ауксини: индол-3-маслена киселина, α -нафтил оцетна киселина или индол-3-оцетна киселина (0, 0,1 и 0,5 mg L⁻¹) за вкореняване. Най-ефикасното вкореняване е на ½ MS среда, допълнена с 0,5 mg L⁻¹ индол-3-маслена киселина. Вкоренените растения показаха най-добра адаптация в саксии, съдържащи торф:перлит (2: 1 v/v). По-високите стойности на броя на разклоненията и височината на растенията имат положителна връзка с производството на метаболити с антиоксидантен потенциал като феноли и флавоноиди, както и с желязо-редуциращ антиоксидантен потенциал.

6. Stancheva I., Geneva M., **Hristozkova M.**, Zayova E. (2019). Comparison of bioactive compounds in *Hyssopus officinalis* plants collected from natural habitats with those propagated from seed and *in vitro*. *Journal of Herbs, Spices Medicinal Plants*, 25(2), 104-113. Q3 SJR=0,2

doi:10.1080/10496475.2019.1572686

ABSTRACT

The biologically active compounds present in the methanol extracts from *Hyssopus officinalis* that were cultivated from seeds, *in vitro* propagated, and from natural habitats, were compared. The content of the investigated nonenzymatic low molecular metabolites with antioxidant capacity, phenols and flavonoids were the highest in flowers and leaves in plants that were *in vitro* propagated. Leaf and flower extracts of *H. officinalis* in all three plant groups differed in their antioxidant potential, but the highest values were observed in those that were *in vitro* propagated. The highest concentration of essential oil was noted in plants from natural habitats.

РЕЗЮМЕ

Сравнени бяха биологично активните съединения в метаноловите екстракти от *Hyssopus officinalis*, култивирани от семена, размножени *in vitro* и от естествени местообитания. Съдържанието на изследваните неензимни нискомолекулни метаболити с антиоксидантен капацитет, феноли и флавоноиди е най-високо в цветовете и листата на растенията, които са размножени *in vitro*. Екстрактите от листа и цветя на *H. officinalis* и в трите групи растения се различават по своя антиоксидантен потенциал, но най-високи стойности се наблюдават при размножените *in vitro*. Най-високата концентрация на етерично масло е отбелязана в растенията от естествени местообитания.

7. Ivanova D., Geneva M., **Hristozkova M.**, Stancheva I., Mincheva J., Petkova Z. (2019). A new type of biological activators and organic fertilizers used in the growing of medicinal plant calendula (*Calendula officinalis* L.). *Comptes Rendus de l'Academie Bulgare des Sciences* 72 (4), 561-144 Q2 IF=0,343

DOI: 10.7546/CRABS.2019.04.18

ABSTRACT

The use of organic fertilizers is a suitable alternative for safe food production, healthy environment and human health, instead of the use of chemical fertilizers with harmful effect. The objective of this study was to evaluate the effect of bio-fertilizers (Humipromoter, Biopromoter and manure) alone and in combination with natural bioactivators (Amminostim Bio and Aminsol) on the antioxidant capacity of pot marigold (*Calendula officinalis* L.). The use of bio-fertilizers using had a significant positive effect on the biometrical and antioxidant parameters. Adding of natural bioactivators AB or AS to the plants fertilized with organic fertilizers or manure does not lead to significant changes to the flowers biometrics. The highest content of flowers carotenoids was recorded in plants fertilized with Biopromoter alone and in combination with both natural bioactivators. When plants are fertilized with manure in combination with both natural bioactivators the highest content of phenols, flavonoids, and water soluble metabolites with antioxidant capacity were measured.

РЕЗЮМЕ

Използването на органични торове е подходяща алтернатива за безопасно производство на храни, здравословна околна среда и човешкото здраве, вместо използването на химически торове с вредно въздействие. Целта на това проучване беше да се оцени ефекта на био-торове (Humipromoter, Biopromoter и оборски тор) самостоятелно и в комбинация с естествени биоактиватори (Amminostim Bio и Aminosol) върху антиоксидантния капацитет на невен (*Calendula officinalis* L.). Използването на биоторове има значителен положителен ефект върху биометричните и антиоксидантните параметри. Добавянето на естествени биоактиватори АВ или АS към растенията, торени с органични торове или оборски тор, не води до значителни промени в биометричните показатели на цветовете. Най-високото съдържание на каротеноиди е регистрирано при растения, наторени само с Biopromoter и в комбинация с двата естествени биоактиватора. Когато растенията се подхранват с оборски тор в комбинация с двата естествени биоактиватора, се измерва най-високото съдържание на феноли, флавоноиди и водоразтворими метаболити с антиоксидантен капацитет.

8. **Hristozkova M.**, Gigova L., Geneva M., Stancheva I, Velikova V., Marinova G. (2018) Influence of mycorrhizal fungi and microalgae dual inoculation on basil plants performance. *Gesunde Pflanzen* Q3 IF=0,789
DOI:10.1007/s10343-018-0420-5

Zusammenfassung

Die Mikrobengemeinschaft im Wurzelraum ist ein Komplex aus Organismen, die auf verschiedenste Weise miteinander verbunden sind, miteinander in Wechselwirkung stehen und auf ihre Umgebung reagieren. In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss der Doppelinokulation mit Arbuskulären Mykorrhizapilzen (AMF) und Mikroalgen (*Scenedesmus incrassatulus* R83 und *Synechocystis* sp. R10) auf die Leistung von Basilikumpflanzen untersucht. Unterschiedliche Arten der Inokulation von Basilikum (AMF, Mikroalgen sowie eine Kombination aus beiden) wurden analysiert. Charakterisiert wurden die Funktion von AMF (Kolonisierung und Glomalin-verwandte Bodenproteine), die Aktivität saurer Phosphatase (in Wurzeln und im Boden), das Pflanzenwachstum, Photosyntheseparameter, sekundäre Metaboliten (Fluoreszenznachweis des Chlorophyllgehalts der Blätter, Flavonolgehalt, Stickstoffbilanz-Index) sowie die Aktivität von Pflanzenenzymen in der Verbindung des Stickstoff- und des Kohlenstoffmetabolismus (Glutamatsynthese, Aspartat-Aminotransferase und NADP-abhängiges Malatenzym). Die höchsten Werte dieser biometrischen Daten resultierten aus der Anwendung von Mykorrhiza allein sowie aus der gemischten Behandlung mit beiden Mikroalgenstämmen. Die doppelte Inokulation mit beiden Mikroalgen und AMF stimulierte die Mykorrhizafunktion (Konzentration Glomalin-verwandter Proteine). Die Indizes sekundärer Metaboliten (Flavonole und Anthocyane) stiegen nach der Behandlung mit *Scenedesmus* (A11 und AM+A11) im Vergleich mit Kontrollpflanzen. Die Zugabe von *Synechocystis* allein und in Kombination mit Pilzen hatte einen positiven Einfluss auf den Stickstoffbilanz-Index. Unterschiedliche Arten der Inokulation erhöhten Gasaustauschparameter in allen Variationen im Vergleich zu den Kontrollpflanzen. Die Ergebnisse zur Aktivität von Stickstoff-Kohlenstoff metabolisierenden Enzymen zeigten einen engen Zusammenhang mit dem Pflanzenwachstum. Die Wurzelbesiedelung von Basilikum mit Mykorrhiza könnte von beträchtlicher wirtschaftlicher Bedeutung sein. So würde die Zugabe geeigneter AMF in den Wurzelraum signifikant das Wachstum und die Produktivität im kommerziellen Anbau von *Ocimum spp.* verbessern.

РЕЗЮМЕ

Микробната общност в ризосферата е комплекс от организми, свързани и взаимодействащи, както помежду си, така и с околната среда. В настоящото изследване е проучено влиянието на двойното инокулиране с арбускуларни микоризни гъби (АМГ) и микроводорасли (*Scenedesmus incrassatulus* R83 и *Synechocystis* sp. R10) върху производителността на босилек. Бяха анализирани различни видове инокулиране на босилек (АМГ, микроводорасли и комбинация от двете). Изследвана беше функцията на АМГ (колонизация и свързани с гломалин почвени протеини), киселинна фосфатазна активност (в корени и почва), натрупване на биомаса, параметри на фотосинтезата, флуоресцентно засичане на съдържанието на хлорофил в листата, съдържание на флавоноли, индекс на азотен баланс и активността на растителните ензими свързващи метаболизма на азота и въглерода (глутамат синтаза, аспартат аминотрансфераза и NADP-зависим малатен ензим). Най-високите стойности на биометричните данни са резултат от прилагането на микориза самостоятелно и от смесеното третиране с двата щам микроводорасли. Двойната инокулация с микроводорасли и АМГ стимулира микоризната функция, изразена чрез концентрацията на гломалин. Индексите на вторичните метаболити (флавоноли и антоцианини) се повишават след третиране със *Scenedesmus* (A11 и АМ A11) в сравнение с контролните растения. Добавянето на *Synechocystis* самостоятелно и в комбинация с гъби оказва положително влияние върху индекса на азотен баланс. Различните видове инокулации повишават параметрите на газообмена във всички варианти в сравнение с контролните растения. Резултатите от активността на ензимите, метаболизиращи азота и въглерода, показват тясна връзка с растежа на растенията. Кореновата колонизация на босилек с микориза може да бъде от значително икономическо значение. По този начин добавянето на подходящ щам АМГ в зоната на корените би подобрило значително растежа и производителността при търговско отглеждане на *Ocimum* spp.

9. Zayova E., Stancheva I., Geneva M., **Hristozkova M.**, Dimitrova L., Petrova M., Sichanova M, Salamon I, Mudroncekova S. Arbuscular mycorrhizal fungi enhance antioxidant capacity of *in vitro* propagated garden thyme (*Thymus vulgaris* L.). (2018) *Symbiosis*, 74 (3) 177-187, DOI 10.1007/s13199-017-0502-7, SJR:0.6, ISI IF=2,009 Q1

ABSTRACT

Garden thyme (*Thymus vulgaris* L., Lamiaceae) is an important aromatic herb used for its medicinal values including antioxidant and antimicrobial properties. The present study was performed to analyze the changes in natural antioxidants after inoculation of *in vitro* propagated garden thyme plants with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). An efficient and low-cost protocol for large-scale multiplication of this aromatic plant was developed. The explants were cultured on full and half strength Murashige and Skoog (MS) medium containing indole-3-butyric acid (IBA). The maximum number of shoots and roots was obtained on ½ MS medium supplemented with 0.1 mg L⁻¹ IBA after 4 weeks of culture. The successfully adapted *in vitro* plants (survival rate 95%) were inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi (*Claroideoglossum claroideum*, ref. EEZ 54). Plants were then transferred into field conditions. Mycorrhizal fungi enhanced the activity of some soil enzymes, acid and alkaline phosphatase, urease as well as the levels of extractable glomalin-related proteins in plant rhizosphere. Arbuscular mycorrhizal associations with higher plants promote the accumulation of antioxidant metabolites such as phenols and flavonoids and increase the activity of antioxidant enzymes. The

results from the present study suggest enhanced antioxidant capacity of the inoculated *T. vulgaris* plants which was due mainly to increased accumulation of phenolic compounds (total phenols and flavonoids) together with stimulation of the activity of superoxide dismutase (SOD) and guaiacol peroxidase (GPO).

РЕЗЮМЕ

Градинската мащерка (*Thymus vulgaris* L., Lamiaceae) е важна ароматна билка, използвана заради лечебните си стойности, включително антиоксидантни и антимикробни свойства. Настоящото изследване е проведено, за да се анализират промените в естествените антиоксиданти след инокулиране на *in vitro* размножени растения от градинска мащерка с арбускуларни микоризни гъби (АМГ). Разработен е ефективен и евтин протокол за широкомащабно размножаване на това ароматно растение. Експлантите се култивират върху пълна и половин среда Murashige и Skoog (MS) среда, съдържаща индол-3-маслена киселина (ИВА). Максималният брой разклонения и корени се получава на ½ MS среда, допълнена с 0,1 mg L⁻¹ ИВА след 4 седмици култивиране. Успешно адаптираните *in vitro* растения (преживяемост 95%) бяха инокулирани с арбускуларни микоризни гъби (*Claroideoglossum claroideum*, реф. EEZ 54). След това растенията бяха прехвърлени в полеви условия. Микоризните гъби повишават активността на някои почвени ензими, кисела и алкална фосфатаза, уреаза, както и нивата на екстрахируеми гломалин-свързани протеини в растителната ризосфера. Арбускуларните микоризни асоциации с висши растения насърчават натрупването на антиоксидантни метаболити като феноли и флавоноиди и повишават активността на антиоксидантните ензими. Резултатите от настоящото проучване предполагат повишен антиоксидантен капацитет на инокулираните растения *T. vulgaris*, което се дължи главно на повишено натрупване на фенолни съединения (общи феноли и флавоноиди) заедно със стимулиране на активността на супероксид дисмутаза (СОД) и гваякол пероксидаза (ГПО).

10. Zayova E., Geneva M., Stancheva I., Dimitrova L., Petrova M., **Hristozkova M.**, Salamon I. Evaluation of the antioxidant potential of *in vitro* propagated hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) with different plant growth regulators. (2018) Medicinal Plants – International Journal of Phytomedicines and Related Industries, 10 (4) 261-270. Q4 SJR=0,156
doi:10.5958/0975-6892.2018.00044.8

ABSTRACT

An efficient method for the micro propagation of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) has been developed. The plants were cultured on Murashige and Skoog's medium supplemented with 6-benzyl-aminopurine, thidiazuron, zeatin and indole-3butyric acid after four weeks of culture. Maximum numbers of shoots, shoot length, fresh weight and dry weight were established at 1.0 mg/L 6-benzyl-aminopurine and 0.1 mg/L indole-3-butyric acid. For induction of root, uniform micro shoots were excised and transferred to the rooting medium (half strength Murashige and Skoog medium macro and microelements) supplemented with 0.1 mg/L indole-3-butyric acid and 20 g/L sucrose. Indole-3-butyric acid increased culture rooting, number of roots and root length more efficiently at 0.1 mg/L after four weeks of culture. The multiple plants were successfully ex vitro adapted with 90% survival. The described protocol allows the establishment of numerous micro propagated plants of *H. officinalis*. The used growth regulators for hyssop micro propagation influenced plant antioxidant system. Antioxidant defence of micropropagated *H. officinalis* determined by the activities of

antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase, ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase) resulted in higher shoot formation and increasing of shoot number per explant.

РЕЗЮМЕ

Разработен бе ефективен метод за микроразмножаване на исоп (*Hyssopus officinalis* L.). Растенията се култивират в среда на Murashige и Skoog, допълнена с 6-бензил-аминопурин, тидиазурон, зеатин и индол-3-маслена киселина след четири седмици култивиране. Максимален брой разклонения, тяхната дължина, свежо и сухо тегло са установени при 1,0 mg/L 6-бензил-аминопурин и 0,1 mg/L индол-3-маслена киселина. За индуциране на корен, еднакви разклонения бяха отрязани и прехвърлени в средата за вкореняване (½ Murashige и Skoog), допълнена с 0,1 mg/L индол-3-маслена киселина и 20 g/L захароза. Индол-3-маслената киселина повишава вкореняването на културата, броя и дължината на корените по-ефективно при 0,1 mg/L след четири седмици култивиране. Размножените растения бяха успешно *ex vitro* адаптирани с 90% преживяемост. Описаният протокол позволява създаването на множество микроразмножени растения *H. officinalis*. Използваните регулатори на растежа за микроразмножаване на исоп повлияват антиоксидантната система на растенията. Антиоксидантната защита на микроразмножен *H. officinalis* е определена от активностите на ензимите супероксид дисмутаза, каталаза, аскорбат пероксидаза и гваякол пероксидаза. При тези растения се образуват по-голям брой разклонения и експланти.

11. **Hristozkova M., Geneva M., Stancheva I., Velikova V. (2017).** LED spectral composition effects on mycorrhizal symbiosis formation with tomato plants. *Applied Soil Ecology* 120: 189–196 Q1 IF=2,916; doi:10.1016/j.apsoil.2017.08.010
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0929139317304031>

ABSTRACT

The present study discusses physiological and biochemical nature of relationships between below- and aboveground processes affected by three different lights spectra. Our objective was to characterize the effect of light quality on *Solanum lycopersicum* L. by determination of the mycorrhizal function, soil enzyme activities and plant performance (growth, photosynthesis, secondary metabolites and the enzymes linking nitrogen and carbon metabolism). A growth chamber experiment was conducted with young tomato plants and the light was provided by fluorescent tubes (white light, WL) and computer controlled light system that combines four lamps with 4 cm² arrays of red, green, blue, amber LEDs. The combinations were RB (Red 66%, Blue 33%) and RG (Red 66%, Green 33%). Under WL mycorrhizal fungi promoted soil fertility increasing enzyme activities and this was linked to the higher plant biomass accumulation. Also, we found the same upward trend between the values of root and soil alkaline phosphatase together with acid root phosphatase activity and accumulation of flavonoids in leaves. RB light stimulated shoot biomass production and gas-exchange parameters in inoculated tomatoes. The enhancement of soil urease activity, mycorrhizal development and nitrogen content in the leaves in parallel with nitrate reductase activity were as a consequence of RG lightening. Plant responses to the light quality and quantity precise manipulation and inoculation with beneficial soil microorganisms could be perspective in extending the production economic efficiency and nutrition potential of vegetables grown in controlled environments.

РЕЗЮМЕ

Настоящото изследване обсъжда физиологичната и биохимична природа на взаимоотношенията между подпочвените и надземните процеси, под влияние на три различни светлинни спектъра. Нашата цел беше да характеризираме ефекта от качеството на светлината върху *Solanum lycopersicum* L. чрез определяне на микоризната функция, активността на почвените ензими и производителността на растенията (растеж, фотосинтеза, вторични метаболити и ензимите, свързващи метаболизма на азота и въглерода). Проведен бе експеримент в камера за растеж с млади домати растения, а светлината беше осигурена от флуоресцентни тръби (бяла светлина, WL) и компютърно контролирана светлинна система, която комбинира четири лампи с 4 cm² масиви от червени, зелени, сини светодиоди. Комбинациите бяха RB светлина (червена 66% и синя 33%) и RG светлина (червена 66% и зелена 33%). При WL микоризните гъби насърчават плодородието на почвата, повишавайки ензимните активности и това е свързано с по-високото натрупване на растителна биомаса. Също така открихме същата възходяща тенденция между стойностите на алкалната фосфатаза в корена и почвата заедно с активността на киселата коренова фосфатаза и натрупването на флавоноиди в листата. RB светлината стимулира производство на надземна биомаса и параметрите на газообмен в инокулирани домати. Повишаването на уреазната активност на почвата, развитието на микориза и съдържанието на азот в листата, успоредно с активността на нитрат редуктазата, са следствие от RG осветяване. Реакцията на растенията към прецизната манипулация на качеството и количеството на светлината и инокулирането с полезни почвени микроорганизми може да бъде перспектива за разширяване на икономическата ефективност на производството и хранителния потенциал на зеленчуците, отглеждани в контролирана среда.

12. **Hristozkova M.**, Gigova L., Geneva M., Stancheva I., Vasileva I., Sichanova M., Mincheva J. (2017). Mycorrhizal fungi and microalgae modulate antioxidant capacity of basil plants. *Journal of Plant Protection Research* 57(4), 417–426. Q2 SJR=0,438
doi:10.1515/jppr-2017-0057

ABSTRACT

Mycorrhizal fungi, algae and cyanobacteria are some of the most important soil microorganisms and major components of a sustainable soil-plant system. This study presents for the first time evidence of the impact of green alga and cyanobacterium solely and in combination with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) on plant-antioxidant capacity. In order to provide a better understanding of the impact of AMF and soil microalgae on *Ocimum basilicum* L. performance, changes in the pattern and activity of the main antioxidant enzymes (AOEs), esterases and non-enzymatic antioxidants including phenols, flavonoids, ascorbate, and α -tocopherols were evaluated. The targeted inoculation of *O. basilicum* with AMF or algae (alone and in combination) enhanced the antioxidant capacity of the plants and the degree of stimulation varied depending on the treatment. Plants in symbiosis with AMF exhibited the highest antioxidant potential as was indicated by the enhanced functions of all studied leaf AOEs: 1.5-, 2- and more than 10-fold rises of superoxide dismutase (SOD), glutathione-S-transferase (GST) and glutathione reductase (GR), respectively. The greatest increase in the total esterase activity and concentration of phenols, flavonoids and ascorbate was marked in the plants with simultaneous inoculation of mycorrhizal fungi and the green algae. 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) free radical scavenging method and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay proved the increased plant antioxidant capacity after co-colonization of green algae and mycorrhizae.

РЕЗЮМЕ

Микоризните гъби, водораслите и цианобактериите са едни от най-важните почвени микроорганизми и основни компоненти на една устойчива система почва-растение. Това проучване представя за първи път доказателства за въздействието на зелените водорасли и цианобактериите самостоятелно и в комбинация с арбускуларни микоризни гъби (АМГ) върху антиоксидантния капацитет на растенията. За да се установи въздействието на АМГ и почвените микроводорасли върху производителността на *Ocimum basilicum* L. бяха изследвани, промените в модела и активността на основните антиоксидантни ензими (АОЕ), естерази и неензимни антиоксиданти, включително феноли, флавоноиди, аскорбат, и α -токофероли. Инокулацията на *O. basilicum* с АМГ или водорасли (самостоятелно и в комбинация) повишава антиоксидантния капацитет на растенията и степента на влияние варира в зависимост от третирането. Растенията в симбиоза с АМГ показват най-висок антиоксидантен потенциал, както е показано от подобрените функции на всички изследвани листни АОЕ: 1,5-, 2- и повече от 10-кратно повишаване съответно на супероксид дисмутаза (СОД), глутатион-S-трансфераза (ГСТ) и глутатион редуктаза (ГР). Най-голямо увеличение на общата естеразна активност и концентрацията на феноли, флавоноиди и аскорбат се наблюдава при растенията с едновременна инокулация на микоризни гъби и зелени водорасли. 2,2-дифенил-1-пикрил-хидразил (DPPH) метод за улавяне на свободните радикали и анализ на желязо-редуцираща антиоксидантна сила (FRAP) доказаха повишения антиоксидантен капацитет на растенията след съвместна колонизация на зелени водорасли и микориза.

13. Stancheva I., Geneva M., **Hristozkova M.**, Sichanova M., Donkova R., Petkova G., Djonova E. (2017). Response of *Vigna unguiculata* grown under different soil moisture regimes to the dual inoculation with nitrogen fixing bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 48(12) 1378-1386. Q2 IF=0,54
doi:10.1080/00103624.2017.1358740

ABSTRACT

The interaction between legumes, rhizobial and arbuscular mycorrhizal (AM) partners benefits plant nutrition and improves plant tolerance to water stress. The present research evaluated the effectiveness of symbioses between cowpea plants (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), AM fungi (*Glomus intraradices*) and two strains of *Bradyrhizobium japonicum* on the mycorrhization, acid phosphatase activity (APase), enzymes related to nitrogen fixation and assimilation, and biomass accumulation at three soil moisture levels. The results revealed that the soil moisture optimal for the formation of active symbiotic associations in cowpea cultivation was about 60% water-holding capacity (WHC), where both *Bradyrhizobium* strains and AM fungi function well with respect to mycorrhization, nitrogen and phosphorus uptake, nitrogen fixation and plant biomass production. Under conditions of reduced water supply, the symbiotic association between *Br. japonicum*-273 and *Gl. intraradices* was better for cowpea cultivation, while in elevated soil moisture association between *Br. japonicum*-269 and *Gl. intraradices* was more appropriate.

РЕЗЮМЕ

Взаимодействието между бобови растения, ризобиялни бактерии и арбускуларни микоризни (АМ) партньори е от полза за храненето на растенията и подобрява толерантността на растенията към водния стрес. Настоящото изследване прави оценка ефективността на симбиозите между папуда (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), АМ гъби (*Glomus intraradices*) и два щамове на *Bradyrhizobium japonicum* върху микоризацията, активността на киселинната фосфатаза (КФ), ензимите, свързани с фиксирането на азот и асимилация и натрупване на биомаса при три нива на влажност на почвата. Резултатите показват, че влажността на почвата, оптимална за образуването на активни симбиотрофни асоциации при отглеждането на папуда, е около 60% капацитет за задържане на вода (WHC), където както щамовете *Bradyrhizobium*, така и АМ гъбите функционират успешно по отношение на микоризацията, усвояването на азот и фосфор, азот фиксиране и производство на растителна биомаса. В условията на намалено съдържание на вода, симбиозата между *Br. japonicum*-273 и *Gl. intraradices* е по-благоприятно за отглеждане на папуда, докато при повишена влажност на почвата асоциацията между *Br. japonicum*-269 и *Gl. intraradices* беше по-подходящо.

14. **Hristozkova M.**, Stancheva I., M. Geneva, M. Boychinova (2017). Comparison of several arbuscular mycorrhizal fungi and sweet marjoram (*Origanum majorana* L.) symbiotic associations in heavy metal polluted soil. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 23(3) 436–442. Q3 SJR=0,262 <http://www.agrojournal.org/23/03-12.pdf>

ABSTRACT

Mycorrhizal fungi participated in plant nutrient assimilation, root development and metal absorption from the soil depending on the resistance and stress tolerance of the involved strain. The overview of several mycorrhizal and marjoram symbiotic associations represented the effect of the studied stress over different strains and their interactions with the plants. We tested four mycorrhizal isolates, derived from various rhizospheres: *Claroideoglomus claroideum* (Cc1), *Rhizophagus clarum*, *Claroideoglomus claroideum* (Cc2), *Funneliformis mosseae*. In order to get insight into the role of mycorrhizal symbiosis in protecting *Origanum majorana* L. against the excess of metals (Cd and Pb), we investigated growth, uptake and distribution of heavy metals in the plant parts, mycorrhizal colonization status, glomalin-related soil proteins and acid phosphatase activity (in root and soil). Pb and Cd partitioning in non-mycorrhizal plants were soil>shoots>root while in symbiotic associations variants changed to soil>root>shoots. Bio concentration factor (BCF) and translocation factor (TF) values confirmed by the less heavy metals shoot uptake in inoculated than control plants. The root dry weight increased in plants inoculated with *C. claroideum* strain (Cc1), which is isolated from industrially metal-contaminated sites. The highest shoot biomass correlated with the percentage of mycorrhization, relative mycorrhizal dependency, glomalin production and acid phosphatase activity was determined by *C. claroideum* (Cc2) and *Funneliformis mosseae*. Both strains derived from natural metalliferous sites. The findings in this study are essential to get the most benefits of mycorrhizal association in unfavorable conditions connected with plant development and herbal products free of harmful ingredients.

РЕЗЮМЕ

Микоризните гъби участват в асимилацията на хранителните вещества в растенията, развитието на корените и абсорбцията на метали от почвата в зависимост от устойчивостта и толерантността към стрес на участващия щам. Прегледът на няколко симбиотични асоциации на микориза и майорана представя ефекта от изследвания стрес върху различни щамове и техните взаимодействия с растенията. Тествахме четири микоризни изолата, получени от различни ризосфери: *Claroideoglomus claroideum* (Cc1), *Rhizophagus clarum*, *Claroideoglomus claroideum* (Cc2), *Funneliformis mosseae*. За да разберем ролята на микоризната симбиоза в защитата на *Origanum majorana* L. срещу излишъка от метали (Cd и Pb), ние изследвахме растежа, усвояването и разпределението на тежки метали в частите на растението, състоянието на микоризната колонизация, съдържанието на гломалин в почвата и киселата фосфатазна активност (в корени и почва). Разпределението на Pb и Cd в немикоризните растения беше почва>надземни части>корен, докато в симбиотичните асоциации вариантите се промениха в следния ред почва>корен>надземни части. Стойностите на фактора на биоконцентрация (BCF) и фактора на транслокация (TF) бяха потвърдени от по-малкото усвояване на тежки метали от надземните части в инокулираните в сравнение с контролните растения. Сухото тегло на корена се увеличава в растенията, инокулирани с щам *C. claroideum* (Cc1), който е изолиран от почва индустриално замърсена с метали. Най-високата биомаса на надземните части, корелира с процента на микоризация, относителната микоризна зависимост, производството на гломалин и активността на киселата фосфатаза, бяха определени във вариантите, инокулирани с *C. claroideum* (Cc2) и *Funneliformis mosseae*. И двата щамове произлизат от естествени металоносни находища. Констатациите в това проучване са от съществено значение за получаване на най-много ползи от микоризната асоциация при неблагоприятни условия, свързани с развитието на растенията и получаване на билкови продукти без вредни съставки.

15. **Hristozkova M.**, Geneva M., Stancheva I., Iliev I. (2017) Symbiotic association between golden berry (*Physalis peruviana* L.) and arbuscular mycorrhizal fungi in heavy metal-contaminated soil. *Journal of Plant Protection Research* 57(2) Q2 SJR=0,438
doi:10.1515/jppr-2017-0024

ABSTRACT

Physalis peruviana is one of the most promising tropical fruit plants because of its rapid growth, high yield, and nutritional quality. This study was designed to investigate plant development under heavy metal contamination (Cd, Pb) and responsiveness to arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) colonization by *Rhizophagus clarum* and *Claroideoglomus claroideum*. The antioxidant capacity, total lipid content and fatty acid profile in fruits, accumulation of Cd and Pb in different plant parts, plant dry biomass, and mycorrhizal colonization were determined. As a result of inoculation, a considerable reduction in Cd and Pb in the fruits was observed, compared with non-inoculated plants. The fruit number and dry weight increased in plants associated with *C. claroideum*. These plants also showed higher acid phosphatase activity, root protein accumulation and glomalin production. The type of antioxidant defense was AMF strain-dependent. Antioxidant activity and H₂O₂ neutralization were enzymatic rather than non-enzymatic processes in the fruits of *C. claroideum* plants compared with those forming an association with *R. clarum*. Mycorrhizal establishment changed the composition and concentration of fruits' fatty acids. The ratio of unsaturated fatty acids was increased. With respect to the

accumulation of bioactive compounds in golden berry the present findings are important for obtaining the optimum benefits of mycorrhizal association under unfavorable conditions.

РЕЗЮМЕ

Physalis peruviana е едно от най-обещаващите тропически овощни растения поради бързия си растеж, високия добив и хранителните си качества. Това проучване е предназначено да изследва развитието на растенията при замърсяване с тежки метали (Cd, Pb) и реакцията към колонизация на арбускуларни микоризни гъби (АМГ)-*Rhizophagus clarum* и *Claroideoglossum claroideum*. Изследвани бяха антиоксидантният капацитет, общото съдържание на липиди и профила на мастни киселини в плодовете, натрупването на Cd и Pb в различни части на растенията, сухата растителна биомаса и микоризната колонизация. В резултат на инокулацията се наблюдава значително намаляване на Cd и Pb в плодовете в сравнение с неинокулираните растения. Броят на плодовете и сухото тегло се увеличават при растенията, свързани с *C. claroideum*. Тези растения също показват по-висока активност на киселинната фосфатаза, натрупване на протеини в корените и производството на гломалин. Типът антиоксидантна защита зависи от АМГ щама. Антиоксидантната активност и неутрализирането на H₂O₂ са по-скоро ензимни, отколкото неензимни процеси в плодовете на растенията инокулирани с *C. claroideum* в сравнение с тези, които образуват симбиоза с *R. clarum*. Установяването на микоризни симбиози променя състава и концентрацията на мастните киселини в плодовете. Съотношението на ненаситените мастни киселини се увеличава. По отношение на натрупването на биоактивни съединения във физалис, настоящите открития са важни за получаване на оптимални ползи от микоризната асоциация при неблагоприятни условия.

16. Mitova I., Nenova L., Stancheva I., Geneva M., **Hristozkova M.**, Mincheva J. (2017) Lettuce response to nitrogen fertilizers and root mycorrhization. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 23 (2): 260–264 Q3 SJR=0,262

doi:<https://www.agrojournal.org/23/02-13.pdf>

ABSTRACT

Two lettuce varieties Ysi 43301/5638 (green lettuce) and Matador 5635 (red lettuce) plants were grown as a spring crop under glasshouse conditions in order to evaluate the effect of different synthetic nitrogen fertilizers applied solely and in combination with mycorrhizal fungi on the yield and quality. Mineral nitrogen was applied as NH₄NO₃, CO(NH₂)₂, Ca(NO₃)₂ and (NH₄)₂SO₄ and an inoculum of arbuscular mycorrhizal fungi, *Glomus intraradices* EEZ 01 was used. The effect of mycorrhizal inoculation on plant biomass more clearly distinguished in variety Ysi 43301/5638, where biomass accumulation significantly increased in the treatments with CO(NH₂)₂, Ca(NO₃)₂ and (NH₄)₂SO₄ in combination with *Gl. intraradices*. The most favorable effect on the plant biomass of the other variety Matador 5635 was observed in plants inoculated with *Gl. intraradices* and fertilized with (NH₄)₂SO₄. Deterioration of lettuce quality (reduction of protein content, soluble sugars and increased nitrate content) was observed in Ysi 43301/5638 in the treatments with urea in combination with mycorrhizal fungi. The strong reduction in the values of pigments also in both varieties was estimated as a result of fertilization with urea in non-mycorrhizal and mycorrhizal treatments. The interactive action of nitrogen assimilatory enzymes - nitrate reductase and glutamine synthetase are not in accordance with biomass accumulation.

РЕЗЮМЕ

Два сорта маруля Ysi 43301/5638 (зелена маруля) и Matador 5635 (червена маруля) са отглеждани като пролетна култура в оранжерийни условия, за да се оцени влиянието на различни синтетични азотни торове, прилагани самостоятелно и в комбинация с микоризни гъби върху добива и качеството на продукцията. Минералният азот се прилага като NH_4NO_3 , $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ и $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и се използва инокулум от арбускуларни микоризни гъби, *Glomus intraradices* EEZ 01. Положителният ефект на микоризната инокулация върху натрупването на растителна биомаса е по-ясно разграничен в сорт Ysi 43301/5638 и значително се увеличава при третирането с $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ и $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в комбинация с *Gl. intraradices*. Най-благоприятен ефект върху растителната биомаса при сорт Matador 5635 се наблюдава в резултат на инокулиране с *Gl. intraradices* и наторени с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Влошаване на качеството на марулята (намаляване на съдържанието на протеини, разтворими захари и повишено съдържание на нитрати) се наблюдава в Ysi 43301/5638 при третиране с урея в комбинация с микоризни гъби. Значителното намаляване стойностите на пигментите и при двата сорта е наблюдавано в резултат на торене с урея при наличие и липса на микоризно инокулиране. Действието на азотасимилиращите ензими - нитратредуктаза и глутамин синтетаза не е в съответствие с натрупването на биомаса.

17. **Hristozkova M.**, Geneva M., Stancheva I., Boychinova M., Djonova E. (2016) Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in attenuation of heavy metal impact on *Calendula officinalis* development. *Applied Soil Ecology* 101:57-63 Q1 IF=2,786
doi:10.1016/j.apsoil.2016.01.008
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0929139316300087>

ABSTRACT

The mycorrhizal fungi community is a significant soil rhizosphere component that benefits plant nutrition and improve plant tolerance to abiotic stresses. The present research compared the influence of three mycorrhizal strains over pot marigold (*Calendula officinalis* L.) development and their contribution to promoting the valuable secondary metabolites accumulation in the condition of heavy metal (Cd and Pb) pollution. Two *Claroideoglomus claroideum* isolates (from industrially and naturally enriched metal-contaminated sites) and *Funneliformis mosseae* (derived from a soil with a high concentration of various metals) were studied. The mycorrhizal status and acid phosphatase activity were best exposed in the roots associated with *C. claroideum* (from native metalliferous sites) and corresponded with the highest total phenols and flavonoids concentrations. Neither Pb nor Cd was detected in the marigold flowers (*Calendula flos drug*) following targeted mycorrhizal treatment. The higher Cd and Pb levels in non-mycorrhizal plants lead to the lowest flower weight, but in the aerial plant parts, we found a slight distinction. The tested strains stimulated the accumulation of important secondary metabolites (total phenols, flavonoids, carotenoids) in pot marigold flowers and, therefore, enhanced the antioxidant capacity. The carotenoid profile of mycorrhizal plants performed notable differences between the primarily defined constituents (lutein, lycopene, β -carotene). The highest β -carotene values (respectively vitamin A) and lycopene were found in pot marigold—*F. mosseae* association. The findings are essential to obtain the optimum benefits of mycorrhizal association in unfavorable conditions concerning pot marigold bioactive compounds synthesis.

РЕЗЮМЕ

Съобществото на микоризните гъби е важен компонент на почвената ризосфера, в полза за храненето на растенията и подобряване толерантността на растенията към абиотичен стрес. Настоящото изследване сравнява влиянието на три микоризни щама върху развитието на невен (*Calendula officinalis* L.) и техния принос за стимулиране натрупването на ценни вторични метаболити в условията на замърсяване с тежки метали (Cd и Pb). Изследвани са два изолата на *Claroideoglosum claroideum* (от почви, промишлено и естествено обогатени с метали) и *Funneliformis mosseae* (изолиран от почва с висока концентрация на различни метали). Микоризният статус и активността на киселата фосфатаза са най-добре представени в корените, свързани с *C. claroideum* (от естествени металоносни почви) и съответстват на най-високите общи концентрации на феноли и флавоноиди. Нито Pb, нито Cd бяха открити в извлек от цветовете на невен след третиране с микориза. По-високите нива на Cd и Pb в немикоризните растения водят до най-ниското тегло на цветовете, но в надземните растителни части открихме малка разлика. Тестваните щамове стимулират натрупването на важни вторични метаболити (обща феноли, флавоноиди, каротеноиди) в цветовете на невен и следователно повишават антиоксидантния капацитет. Каротеноидният профил на микоризните растения показва значителни разлики между първоначално дефинираните съставки (лутеин, ликопен, β -каротин). Най-високите стойности на β -каротин (съответно витамин А) и ликопен са открити във варианти на невен инокулиран с *F. mosseae*. Константите са от съществено значение за получаване на оптимални ползи от микоризната асоциация при неблагоприятни условия по отношение на синтеза на биоактивни съединения от невен.

18. Vassilevska-Ivanova R., Shtereva L., Stancheva I., Geneva M., **Hristozkova M.** (2016) Determination of the antioxidant capacity of *Sideritis scardica* specimens collected at different regions in Bulgaria. *Comptes Rendus de l'Academie Bulgare des Sciences* 69(10) Q3 IF=0,251

doi: http://www.proceedings.bas.bg/cgi-bin/mitko/0DOC_abs.pl?2016_a_08

ABSTRACT

Antioxidant capacity of leaves and flower extracts of *Sideritis scardica* was determined by the DPPH[•] (free radicals scavenging activity) and FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) assays, total phenolics and flavonoids content, and the level of water-soluble (WS-AOC) antioxidant capacity, expressed as equivalents of ascorbate. The results revealed that antioxidant capacity of leaves and flowers extracts from wild *S. scardica* grown at peak Alibotush (Slavyanka Mountains) was much higher than other herbal samples. Also, a difference greater than 6-fold among the total antioxidants measured by FRAP in the wild growing *S. scardica* flowers harvested in two different locations of Slavyanka Mountains (specimen 7 and 8) was found; a similar trend was observed in the total antioxidant capacity assessed by DPPH where the difference was about two-fold. Out of all studied specimens, plants harvested from Alibotush Peak (Slavyanka Mountains) was differentiated based on the high measured FRAP, DPPH and phenolic and flavonoids content in comparison with the same parameters of seven other specimens. Great differences in total phenolic and flavonoids content (up to several times between separate specimens) always corresponded to the same differences in FRAP and DPPH measured. The results suggested that both leaves and flowers from *S. scardica* have a high level

of ascorbic acid and, therefore, they might be used by native people in the traditional way of intake of plant-derived antioxidants such as herbal infusions rich in vitamin C.

РЕЗЮМЕ

Антиоксидантният капацитет на екстракти от листа и цветове на *Sideritis scardica* бе определен чрез DPPH (активност на улавяне на свободните радикали) и FRAP (желязо-редуцираща антиоксидантна сила) анализи, както и общото съдържание на феноли и флавоноиди и нивото на водоразтворим (WS-AOC) антиоксидантен капацитет, изразен като еквиваленти на аскорбат. Резултатите показват, че антиоксидантният капацитет на екстракти от листа и цветове от диворастящ *S. scardica*, произхождащ от връх Алиботуш (Славянка), е много по-висок от други проби. Също така беше открита разлика, по-голяма от 6 пъти между общите антиоксиданти, измерени чрез FRAP в цветове на диворастящи растения *S. scardica*, събрани на две различни места в планината Славянка (образец 7 и 8); подобна тенденция се наблюдава в общия антиоксидантен капацитет, оценен от DPPH където разликата беше около два пъти. От всички изследвани екземпляри, растенията, събрани от връх Алиботуш (Славянка), бяха диференцирани въз основа на високите стойности на FRAP, DPPH и съдържание на феноли и флавоноиди в сравнение със същите параметри на седем други екземпляра. Големите разлики в общото съдържание на феноли и флавоноиди (до няколко пъти между отделни екземпляри) винаги съответстват на същите разлики в измерените показатели FRAP и DPPH. Резултатите предполагат, че както листата, така и цветовете на *S. scardica* имат високо ниво на аскорбинова киселина и следователно могат да се използват от местните хора при традиционния начин за прием на растителни антиоксиданти, като билкови отвари, богати на витамин C.

19. **Hristozkova M.**, Geneva M., Stancheva I., Boychinova M., Djonova E. (2015) Aspects of mycorrhizal colonization in adaptation of sweet marjoram (*Origanum majorana* L.) grown on industrially polluted soil. *Turkish Journal of Biology* 39:461-468 Q2 IF=1,183
doi:10.3906/biy-1408-47

ABSTRACT

The current study reveals the effects of mycorrhization on heavy metal uptake and accumulation, antioxidant potential, and essential oil composition of *Origanum majorana* L., grown on soil polluted with industrial Cd and Pb. Two strains of *Claroideoglossum claroideum* (EEZ 54 and EEZ 55) were isolated from soil that is naturally rich in metals. EEZ 35 (*Funneliformis mosseae*) was isolated from a place with industrial contamination. The percentage of mycorrhizal colonization with the EEZ 54 strain was higher than those of the other strains; there was no significant difference between EEZ 55 and EEZ 35. The highest value of the total identified essential oils was observed in plants inoculated with EEZ 35, where Pb accumulated in the roots. Mycorrhizal colonization led to a change in the content of the main compounds of marjoram essential oil. The EEZ 54 and EEZ 55 strains, isolated from areas with naturally high levels of metals, significantly reduced Pb accumulation in marjoram shoots and roots as compared with nonmycorrhizal plants. Antioxidant activity in marjoram aerial parts increased as a result of inoculation with EEZ 54 and EEZ 35 arbuscular mycorrhizal fungi strains due to the elevated levels of phenolic compounds.

РЕЗЮМЕ

Настоящото проучване разкрива ефектите от микоризацията върху усвояването и натрупването на тежки метали, антиоксидантният потенциал и състава на етерично масло от *Origanum*

majorana L., отгледан върху промишлено замърсена почва с Cd и Pb. Двата щама *Claroideoglossum claroideum* (EEZ 54 и EEZ 55), използвани в проучването са изолирани от почва, която е естествено богата на метали, докато EEZ 35 (*Funneliformis mosseae*) е изолиран от място с промишлено замърсяване. Процентът на микоризна колонизация при шам EEZ 54 е по-висок от този при другите варианти; няма значителна разлика между EEZ 55 и EEZ 35. Най-високата стойност на общите идентифицирани етерични масла се наблюдава при растения, инокулирани с EEZ 35, където Pb се натрупва в корените. Микоризната колонизация доведе до промяна в съдържанието на основните съединения на етеричното масло от майорана. Щамовете EEZ 54 и EEZ 55, изолирани от райони с естествено високи нива на метали, значително намаляват натрупването на Pb в надземните части и корените на майорана в сравнение с немикоризните растения. Антиоксидантната активност в надземните части на майорана се повишава в резултат на инокулирането с EEZ 54 и EEZ 35 арбускуларни микоризни щамове поради повишените нива на фенолни съединения.

20. Stephanie A.F., Hristozkova M., Mainassara Z-A., Schulze J. (2010) Elevated CO₂ concentration around alfalfa nodules increases N₂ fixation. *Journal of Experimental Botany* 61(1):121-130 Q1 IF=5,292

doi:10.1093/jxb/erp287

ABSTRACT

Nodule CO₂ fixation via PEPC provides malate for bacteroids and oxaloacetate for N assimilation. The process is therefore of central importance for efficient nitrogen fixation. Nodule CO₂ fixation is known to depend on external CO₂ concentration. The hypothesis of the present paper was that nitrogen fixation in alfalfa plants is enhanced when the nodules are exposed to elevated CO₂ concentrations. Therefore nodulated plants of alfalfa were grown in a hydroponic system that allowed separate aeration of the root/nodule compartment that avoided any gas leakage to the shoots. The root/nodule compartments were aerated either with a 2500 µl l⁻¹ (+CO₂) or zero µl l⁻¹ (-CO₂) CO₂-containing N₂/O₂ gas flow (80/20, v/v). Nodule CO₂ fixation, nitrogen fixation, and growth were strongly increased in the +CO₂ treatment in a 3-week experimental period. More intensive CO₂ and nitrogen fixation coincided with higher per plant amounts of amino acids and organic acids in the nodules. Moreover, the concentration of asparagine was increased in both the nodules and the xylem sap. Plants in the +CO₂ treatment tended to develop nodules with higher %N concentration and individual activity. In a parallel experiment on plants with inefficient nodules (fix⁻) the +CO₂ treatment remained without effect. Our data support the thesis that nodule CO₂ fixation is pivotal for efficient nitrogen fixation. It is concluded that strategies which enhance nodule CO₂ fixation will improve nitrogen fixation and nodule formation. Moreover, sufficient CO₂ application to roots and nodules is necessary for growth and efficient nitrogen fixation in hydroponic and aeroponic growth systems.

РЕЗЮМЕ

Фиксирането на CO₂ в грудките чрез PEPC осигурява малат за бактериодите и оксалоацетат за асимилация на N. Следователно процесът е от централно значение за ефективната азотфиксация. Известно е, че фиксацията на CO₂ в грудките зависи от външната концентрация на CO₂. Хипотезата на настоящата статия е, че фиксацията на азот в люцерна се засилва, когато грудките са изложени на повишени концентрации на CO₂. Поради това

азотфиксиращите растения люцерна се отглеждат в хидропонна система, която позволява отделно аериране на системата корен/грудки, което избягва всякакво изтичане на газ към надземните части. Системата корен/грудки беше аерирана или с 2500 $\mu\text{l l}^{-1}$ (+CO₂) или нула $\mu\text{l l}^{-1}$ (-CO₂) CO₂-съдържащ N₂/O₂ газов поток (80/20, v/v). Фиксирането на CO₂ от грудките, азотфиксацията и растежа бяха силно увеличени при третиране с +CO₂ в 3-седмичен експериментален период. По-интензивната фиксация на CO₂ и азот съвпада с по-висока концентрация на аминокиселините и органичните киселини в грудките. Освен това концентрацията на аспарагин се повишава както в грудките, така и в ксилемния сок. Растенията при третиране с +CO₂ са склонни да образуват грудки с по-висока концентрация на %N и индивидуална активност. В паралелен експеримент върху растения с неефективни грудки (fix-) третирането с +CO₂ остава без ефект. Нашите данни подкрепят тезата, че фиксирането на CO₂ в грудките е от основно значение за ефективната азотна фиксация. Заключение е, че стратегиите, които подобряват фиксирането на CO₂ в грудките, ще подобрят азотфиксацията и образуването на грудки. Освен това е необходимо достатъчно прилагане на CO₂ към корените и грудките за растеж и ефективна азотфиксация в хидропонни и аеропонни системи за растеж.

21. **Hristozkova M.**, Geneva M., Stancheva I. (2010) Regulation of nitrogen assimilation in foliar fed legume plants at insufficient molybdenum supply D.K. Maheshwari (ed.), Plant Growth and Health Promoting Bacteria, Microbiology Monographs 18, Springer-Verlag Berlin Heidelberg; DOI 10.1007/978-3-642-13612-2_18

ABSTRACT

Formation and function of N₂-fixing systems between bacteria from *Rhizobiaceae* family and legume plants from *Fabaceae* family are especially sensitive to molybdenum (Mo) deficiency. The hypothesis of the present work was that nitrogen fixation and assimilation in Mo deficient pea and alfalfa plants are enhanced when the nutrients were supplied through the foliage. It was established that foliar fertilization resulted in the increase of nitrogen fixation and biomass accumulation in the absence of Mo. The positive effect of foliar fertilization at insufficient Mo supply on the nitrogen uptake is better expressed in garden pea than in alfalfa. Otherwise, alfalfa was more sensitive to Mo starvation than the pea plants. Insufficient Mo supply leads to significant reduction in plant Mo content and nitrogen fixing activity, while stress induced free amino acids increased repeatedly. The negative effect of Mo exclusion from the nutrient media on nitrogen assimilation and biomass accumulation diminished through the foliar absorbed nutrients.

РЕЗЮМЕ

Образуването и функцията на N₂-фиксиращи системи между бактерии от семейство *Rhizobiaceae* и бобови растения от семейство *Fabaceae* са особено чувствителни към дефицит на молибден (Mo). Хипотезата на настоящата работа е, че фиксацията и асимиляцията на азот в растенията грах и люцерна с дефицит на Mo се засилват, когато хранителните вещества се доставят през листата. Установено е, че листното торене води до увеличаване на азотфиксацията и натрупването на биомаса при липса на Mo. Положителният ефект на листното торене при недостатъчно снабдяване с Mo върху усвояването на азот е по-добре изразен при градинския грах, отколкото при люцерната. В противен случай люцерната е по-чувствителна към гладуване на Mo от граховите растения. Недостатъчното снабдяване с Mo води до значително намаляване съдържанието на Mo в растенията и активността на азотфиксацията, докато индуцираните от стрес свободни аминокиселини се увеличават многократно.

Отрицателният ефект от изключването на Мо от хранителната среда върху асимилацията на азот и натрупването на биомаса намалява чрез абсорбираните от листата хранителни вещества.

22. Stancheva I., Geneva M., **Hristozkova M.**, Markovska Y., Salamon I. (2010) Antioxidant capacity of sage grown on heavy metals polluted soil. *Russian Journal of Plant Physiology* 57(6) 799-805 Q3 IF=0,558

doi:10.1134/S1021443710060087

ABSTRACT

Oxidative stress response and essential oil composition of sage (*Salvia officinalis* L.), grown on industrially polluted soil were studied. Sage plants were grown on the soil polluted with Cd, Cu, Pb, Zn, and non-polluted control soil. One-year-old sage possessed a high potential for heavy metal accumulation mainly in the roots. Heavy metal pollution resulted in root and shoot dry biomass inhibition. The increased levels of hydrogen peroxide and MDA showed that the heavy metal uptake caused oxidative stress. The increase towards the control was observed in the levels of glutathione, ascorbate, dehydroascorbate, catalase, dehydroascorbate reductase, and glutathione peroxidase. Weak activities of the most enzymes of the ascorbate-glutathione cycle allowed to suppose that H₂O₂ neutralization is rather non-enzymatic than enzymatic process. Observed decline in α - and β -thujones and elevated camphor content in the sage leaves did not indicate a deterioration of the essential oil quality. Sage grown on heavy metal-polluted soil successfully accumulated cadmium, lead, and zinc, which is resulted in plant biomass inhibition, but essential oil yield and quality was not declined.

РЕЗЮМЕ

В настоящото изследване са проучени отговора към окислителния стрес и състава на етеричното масло от салвия (*Salvia officinalis* L.), отглеждана върху промишлено замърсена почва. Растенията от градински чай се отглеждат върху почва, замърсена с Cd, Cu, Pb, Zn и незамърсена контролна почва. Едногодишната салвия притежава висок потенциал за натрупване на тежки метали главно в корените. Замърсяването с тежки метали води до инхибиране натрупването на суха биомаса в корените и надземните части. Повишените нива на водороден пероксид и MDA показват, че усвояването на тежки метали причинява оксидативен стрес. Повишаването спрямо контролата се наблюдава в нивата на глутатион, аскорбат, дехидроаскорбат, каталаза, дехидроаскорбат редуктаза и глутатион пероксидаза. Слабата активност на повечето ензими от аскорбат-глутатионовия цикъл позволява да се предположи, че неутрализирането на H₂O₂ е по-скоро неензимен, отколкото ензимен процес. Наблюдаваното намаляване на α - и β -туйоните и повишеното съдържание на камфор в листата на салвията не показват влошаване на качеството на етеричното масло. Градински чай, отглеждан върху замърсена с тежки метали почва натрупва кадмий, олово и цинк, което води до инхибиране на растителната биомаса, но добива и качеството на етеричното масло не се влошават.

23. Geneva M., **Hristozkova M.**, Yonova P., Boychinova M., Stancheva I. (2010) Effect of endomycorrhizal colonization with *Glomus intraradices* on growth and antioxidant capacity of *Sideritis scardica* Griseb. *Gen Appl. Plant Physiology*, 36 (1-2), Special issue, part II (47-54).

http://www.bio21.bas.bg/ippg/bg/wp-content/uploads/2011/06/GAPP_v36_1-2_47-54.pdf

ABSTRACT

The effect of *Glomus intraradices* inoculation on the growth and antioxidant activity of mountain tea (*Sideritis scardica* Griseb.) was determined. Two-months-old mountain tea seedlings were grown during 10 weeks on the soil/sand (w/w=3:1) substrate in a glass house. Mycorrhizal colonization improved shoot and root dry biomass accumulation and increased total phenols and flavonoid content. During the period of vegetative growth the level of antioxidant metabolites (ascorbate acid and reduced glutathione) and the antioxidant enzymes guaiacol peroxidase and catalase decreased as a result of the mycorrhizal colonization. A favorable effect of root colonization with *Glomus intraradices* was observed regarding the levels of ascorbate peroxidase and super oxide dismutase. We conclude that inoculation of *Sideritis scardica* Griseb. with *Glomus intraradices* resulted in enhanced plant dry biomass accumulation, but the antioxidant defense was not efficient enough during the period of vegetative growth.

РЕЗЮМЕ

Определен бе ефекта от инокулацията на *Glomus intraradices* върху растежа и антиоксидантната активност на планински чай (*Sideritis scardica* Griseb.). Двумесечен разсад от планински чай се отглежда в продължение на 10 седмици върху субстрат от почва/пясък (w/w=3:1) в оранжерия. Микоризната колонизация подобрява натрупването на суха биомаса от надземни части и корени и увеличи общото съдържание на феноли и флавоноиди. През периода на вегетативен растеж нивото на антиоксидантните метаболити (аскорбат и редуциран глутатион) и антиоксидантните ензими гваякол пероксидаза и каталаза намаляват в резултат на микоризната колонизация. Наблюдава се благоприятен ефект от колонизацията на корена с *Glomus intraradices* по отношение на нивата на аскорбат пероксидаза и супероксид дисмутаза. В заключение, инокулацията на *Sideritis scardica* Griseb. с *Glomus intraradices* доведе до повишено натрупване на суха растителна биомаса, но антиоксидантната защита не беше достатъчно ефективна по време на периода на вегетативен растеж.

24. **Hristozkova M.**, Geneva M., Boychinova M., Stancheva I. (2009). Effect of foliar feeding on growth and nitrogen assimilatory enzymes in alfalfa plants at insufficient molybdenum supply, *Acta Biologica Hungarica* 60 (2) 211-219 Q3 IF=0,551

doi:10.1556/ABiol.60.2009.2.8

ABSTRACT

The influence of foliar feeding on the nitrogen assimilation in alfalfa plants under conditions of Mo shortage was studied. It was established that foliar fertilization with 0.3% solution of Agroleaf® resulted in increase of nitrogen fixation and nitrogen assimilation in the absence of Mo. Insufficient molybdenum supply leads to significant reduction of plant Mo content and nitrogen-fixing activity, while stress induced amino acids as alanine, GABA, threonine, proline and serine increased

repeatedly. The negative effect of Mo deficiency on the enzyme activities related to the primary nitrogen assimilation (NR, GS, GOGAT) and plant growth diminished due to the foliar absorbed nutrients.

РЕЗЮМЕ

Изследвано е влиянието на листното подхранване върху усвояването на азота в люцерна при условия на недостиг на Мо. Установено е, че листното торене с 0,3% разтвор на Agroleaf® води до повишаване на азотната фиксация и азотната асимилация в отсъствието на Мо. Недостатъчното снабдяване с молибден води до значително намаляване съдържанието на Мо в растенията и азотфиксиращата активност, докато аминокиселините натрупаните в резултат от стрес аланин, ГАВА, треонин, пролин и серин се увеличават многократно. Отрицателният ефект от дефицита на Мо върху ензимните активности, свързани с първичната асимилация на азот (НР, ГС, ГОГАТ) и растежа на растенията, намалява поради листно абсорбираните минерални вещества.

25. **Hristozkova M.**, Stancheva I., Geneva M. (2009) Growth and nitrogen fixation of different *Medicago sativa* – *Sinorhizobium meliloti* associations under conditions of mineral elements shortage, *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, Special issue, 23, 225-229. Q4 IF=0,291

doi:10.1080/13102818.2009.10818406

ABSTRACT

Sinorhizobium meliloti is an α -proteobacteria of the family *Rhizobiaceae* that alternates between a free-living phase in soil and a symbiotic phase within the host plant cells, where the bacteria ultimately differentiate into nitrogen-fixing organelle-like cells, called bacteroids. The present study was designed to compare the difference in responses to nitrogen and carbon limitation in free living *Sinorhizobium meliloti* strains and their ability to form symbiotic association with alfalfa (*Medicago sativa*) plants. The effectiveness of observed symbiotic associations was evaluated by number of formed nodules, nitrogen fixing activity, and plant biomass production in control environmental conditions of a growth chamber. A wild type strain *Sinorhizobium meliloti* 1021 and two mutants—*Sinorhizobium meliloti* NitR and *Sinorhizobium meliloti* TspO were used in this research. Both mutant strains were previously created to study the general stress response in *Sinorhizobium meliloti* and its regulation mechanisms. The products of the genes named *tspO* and *nitR*, act either as direct or indirect regulators of gene expression in response to various stresses, including starvation. The up- and down regulated genes under conditions of nitrogen and carbon limitation were identified in free living forms of the three strains. Comparison of the genes differentially expressed in the wild type strain to those found in the *tspO* and *nitR* mutants showed no significant difference. In both starvation conditions the most effective symbiotic system was established between alfalfa and *Sinorhizobium meliloti* TspO, concerning nitrogen fixing capacity and plant biomass production.

РЕЗЮМЕ

Sinorhizobium meliloti е α -протеобактерия от семейство *Rhizobiaceae*, която е както свободно живееща в почвата, така и симбионт с кореновите клетки на растението-гостоприемник, където бактериите в крайна сметка се диференцират в клетки, подобни на азотфиксиращи органели, наречени бактериоиди. Настоящото проучване е предназначено да сравни разликата в отговорите при лимитиране на азота и въглерода в средата на свободно живеещи щамове *Sinorhizobium meliloti* и способността им да образуват симбиотична асоциация с люцерна (*Medicago sativa*). Ефективността на наблюдаваните симбиотични асоциации беше оценена чрез броя на образуваните грудки, активността на азотфиксация и производството на растителна биомаса в контролирани условия на околната среда в камера за растеж. В това изследване са използвани див тип щам *Sinorhizobium meliloti* 1021 и два мутанта - *Sinorhizobium meliloti* NitR и *Sinorhizobium meliloti* TspO. И двата мутантни щама са създадени преди това за изследване на общата реакция на стрес в *Sinorhizobium meliloti* и неговите механизми за регулиране. Продуктите на гените, наречени tspO и nitR, действат като директни или косвени регулатори на генната експресия в отговор на различни видове стрес, включително гладуване. Стимулирането и потискането експресията на гени при условия на лимитиране на азота и въглерода бяха идентифицирани в свободно живеещи форми на трите щама. Сравнението на гените, диференциално експресирани в дивия тип щам с тези, открити в tspO и nitR мутантите, не показва значителна разлика. И при двете условия на глад е установена най-ефективната симбиотична система между люцерна и *Sinorhizobium meliloti* TspO по отношение на капацитета за фиксиране на азот и производството на растителна биомаса.

26. **Hristozkova M.**, Geneva M., Stancheva I. (2008) Effects of *Sinorhizobium meliloti* strains (1021 and NitR) on nitrogen assimilation of alfalfa plants under conditions of mineral elements shortage. *Gen Appl. Plant Physiology* 34(3-4), *Special Issue* 327-338.
http://www.bio21.bas.bg/ipp/gapbfiles/v-34_pisa-08/08_pisa_3-4_327-338.pdf

ABSTRACT

Two *Sinorhizobium meliloti* strains (1021 and NitR) were used for inoculation of alfalfa plants to study nitrogen assimilation under nutrient deficiency conditions in hydroponics experiments. The wild type *Sinorhizobium meliloti* 1021 was compared with a mutant strain – *S. meliloti* NitR. NitR protein was found to be a regulator of *S. meliloti* hmgA expression under nitrogen deprivation conditions, suggesting the presence of a ntr-independent nitrogen deprivation regulatory system. nitR insertion mutations were shown not to affect bacterial growth, nodulation of *Medicago sativa* plants, or symbiotic nitrogen fixation under the physiological conditions examined. The relationship between free living and symbiotic bacterial forms was revealed indirectly by the changes of nitrogen fixation and assimilation under conditions of nutrient deficiencies. Before seeds inoculation, bacteria were cultivated in Vincent minimal media with limited nitrogen source. The alfalfa plants were grown on a nutrient solution in the presence or absence of molybdenum. The differences between the two symbiotic systems were established by the variations of nodule formation and enzyme activities participated in nitrogen fixation and assimilation (nitrogenase – NG: EC 1.7.99.2; glutamine synthetase – GS: EC 6.3.1.2; glutamate synthase – NADH-GOGAT: EC 1.4.1.14 and nitrate reductase – NR-NADH: EC 1.6.6.1). Negative effects of Mo shortage on the rate of nitrogen fixation and nitrate reduction in both symbiotic systems were found. When plants were inoculated with strain *S. meliloti* NitR and grown under nitrogen limiting conditions, the highest stability of nitrogen fixation and nitrogen reduction was determined in conformity with characterization of this mutant strain.

РЕЗЮМЕ

Два щама *Sinorhizobium meliloti* (1021 и NitR) бяха използвани за инокулиране на растения люцерна за изследване на асимилацията на азот при условия на дефицит на хранителни вещества в хидропонни експерименти. Дивият тип *Sinorhizobium meliloti* 1021 беше сравнен с мутантен щам – *S. meliloti* NitR. Установено е, че протеина NitR е регулатор на експресията на *hmgA* при *S. meliloti* в условия на лишаване от азот, което предполага наличието на *ntr*-независима от липсата на азот регулаторна система. Показано е, че мутациите на вмъкване на *nitR* не засягат бактериалния растеж, грудкообразуването на растенията *Medicago sativa* или симбиотичната азотна фиксация при изследваните физиологични условия. Връзката между свободно живеещите и симбиотичните бактериални форми се разкрива косвено от промените във фиксирането на азот и асимилацията при условия на дефицит на хранителни вещества. Преди инокулирането на семената, бактериите се култивират в среда на Vincent с ограничен източник на азот. Люцерната се отглежда върху хранителен разтвор в присъствие или отсъствие на молибден. Разликите между двете симбиотични системи бяха установени чрез вариациите на образуването на грудки и ензимните активности, които участваха във фиксирането и асимилацията на азот (нитрогеназа – NG: EC 1.7.99.2; глутамин синтетаза – GS: EC 6.3.1.2; глутамат синтаза – NADH-GOGAT: EC 1.4.1.14 и нитрат редуктаза – NR-NADH: EC 1.6.6.1). Установени са отрицателни ефекти от недостига на Mo върху скоростта на азотфиксацията и намаляване на нитратите в двете симбиотични системи. Когато растенията се инокулират с щам *S. meliloti* NitR и се отглеждат при условия на азотно лимитиране, се определя най-високата стабилност на азотфиксацията и азотната редукция в съответствие с характеристиката на този мутантен щам.

27. **Hristozkova M.**, Geneva M., Stancheva I., Georgiev G. (2007) Nitrogen assimilatory enzymes and amino acid content in inoculated foliar fertilized pea plants grown at reduced molybdenum concentration. *Journal of Plant Nutrition* 30 (9) 1409-1419. Q2 IF=0,593
doi:10.1080/01904160701555838

ABSTRACT

A possibility to improve nitrogen assimilation in nitrogen fixing molybdenum (Mo) deficient pea plants was shown. The influence of foliar supplied nutrients in addition to root nutrition resulted in reducing the unfavorable effects of inorganic nitrogen on nodule function and Mo deficiency on the nitrogen assimilatory enzymes. Inoculated pea plants were grown on liquid nutrient solution both with and without Mo. The following variants were tested: Mo supplied plants with root nutrition (F1 + Mo); Mo supplied plants with root and foliar nutrition (F2 + Mo); Mo deficient plants with root nutrition (F1 – Mo); and Mo deficient plants with root and foliar nutrition (F2 – Mo). Foliar application of nutrients had a positive effect on the glutamine synthetase and glutamate synthase enzyme activities in the roots and nodules of Mo deficient plants. It was found that the foliar fertilization reduced the inhibitory effect of Mo shortage on the aspartate/asparagine content in the pea shoots.

РЕЗЮМЕ

В настоящото изследване е показана възможността за подобряване асимилацията на азот в азотфиксиращи грахови растения при дефицит на молибден (Mo) в средата. Влиянието на листно доставяните хранителни вещества в допълнение към кореновото хранене доведе до намаляване на неблагоприятните ефекти на неорганичния азот върху функцията на грудките и дефицита на Mo върху азотасимилиращите ензими. Инокулираните грахови растения се отглеждат върху течен хранителен разтвор както при наличие, така и без Mo. Тествани са следните варианти: снабдени с Mo растения и кореново хранене (F1+Mo); снабдени с Mo растения с кореново и листно подхранване (F2+Mo); Растения с дефицит на Mo с кореново хранене (F1 – Mo); и растения с дефицит на Mo с кореново и листно подхранване (F2 – Mo). Листното прилагане на хранителни вещества има положителен ефект върху ензимните активности на глутамин синтетазата и глутамат синтазата в корените и грудките на растения с дефицит на Mo. Установено е, че листното торене намалява инхибиращия ефект на недостига на Mo върху съдържанието на аспарат/аспарагин в надземните части на грах.

28. **Hristozkova M., Geneva M., Stancheva I., Georgiev G. (2007).** Response of inoculated foliar fed pea plants (*Pisum sativum* L.) to reduced Mo supply. *Acta Biol. Hungarica*, 58, 1, 87-92. Q3 IF=0,447; DOI <https://doi.org/10.1556/ABiol.58.2007.1.8>

ABSTRACT

The application of nutrients to the roots and leaves of inoculated pea plants grown under conditions of reduced Mo supply was studied. Pea plants (*Pisum sativum* L.) were grown on liquid nutrient solution excluding Mo from the media until the 35th day under glasshouse conditions. Plants were inoculated with the bacterial suspension of *Rhizobium leguminosarum* Bv. *Viciae*, strain D293 at approximately 10^8 cells per cm^3 . The foliar fertilizer Agroleaf® was applied at 0.3% concentration. Changes in the root nodulation and the activities of the enzymes connected with nitrogen assimilation pathway (nitrate reductase — NR-NADH: EC 1.6.6.1; glutamine synthetase — GS: EC 6.3.1.2; glutamate synthase — NADH-GOGAT: EC 1.4.1.14 and nitrogenase — NG: EC 1.7.99.2) were observed. It was established that the foliar application of nutrients reduced the inhibitory effect on the root nodulation and nitrogen assimilatory enzyme activities due to the Mo shortage.

РЕЗЮМЕ

Изследвано е прилагането на хранителни вещества към корените и листата на инокулирани грахови растения, отглеждани при условия на намалено снабдяване с Mo. Граховите растения (*Pisum sativum* L.) се отглеждат 35 дни в оранжерия върху течен хранителен разтвор, изключващ Mo от средата. Растенията се инокулират с бактериална суспензия на *Rhizobium leguminosarum* Bv. *Viciae*, шам D293 при приблизително 10^8 клетки на cm^3 . Листният тор Agroleaf® се прилага в концентрация 0,3%. Наблюдавани бяха промени в образуването на грудки по корените и активността на ензимите, свързани азотната асимилация (нитрат редуктаза — NR-NADH: EC 1.6.6.1; глутамин синтетазата — GS: EC 6.3.1.2; глутамат синтаза — NADH-GOGAT: EC 1.4.1.14 и нитрогеназа — NG: EC 1.7.99.2). Установено е, че листното прилагане на хранителни вещества намалява инхибиторния ефект върху грудкообразуването на корените и активността на азот асимилиращите ензими, поради недостиг на Mo.

29. **Hristozkova M.**, Stancheva I., Geneva M. (2006) Response of pea plants (*Pisum sativum* L.) to reduced supply with Mo and Cu. *International Journal of Agriculture and Biology*, 8(2) 218-220. Q3

doi:1560-8530/2006/08-2-218-220

https://www.fspublishers.org/Issue.php?y=2006&v_no=8&categoryID=32

ABSTRACT

The role of molybdenum (Mo) and copper (Cu) in regulation the activities of the enzymes involved in primary nitrogen assimilation in particular the nitrate reductase (EC 1.6.6.1) and glutamine synthetase (EC 6.3.1.2) was examined. Pea plants were grown in a phytotron chamber at 12 h photoperiod, day /night temperature 25/18°C and photon flux density of 95 $\mu\text{molm}^{-1} \text{s}^{-1}$ until 21-st day. Plants were grown at full strength Helriegel nutrient solution completed with micronutrients as in Hoagland and Arnon and reduced Mo and Cu concentrations. Although only extremely small amounts of Mo and Cu are required for normal plant growth, reduced supply with Mo and Cu to the growth medium decreased activities of the enzymes(nitrate reductase and glutamine synthetase) involved at initial steps of nitrate assimilation, fresh weight, and plastid pigment content (total chlorophyll and carotenoids). Accumulation of nitrates in plant tissues enhanced, especially in the variants with restrictive Cu concentration.

РЕЗЮМЕ

Изследвана е ролята на молибден (Mo) и мед (Cu) в регулиране активността на ензимите, участващи в първичната асимилация на азот, по-специално нитрат редуказата (EC 1.6.6.1) и глутамин синтетазата (EC 6.3.1.2). Граховите растения се отглеждат във фитотронна камера при 12-часов фотопериод, дневна/нощна температура 25/18°C и плътност на фотонния поток от 95 $\mu\text{molm}^{-1} \text{s}^{-1}$ до 21-ия ден. Растенията се развиват върху пълен хранителен разтвор на Helriegel с микроелементи по Ноаглан и Арнон и липса на Mo и Cu. Въпреки, че за нормалния растеж на растенията са необходими ниски концентрации на Mo и Cu, то липсата им в растежната среда намалява активността на ензимите (нитрат редуказата и глутамин синтетазата), участващи в началните етапи на асимилацията на нитрати, свежото тегло и съдържанието на пластидни пигменти (общ хлорофил и каротеноиди). Натрупването на нитрати в растителните тъкани се засилва, особено при вариантите без Cu.

30. **Hristozkova M.**, Stancheva I., Geneva M., Georgiev G. (2006) Response of inoculated pea pants (*Pisum sativum* L.) to root and foliar fertilizer application with reduced molybdenum concentration in nutrition solution. *Gen. Appl. Plant Physiology, Special issue -Proc. of the International Workshop PISA*, 73-79.

http://obzor.bio21.bas.bg/ipp/gapbfiles/pisa-06/06_pisa_73-79.pdf

ABSTRACT

The effects of foliar absorbed nutrients on root processes related to assimilation of nitrogen under presence or absence of molybdenum (Mo) were studied. Pea plants (*Pisum sativum* L.), var. Avola were grown until the 15th day in a glasshouse on liquid nutrient solution both without and with Mo added to the media. Plants were inoculated with bacterial suspension of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* strain D 293 at approximately 108 cells per cm^3 . Application of a liquid

foliar fertilizer at a concentration of 0.3% was performed twice a week by spraying under high pressure. The effects of foliar supplied nutrients in addition to root nutrition on dry biomass accumulation, protein content, root nodulation and activities of the enzymes of primary nitrogen assimilation (nitrate reductase (NR - NADH, EC 1.6.6.1), and glutamine synthetase (GS: EC 6.3.1.2) during the early stage of nodulation were studied. Foliar application of nutrients had a positive effect on the activities of NR and GS enzymes in shoots of Mo-supplied plants. It was found that foliar application of nutrients reduced the inhibitory effect of Mo shortage on root nodulation, plant dry biomass and protein content. The negative influence of Mo exclusion from the nutrient media on biomass accumulation and nodule formation was diminished through the foliar absorbed nutrients.

РЕЗЮМЕ

Изследвани са ефектите на листно абсорбираните хранителни вещества върху кореновите процеси, свързани с асимилацията на азот в присъствието или отсъствието на молибден (Mo). Грахови растения (*Pisum sativum* L.), var. Avola се отглеждат до 15-ия ден в оранжерия върху течен хранителен разтвор както без, така и с Mo, добавен към средата. Растенията се инокулират с бактериална суспензия от *Rhizobium leguminosarum* bv. Viciae щам D 293 при приблизително 108 клетки на cm³. Прилагането на течен листен тор в концентрация 0,3% се извършва два пъти седмично чрез пръскане под високо налягане. Проучени са ефектите на листно доставяните хранителни вещества в допълнение към кореновото хранене върху натрупването на суха биомаса, съдържанието на протеини, образуването на грудки в корените и активността на ензимите за първична асимилация на азот (нитрат редуктаза (NR - NADH, EC 1.6.6.1) и глутамин синтетеза (GS: EC 6.3.1.2) по време на ранния стадий на образуване на грудки. Листното прилагане на хранителни вещества има положителен ефект върху активностите на NR и GS ензимите в надземните части на растенията снабдени с Mo. Установено е, че листното прилагане на хранителни вещества намалява инхибиторния ефект на недостига на Mo върху образуването на грудки в корените, сухата растителна биомаса и съдържанието на протеини. Отрицателното влияние на изключването на Mo от хранителната среда върху натрупването на биомаса и образуването на грудки беше намалено чрез абсорбираните от листата хранителни вещества.

31. **Hristozkova M.**, Stancheva I., Geneva M., Georgiev G. (2005) Effect of different foliar fertilizer concentrations on pea plants nodulation at reduced Mo supply. Proceedings of the Balkan scientific conference of biology in Plovdiv (Bulgaria) (eds B. Gruev, M. Nikolova and A. Donev), p.365–372.

<http://web.uni-plovdiv.bg/mollov/bio/bscb2005/part1/365-372.pdf>

ABSTRACT

Garden pea *Pisum sativum* L. var. Avola inoculated with bacterial suspension of *Rhizobium leguminosarum* bv. Viciae strain D 293 were grown in the greenhouse until the 15th day on liquid half strength nutrient solutions of Hellriegel, contained 0,5 mM NO₃⁻ in the all experimental variants. The complementation of nutrients with micronutrients was done according to Hoagland and Arnon excluding Mo from the nutrient medium. The following variants were tested: (1) control plants with root nutrition only and presence of Mo; (2) control plants with root nutrition only without Mo (3) plants with combined root and foliar nutrition (0,1%Agroleaf); (4) plants with combined root and

foliar nutrition (0,3%Agroleaf); (5) plants with combined root and foliar nutrition (0,5%Agroleaf). Application of foliar fertilizer in elevated concentrations had a positive effect on the Mo deficient pea plants. An increase of nodule number, plant dry weight, total shoot nitrogen and leaf soluble sugars have been found. The highest nodule number and leaf soluble sugar content was observed at spraying with 0.3% concentration of Agroleaf.

РЕЗЮМЕ.

Градински грах *Pisum sativum* L. var. Avola, инокулиран с бактериална суспензия *Rhizobium leguminosarum* bv. Viciae щам D 293 се отглежда в оранжерия до 15-ия ден върху течна хранителна среда на Hellriegel с намалена на половина концентрация на елементите, съдържащи 0,5 mM NO₃ - във всички опитни варианти. Добавянето на микроелементи беше извършено съгласно Hoagland и Arnon, като се изключва Мо от среда. Тествани са следните варианти: (1) контролни растения само с кореново хранене и наличие на Мо; (2) контролни растения само с кореново подхранване без Мо (3) растения с комбинирано кореново и листно подхранване (0,1% Agroleaf); (4) растения с комбинирано кореново и листно подхранване (0,3% Agroleaf); (5) растения с комбинирано кореново и листно подхранване (0,5% Agroleaf). Прилагането на листен тор в повишени концентрации има положителен ефект върху граховите растения с дефицит на Мо. Установено е увеличаване на броя на грудките, сухото тегло на растенията, общия азот в надземните части и разтворимите захари в листата. Най-висок брой грудки и съдържание на разтворими захар в листата се наблюдава при пръскане с 0,3% концентрация на Agroleaf.