

**Резюмета на научните публикации на главен асистент д-р Анета Бориславова Любенова,
отдел Агробιοтехнологии, Агробιοинститут, Селскостопанска Академия
във връзка с участие в конкурс за заемане на академична длъжност "доцент" в
професионално направление 6.2. Растителна защита, научна специалност "Фитопатология"
обявен в Държавен вестник бр. 45 от 15.05.2026 г.**

В.4. Хабилизационен труд или равностойни научни публикации (не по-малко от 10) в научни издания, реферирани и индексирани в световноизвестни бази данни с научна информация

4.1. Moyankova, D., **Lyubenova, A.**, Slavov, S., & Djilianov, D. (2014). Extracts of the endemic resurrection plant *Haberlea rhodopensis* stimulate *in vitro* growth of various *Phytophthora* spp. pathogens. European Journal of Plant Pathology, 138(1), 149–155. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0315-3>

Abstract

The *Phytophthora* pathogens are among the most important pests in the modern agriculture and forestry. This makes them a subject of intensive studies, including laboratory experiments with *in vitro* culture on various plant-derived media. Here we show that leaf extracts from the resurrection endemic plant *Haberlea rhodopensis* stimulates significantly the *in vitro* growth of various isolates from several *Phytophthora* species. The extracts stimulate the formation of oospores in some heterothallic species. In this respect, the idea to propose *Haberlea* extracts as a potential ingredient of culture media for *Phytophthora* spp. maintenance under controlled conditions or as a component of detection systems for *Phytophthora* presence in nature seems quite attractive and promising.

Резюме

Патогените от *Phytophthora* са сред най-важните вредители в съвременното земеделие и горско стопанство. Това ги прави обект на интензивни изследвания, включително лабораторни експерименти с *in vitro* култивиране върху различни растителни среди. Тук показваме, че екстракти от листа от възкръсващото ендемичното растение *Haberlea rhodopensis*, стимулират значително *in vitro* растежа на различни изолати от няколко вида *Phytophthora*. Екстрактите стимулират образуването на ооспори при някои хетероталични видове. В тази връзка, идеята да се предложат екстракти от *Haberlea* като потенциална съставка на хранителни среди за поддържане на *Phytophthora* spp. при контролирани условия или като компонент на системи за откриване на наличието на *Phytophthora* в природата изглежда доста привлекателна и обещаваща.

4.2. Fodor, E., Hâruata, O., Milenković, I., **Lyubenova, A.**, Tziros, G., Keča, N., Slavov, S., Diamandis, S., & Kostov, K. (2015). Geometric morphometry of *Phytophthora plurivora* sporangia. *Annals of Forest Research*, 58(2), 275–294. <https://doi.org/10.15287/afr.2015.411>

Abstract

Eigenshape analysis and Relative Warp Analysis were employed in the study of the shape of highly variable sporangia of *Phytophthora plurivora*, a widespread oomycetous pathogen isolated from woody species, in several South-East European countries: Bulgaria, Greece, Serbia and Romania. The aim of the study was to estimate whether shape variables permitted the quantitative assessment of sporangial shape variability in *P. plurivora* and also, the discrimination between species based solely on sporangial shape, *P. cactorum* being selected for comparisons. Both Eigenshape and Relative Warp Analyses showed that the most variable sporangial areas were apical and basal regions. More than half of the shape variation was accounted for the first 2 ES axes (66.75%) and first two RW axes (61.74%). ESA performed better in terms of species shape (*P. plurivora* and *P. cactorum*) separation. Canonical Variate Analysis/MANOVA and Discriminant Analysis indicated the clear discrimination between species and between isolates of *P. plurivora*. Mean or consensus shape performed as the best shape descriptor of sporangia. High dimensional variation considered in terms of centroid size corroborated with shape variation spanning from symmetrical consensus shape to conspicuously asymmetric shapes.

Резюме

Анализът на собствените форми и анализът на относителната деформация бяха използвани при изследването на формата на силно променливи спорангии на *Phytophthora plurivora*, широко разпространен оомицетен патоген, изолиран от дървесни видове, в няколко страни от Югоизточна Европа: България, Гърция, Сърбия и Румъния. Целта на изследването беше да се оцени дали променливите на формата позволяват количествена оценка на променливостта на формата на спорангиите при *P. plurivora*, както и разграничаване между видовете, основано единствено на формата на спорангиите, като за сравнение беше избран *P. cactorum*. Както анализът на собствените форми, така и анализът на относителната деформация показаха, че най-променливите спорангиални области са апикалните и базалните области. Повече от половината от вариацията на формата се отчита за първите 2 ES оси (66,75%) и първите две RW оси (61,74%). ESA се представи по-добре по отношение на разделянето на формата на видовете (*P. plurivora* и *P. cactorum*). Каноничният анализ на вариациите/MANOVA и дискриминантният анализ показаха ясно разграничаване между видовете и между изолатите на *P. plurivora*. Средна или консенсусна форма, използвана като най-добър описател на формата на спорангиите. Високата размерна вариация, разглеждана по отношение на размера на центроида, се потвърждава с вариация на формата, обхващаща от симетрична консенсусна форма до подчертано асиметрични форми.

4.3. Lyubenova, A. B., Nowakowska, J. A., Sikora, K., Kostov, K., Borys, M., Slavov, S. B., & Oszako, T. (2016). Pathogenicity of *Phytophthora* isolates originating from several woody hosts in Bulgaria and Poland. *Folia Forestalia Polonica, Series A*, 58(3), 105–115. <https://doi.org/10.1515/ffp-2016-0012>

Abstract

Our aim was to examine the virulence of eight *Phytophthora* isolates belonging to three species (*Phytophthora cryptogea*, *Phytophthora plurivora* and *Phytophthora quercina*) obtained from diverse European ecosystems (in Bulgaria, Poland and Germany) towards three forest tree hosts - English oak (*Quercus robur* L.), Turkey oak (*Quercus cerris* L.) and European beech (*Fagus sylvatica* L.). All plants grown from seeds in a greenhouse conditions were artificially inoculated under the stem bark with *Phytophthora* cultures. The tested isolates turned to be more aggressive to Turkey oaks than to English oak trees. In case of European beech, the isolates of *P. cryptogea* and *P. plurivora* exposed various virulence. The potential hazard of the introduced foreign isolates for the oak and beech forests in Poland and Bulgaria is discussed. Amongst the tested isolates, *P. quercina* P290 from German highly infected Bulgarian Turkey oaks; therefore, its negative potential impact on Bulgarian oak forests could be considered as high (if unintentionally introduced). Also, two Bulgarian isolates belonging to *P. cryptogea* and *P. plurivora* are risky for Polish beech forests, if exposed to the pathogen. The observed pathogenicity of the tested *Phytophthora* species proved their potential as important contributors to decline of valuable forest ecosystems dominated by oaks (*Q. robur* and *Q. cerris*) or beech (*F. sylvatica*), in both Poland and Bulgaria. We found that investigated *Phytophthora* pathogens could develop in the living plant stem tissues without causing any disease symptoms, which is another demonstration that phytosanitary control by simple observation of plant material is not effective.

Резюме

Нашата цел беше да изследваме вирулентността на осем изолата *Phytophthora*, принадлежащи към три вида (*Phytophthora cryptogea*, *Phytophthora plurivora* и *Phytophthora quercina*), получени от различни европейски екосистеми (в България, Полша и Германия), спрямо три горски дървета гостоприемници – английски дъб (*Quercus robur* L.), цер (*Quercus cerris* L.) и европейски бук (*Fagus sylvatica* L.). Всички растения, отглеждани от семена в оранжерийни условия, бяха изкуствено инокулирани под кората на стъблото с култури на *Phytophthora*. Тестваните изолати се оказаха по-агресивни към церовете, отколкото към английските дъбове. В случая с европейския бук, изолатите на *P. cryptogea* и *P. plurivora* показаха различна вирулентност. Обсъжда се потенциалната опасност от интродуцираните чуждестранни изолати за дъбовите и буковите гори в Полша и България. От изследваните изолати, *P. quercina* P290 с произход Германия, се оказа силно вирулентен към цер с български произход; Следователно, потенциалното му отрицателно

въздействие върху българските дъбови гори може да се счита за високо (при внасяне). Също така, два български изолата - *P. cryptogea* и *P. plurivora*, може да представляват риск за полските букови гори, ако бъдат изложени на патогените. Наблюдаваната патогенност на тестваните видове *Phytophthora* доказва техния потенциал като важни фактори за упадъка на ценни горски екосистеми, доминирани от дъбове (*Q. robur* и *Q. cerris*) или бук (*F. sylvatica*), както в Полша, така и в България. Установихме, че изследваните патогени от род *Phytophthora* могат да се развиват в живите тъкани на растителни стъбла, без да причиняват никакви симптоми на заболяване, което е още едно доказателство, че фитосанитарният контрол чрез просто наблюдение на растителния материал не е ефективен.

4.4. Radkova, M., **Lyubenova, A.**, Slavov, S., Batchvarova, R., Kalushkov, P., & Djilianov, D. (2017). Feeding Colorado potato beetle on late blight resistant cisgenic potato lines has no effect on the insect as a non target organism. *Comptes Rendus de L'Academie Bulgare Des Sciences*, 70(6), 895–902. https://www.proceedings.bas.bg/content/2017_6_content.html#

Abstract

One of the main subjects of the AMIGA (Assessing and Monitoring the Impacts of Genetically modified plants on Agro-ecosystems) project of F7P was to establish protocols for risk assessment in GM crops providing reliable evaluation of their impact on the environment. We were able to develop an efficient bioassay where micropropagated plants of cisgenic potato lines resistant to late blight disease caused by *Phytophthora infestans* Mont de Bary, were used as feed for larvae of Colorado potato beetle as Non Target Organism. The studies performed under contained laboratory conditions show no impact of *Phytophthora* resistant potato lines on life cycle parameters and dynamics of larval growth of the Non Target Organism.

Резюме

Една от основните теми на проекта AMIGA (Оценка и мониторинг на въздействието на генетично модифицирани растения върху агроекосистемите) на F7P беше установяването на протоколи за оценка на риска при генетично модифицирани култури, осигуряващи надеждна оценка на тяхното въздействие върху околната среда. Успяхме да разработим ефикасен биологичен анализ, при който микроразмножени растения от цис-генни линии картофи, устойчиви на мана, с причинител *Phytophthora infestans* Mont de Bary, бяха използвани като храна за ларви на колорадски бръмбар като нецелови организъм. Проведените изследвания при контролирани лабораторни условия не показват въздействие на устойчивите на *Phytophthora* линии картофи върху параметрите на жизнения цикъл и динамиката на растежа на ларвите на нецелови организъм.

4.5. Lyubenova, A., Christova, P., Kostov, K., & Slavov, S. (2020). Characterization and pathogenicity of three *Phytophthora* spp. Recovered from rivers in Bulgaria. Journal of Phytopathology, 168(4), 195–203. <https://doi.org/10.1111/jph.12881>

Abstract

Many *Phytophthora* species are pathogens on fruit trees and may cause destructive diseases. In the current study, we examined six *Phytophthora* isolates recovered from rivers in Bulgaria, representatives of the following three species: *Phytophthora chlamydospora*, *P. pseudocryptogea* and *P. syringae*. Morphological traits, cardinal temperatures and growth rates of the isolates were described. We found considerable variation in the size of sporangia and significant difference in the mycelial growth rates of the two *P. pseudocryptogea* isolates, along with multiple polymorphic sites in the ITS region of one of them. In the cases of the other two *Phytophthora* species, no such differences were found between the isolates. Both *P. chlamydospora* isolates had a lower optimum growth temperature compared with the reported in the literature for this species. In pathogenicity tests against leaves and fruits of apple, pear, cherry, apricot and plum, the isolates proved to be capable of causing infections with varying severity. *P. chlamydospora* showed to be the most aggressive towards the leaves, while *P. pseudocryptogea* isolates induced the highest percentage of decay on the fruits of all tested tree species, which may suggest partial organ or tissue specificity. The demonstrated infection capacity of the described isolates points out the investigated *Phytophthora* species as a potential threat for the orchards in Bulgaria, if favourable conditions are available.

Резюме

Много видове *Phytophthora* са патогени по овощните дървета и могат да причинят разрушителни болести. В настоящото проучване изследвахме шест изолата на *Phytophthora*, извлечени от реки в България, представители на следните три вида: *Phytophthora chlamydospora*, *P. pseudocryptogea* и *P. syringae*. Описани са морфологични характеристики, кардинални температури и скорости на растеж на изолатите. Установихме значителни вариации в размера на спорангиите и значителна разлика в скоростите на растеж на мицела на двата изолата на *P. pseudocryptogea*, заедно с множество полиморфни места в ITS региона на единия от тях. В случаите на другите два вида *Phytophthora*, не бяха открити такива разлики между изолатите. И двата изолата на *P. chlamydospora* имаха по-ниска оптимална температура на растеж в сравнение с докладваната в литературата за този вид. В тестове за патогенност срещу листа и плодове на ябълка, круша, череша, кайсия и слива, изолатите се оказаха способни да причиняват инфекции с различна тежест. *P. chlamydospora* показа най-агресивен резултат спрямо листата, докато изолатите на *P. pseudocryptogea* предизвикаха най-висок процент на гниене върху плодовете от всички тествани дървесни видове, което може да предполага частична органна или тъканна специфичност.

Доказаната инфекциозна способност на описаните изолати посочва изследвания вид *Phytophthora* като потенциална заплаха за овощните градини в България, ако са налице благоприятни условия.

4.6. Christova, P. K., Kostov, K. V., **Lyubenova, A. B.**, & Slavov, S. B. (2021). A new hybrid of *Phytophthora* from Southeast Europe. *Mycologia*, 113(4), 734–747. <https://doi.org/10.1080/00275514.2021.1897378>

Abstract

During an investigation of rivers in Bulgaria, an isolate of *Phytophthora* (RLKam2016/61c) was recovered and initially identified as *Phytophthora sansomeana* based on internal transcribed spacer region (ITS) sequence data. However, the sequencing of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (cox1) gene revealed high similarity to *Phytophthora* sp. *kelmania*, and sequencing of other nuclear regions (β -tubulin [Btub] and translation elongation factor 1-alpha [tef1]) revealed a significant number of polymorphisms, indicating a possible hybridization event. Additional cloning and sequencing of the nuclear ITS and Btub regions showed the presence of two distinct groups of alleles, one of which was highly similar to *P. sansomeana*, whereas the other was similar to a species complex that includes *Phytophthora* sp. *kelmania*. Therefore, the new hybrid was named *Phytophthora* $\times$ *sansomeana*. It is characterized by fast growth on V8 juice agar (V8A) and carrot agar (CA), moderate aerial mycelium with radiate pattern of the colonies and relatively slower growth rate on malt extract agar (MEA) and potato dextrose agar (PDA), and petaloid to rosaceous pattern of the colonies with fluffy aerial mycelium. The optimum growth temperature for *P. $\times$ sansomeana* was at 25 C, with an average growth rate of 9 mm per day. Abundant sporangium formation of the isolate in spring water was observed, but the hybrid was sterile in culture. Pathogenicity analyses of the hybrid were conducted in comparison with the most closely related subclade 8a species from our collection, *P. pseudocryptogea*. The inhibition effect on the root growth of young seedlings of two legumes, common pea and vetch, as well as on cuttings of the ornamental plant coleus induced by both phytopathogens was significant. No effect of either the new hybrid or *P. pseudocryptogea* on the growth of maize seedlings was observed.

Резюме

По време на изследване на реки в България, е открит и първоначално идентифициран един изолат на *Phytophthora* (RLKam2016/61c) като *Phytophthora sansomeana* въз основа на данни от секвениране на вътрешния транскрибиран спейсър регион (ITS). Секвенирането на гена на митохондриалната цитохром с оксидазна субединица I (cox1) обаче разкрива високо сходство с *Phytophthora* sp. *kelmania*, а секвенирането на други ядрени региони (β -тубулин [Btub] и фактор на удължаване на трансляцията 1-алфа [tef1]) разкрива значителен брой полиморфизми, което показва възможно хибридизационно събитие. Допълнително клониране и секвениране на ядрените

ITS и Btub региони показват наличието на две различни групи алели, едната от които е силно подобна на *P. sansomeana*, докато другата е подобна на видов комплекс, който включва *Phytophthora* sp. *kelmania*. Следователно, новият хибрид е наречен *Phytophthora* × *sansomeana*. Характеризира се с бърз растеж върху V8 агар (V8A) и морковен агар (CA), умерен въздушен мицел с лъчевидни колонии и относително по-бавен темп на растеж върху малцов екстрактен агар (MEA) и картофено-декстрозен агар (PDA), както и петалоиден до розоцветен модел на колониите с пухкав въздушен мицел. Оптималната температура на растеж за *P. × sansomeana* е 25°C, със среден темп на растеж от 9 mm на ден. Наблюдавано е обилно образуване на спорангии на изолата в изворна вода, но стерилност в култура. Анализите на патогенността на хибрида са проведени в сравнение с най-близкородствения вид от подклад 8а от нашата колекция, *P. pseudocryptogea*. Инхибиращият ефект върху растежа на корените на млади разсади от две бобови растения, обикновен грах и фий, както и върху резници на декоративното растение колеус, индуциран от двата фитопатогена, е значителен. Не е наблюдаван ефект нито на новия хибрид, нито на *P. pseudocryptogea* върху растежа на царевица.

4.7. Nikolova, M., **Lyubenova, A.**, Yankova-Tsvetkova, E., Georgiev, B., Berkov, S., Aneva, I., & Trendafilova, A. (2023). *Artemisia santonicum* L. and *Artemisia lerchiana* Web. Essential Oils and Exudates as Sources of Compounds with Pesticidal Action. *Plants-Basel*, 12(19), 3491. <https://doi.org/10.3390/plants12193491>

Abstract

The application of natural products for pest control is important in modern farming. In the present study, *Artemisia santonicum* L. and *Artemisia lerchiana* Weber essential oil and exudate profiles were determined, and their potential as inhibitors of seed germination, acetylcholinesterase, and phytopathogenic mycelium growth were evaluated. Essential oils (EO) were obtained via hydrodistillation and exudates (AE) by washing aerial parts of the species with acetone. EO and AE's composition was identified using GC/MS. Eucalyptol (1,8-cineole) and camphor were found to be the main components of *A. lerchiana* EO, while β -pinene, trans-pinocarveol, α -pinene, α -terpineol, and spathulenol were established as major compounds of *A. santonicum* EO. Strong inhibition on *Lolium perenne* seed germination was found at 2 μ L/mL and 5 mg/mL using aqueous solutions of EO and AE, respectively. An inhibitory effect on acetylcholinesterase was established, with an IC₅₀ value of 64.42 and 14.60 μ g/mL for EO and 0.961, >1 mg/mL for the AE of *A. lerchiana* and *A. santonicum*, respectively. The low inhibition on the mycelium growth of studied phytopathogenic fungi was established by applying 2 μ L of EO and 15 μ L of 100 mg/mL of AE, with the exception of *A. lerchiana* AE against *Botrytis cinerea*.

These results show that the studied EO and AE exhibited strong phytotoxic and AChE inhibitory activities, providing new data for these species

Резюме

Приложението на природни продукти за борба с вредителите е важно в съвременното земеделие. В настоящото изследване бяха определени профилите на етеричното масло и ексудат на *Artemisia santonicum* L. и *Artemisia lerchiana* Weber и беше оценен техният потенциал като инхибитори на покълването на семената, ацетилхолинестеразата и растежа на фитопатогенния мицел. Етеричните масла (ЕМ) бяха получени чрез хидродестилация, а ексудатите (АЕ) - чрез промиване на надземните части на вида с ацетон. Съставът на ЕМ и АЕ беше идентифициран с помощта на GC/MS. Установено е, че евкалиптолът (1,8-цинеол) и камфорът са основните компоненти на ЕМ на *A. lerchiana*, докато β -пинен, транс-пинокарвеол, α -пинен, α -терпинеол и спатуленол са установени като основни съединения на ЕО на *A. santonicum*. Силно инхибиране на кълняемостта на семената на *Lolium perenne* беше установено при 2 μ L/mL и 5 mg/mL, при използване на водни разтвори съответно на ЕМ и АЕ. Установен е инхибиторен ефект върху ацетилхолинестеразата, с IC50 стойност от 64,42 и 14,60 μ g/mL за ЕО и 0,961, >1 mg/mL за АЕ на *A. lerchiana* и *A. santonicum*, съответно. Слабо инхибиране на растежа на мицела на изследваните фитопатогенни гъби е установено чрез прилагане на 2 μ L ЕО и 15 μ L от 100 mg/mL АЕ, с изключение на АЕ на *A. lerchiana* срещу *Botrytis cinerea*. Тези резултати показват, че изследваните ЕМ и АЕ проявяват силна фитотоксична и AChE инхибиторна активност, предоставяйки нови данни за тези видове.

4.8. Kostov, K., Georgiev, M., **Lyubenova, A.**, Alekseeva, M., Zagorcheva, T., & Smagghe, G. (2026). Enhancing RNAi efficiency in *Phytophthora infestans* using cell-penetrating peptide TAT. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 142, 103048. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2025.103048>

Abstract

Synthetic double-stranded RNA (dsRNA) can be used to control plant pests and pathogens by inducing RNA interference (RNAi) in the cells of the target organism. However, this could be challenging especially in species with naturally lower dsRNA uptake capabilities, such as the late blight pathogen *Phytophthora infestans*. Short peptides that readily cross the cell membrane, called cell-penetrating peptides (CPPs), have been explored as molecular carriers for the delivery of therapeutic molecules, including proteins and nucleic acids. Here, we investigate the possibility of using CPPs to facilitate the uptake of dsRNA and increase the RNAi efficiency in *P. infestans*. We compared the penetration efficiency of four well-known CPPs in sporangia and hyphae and found that the cationic peptide derived from the transactivator of transcription protein (TAT) of the human immunodeficiency virus (HIV) is

internalized efficiently, rapidly, and in an energy-independent manner. The TAT peptide also interacts with dsRNA electrostatically by forming particles with increased affinity towards the cell walls of *P. infestans*. In hyphae treated with TAT/dsRNA complex, the accumulation of high quantities of TAT peptide was observed, however, only a limited amount of dsRNA was detected. Nonetheless, TAT/dsRNA complex proved functional by triggering RNAi response by silencing the G-protein β -subunit gene (*Pigpb1*) in *P. infestans* in contrast to the naked dsRNA. Additionally, we found that the TAT peptide has a moderate ability to penetrate plant leaves and can move through the xylem. Our results indicate that CPPs can improve the efficiency of dsRNA-induced RNAi in *P. infestans* and have potential in the development of novel plant protection formulations.

Резюме

Синтетичната двуверижна РНК (dsRNA) може да се използва за контрол на растителни вредители и патогени чрез индуциране на РНК интерференция (RNAi) в клетките на целевия организъм. Това обаче може да бъде предизвикателство, особено при видове с естествено по-ниски възможности за усвояване на dsRNA, като например патогена на картофената мана *Phytophthora infestans*. Къси пептиди, които лесно преминават клетъчната мембрана, наречени клетъчно-проникващи пептиди (КПП), са изследвани като молекулярни носители за доставяне на терапевтични молекули, включително протеини и нуклеинови киселини. Тук изследваме възможността за използване на КПП за улесняване на усвояването на dsRNA и повишаване на ефективността на RNAi при *P. infestans*. Сравнихме ефективността на проникване на четири добре познати КПП в спорангии и хифи и установихме, че катионният пептид, получен от трансактиватора на транскрипционния протеин (TAT) на вируса на човешката имунна недостатъчност (HIV), се интернализира ефективно, бързо и по енергийно независим начин. TAT пептидът също взаимодейства електростатично с dsRNA, като образува частици с повишен афинитет към клетъчните стени на *P. infestans*. В хифи, третиран с TAT/dsRNA комплекс, се наблюдава натрупване на големи количества TAT пептид, но е открито само ограничено количество dsRNA. Въпреки това, TAT/dsRNA комплексът се оказва функционален, като задейства RNAi отговор чрез заглушаване на гена на G-протеин β -субединицата (*Pigpb1*) в *P. infestans*, за разлика от голата dsRNA. Освен това открихме, че TAT пептидът има умерена способност да прониква през листата на растенията и може да се движи през ксилема. Нашите резултати показват, че КПП могат да подобрят ефективността на dsRNA-индуцираните RNAi в *P. infestans* и имат потенциал в разработването на нови формулировки за растителна защита.

4. 9. Nikolova, M., **Lyubenova, A.**, Yankova-Tsvetkova, E., Georgiev, B., Gavrilov, G., & Gavrilova, A. (2025). *Satureja kitaibelii* Essential Oil and Extracts: Bioactive Compounds and Pesticide Properties. *Agronomy-Basel*, 15(2), 357. <https://doi.org/10.3390/agronomy15020357>

Abstract

In recent years, the essential oil of *Satureja* species has been studied as a source of biocidal activity with potential applications in organic farming such as bio-pesticides. The present study aims to determine the potential of essential oil (EO), exudate fraction (EF) and methanolic extract (ME) of *Satureja kitaibelii* Wierzb. ex Heuff. to inhibit the mycelial growth of phytopathogenic fungi and acetylcholinesterase (AChE). Additionally, ME was tested for inhibitory activity on seed germination and root elongation. Phytochemical analysis was conducted using gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) and thin-layer chromatography (TLC). Biological activities were studied using in vitro methods. p-Cymene, limonene, geraniol, carvacrol and borneol were identified as the main components of EO. Oleanolic and ursolic acid, carvacrol and flavonoid aglycones were determined as the most abundant bioactive compounds of EF, whereas rosmarinic acid and flavonoid glycosides were found in ME. EO reduced the growth of all tested plant pathogens, indicated by 40% to 84% inhibition of mycelial growth (IMG). The growth rates of *Oomycetes Phytophthora cryptogea* Pethybr. & Laff. and *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan were affected to the greatest extent with 84% and 68% IMG. EF showed the most potent AChE inhibitory activity with IC₅₀ value of 0.18 mg/mL. Aqueous solutions of the ME with a concentration above 5 mg/mL were found to inhibit seed germination by more than 90%, whereas a reduction in root elongation was observed at 3 mg/mL. The present study provides for the first time data for the pesticidal properties of EO, EF and ME of *S. kitaibelii*.

Резюме

През последните години етеричното масло от видовете *Satureja* е изследвано като източник на биоцидна активност с потенциални приложения в биологичното земеделие, като например биопестициди. Настоящото изследване има за цел да определи потенциала на етеричното масло (ЕМ), ексудатната фракция (ЕФ) и метаноловия екстракт (МЕ) от *Satureja kitaibelii* Wierzb. ex Heuff. за инхибиране на мицелния растеж на фитопатогенни гъби и ацетилхолинестеразата (AChE). Освен това, МЕ е тестван за инхибиторна активност върху покълването на семената и удължаването на корена. Фитохимичният анализ е проведен с помощта на газова хроматография-маспектрометрия (GC-MS) и тънкослойна хроматография (TLC). Биологичната активност е изследвана с помощта на *in vitro* методи. p-Цимен, лимонен, гераниол, карвакрол и борнеол бяха идентифицирани като основни компоненти на етилендиамин (ЕО). Олеанолова и урсолова киселина, карвакрол и флавоноидни агликон бяха определени като най-разпространените биоактивни съединения на ЕО, докато розмаринова киселина и флавоноидни гликозиди бяха

открити в МЕ. ЕО намали растежа на всички тествани растителни патогени, което се вижда от 40% до 84% инхибиране на растежа на мицела (ИРМ). Скоростите на растеж на оомицетите *Phytophthora cryptogea* Pethybr. & Laff. и *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan бяха засегнати в най-голяма степен с 84% и 68% ИРМ. ЕФ показва най-силна инхибиторна активност срещу АСhЕ с IC50 стойност от 0,18 mg/mL. Установено е, че водни разтвори на МЕ с концентрация над 5 mg/mL инхибират покълването на семената с повече от 90%, докато при 3 mg/mL се наблюдава намаляване на удължаването на корена. Настоящото изследване предоставя за първи път данни за пестицидните свойства на етилен сулфат (ЕО), ефирен сулфат (ЕФ) и метилен сулфат (МЕ) на *S. kitaibelii*.

4.10. Revalska, M., Radkova, M., **Lyubenova, A.**, Naydenova, G., & Iantcheva, A. (2026). Preliminary Investigation of Foliar Application of Boron on Pollen Viability and Development in the Cultivation of Red Clover in the Field. *Agriculture*, 16(6), 681. <https://doi.org/10.3390/agriculture16060681>

Abstract

Red clover (*Trifolium pratense* L.) is a crop used as a forage that possesses an exceptional nutritional profile and digestibility. Unfortunately, this crop has low seed yield. Within the framework of the “Legume Generation” EC-funded project, our team aimed to investigate the role of foliar boron application on pollen viability and pollen tube development, and to assess its overall effect on red clover cultivation. Plants of six commercial diploid red clover cultivars, Nika 11, Sofia 52, AberClaret, Milvus, Global, and S123, were field-grown and boron-treated by spraying with the commercial product “Lebasol”, 11% active water-soluble boron. To reach our purpose, the transcript levels of genes related to flower, pollen, and pollen tube development and boron transport were measured by qRT-PCR; pollen grain viability and count were assessed microscopically. For this research, eight genes were selected: Auxin Response factor (TprARF17); TprAPETALA3; Walls are thin (TprWAT1 and TprWAT2); NIPs genes (Nodulin Intrinsic Protein) TprNIP4;2, TprNIP7;1, TprNIP5;1, and TprNIP6;1. Additionally, total nitrogen content in leaves detached from field-grown boron-treated and untreated plants was assessed and compared with the expression levels of two TprNIP5;1 and TprNIP6;1 transporters. The fresh and dry biomass weight from the first and second cuts was evaluated, as well as the seed collected from the red clover plants. Seed germination percentage and vigor of seedlings were examined in vitro for both boron-treated and untreated groups of two specific cultivars. Collected data confirm that foliar application of boron affects pollen viability and plant development of red clover in the cultivation conditions of South East Europe.

Резюме

Червената детелина (*Trifolium pratense* L.) е култура, използвана като фураж, която притежава изключителен хранителен профил и смилаемост. За съжаление, тази култура има нисък добив на семена. В рамките на проекта „Поколение на бобови растения“, финансиран от Европейската комисия, нашият екип си постави за цел да проучи ролята на листното приложение на бор върху жизнеспособността на полена и развитието на поленовите тръбички, както и да оцени цялостния му ефект върху отглеждането на червена детелина. Растения от шест търговски диплоидни сорта червена детелина, Nika 11, Sofia 52, AberClaret, Milvus, Global и S123, бяха отгледани на полето и третирани с бор чрез напръскване с търговския продукт „Lebasol“, 11% активен водоразтворим бор. За да постигнем нашата цел, нивата на транскриптите на гени, свързани с развитието на цвета, полена и поленовите тръбички и транспорта на бор, бяха измерени чрез qRT-PCR; жизнеспособността и броят на поленовите зърна бяха оценени микроскопски. За това изследване бяха избрани осем гена: Auxin Response factor (TprARF17); TprAPETALA3; Walls are thin (TprWAT1 и TprWAT2); NIPs гени (Nodulin Intrinsic Protein) TprNIP4;2, TprNIP7;1, TprNIP5;1 и TprNIP6;1. Освен това беше оценено общото съдържание на азот в листата, отделени от отглеждани на полето растения, третирани и нетретирани с бор, и сравнено с нивата на експресия на два TprNIP5;1 и TprNIP6;1 транспортера. Оценено беше теглото на прясната и сухата биомаса от първата и втората реколта, както и семената, събрани от растенията червена детелина. Процентът на покълване на семената и жизнеността на разсада бяха изследвани *in vitro* както за третирани с бор, така и за нетретирани групи от два специфични сорта. Събраните данни потвърждават, че листното приложение на бор влияе върху жизнеспособността на полена и развитието на растенията червена детелина в условията на отглеждане в Югоизточна Европа.

7. Статии и доклади, публикувани в научни издания, реферирани и индексирани в световноизвестни бази данни с научна информация

- 7.1 Christova, P., **Lyubenova, A.**, Kostov, K., & Slavov, S. (2018). Morphological characterization and pathogenicity to ornamental plants of a Bulgarian isolate *Phytophthora plurivora*. *Agrisci*, 10(23), 21–26. https://agrarninauki.au-plovdiv.bg/2018/03_23/

Abstract

Phytophthora plurivora, isolate RZlPan2016/25a, was derived from Zlatna Panega River at the time of a large-scale examination of *Phytophthora* distribution in aquatic ecosystems in Bulgaria. The species identification was performed using DNA sequence analysis of the ITS region and morphological characterization. The isolate RZlPan2016/25a demonstrated strong pathogenicity to oleander and azalea in a detached leaf bioassay. An application of fungicides Funguran OH 50 WP, Dithane® M-45, Acanto®

and Acanto® Plus led to in vitro inhibition of *P. plurivora* growth. The potential threat for the wide range of hosts species, including ornamental plants by *P. plurivora* is discussed as well as the necessity of effective control to prevent the spread of the pathogen worldwide.

Резюме

Phytophthora plurivora, изолат RZIPan2016/25a, е получен от река Златна Панега по време на мащабно изследване на разпространението на *Phytophthora* във водните екосистеми в България. Идентификацията на вида е извършена чрез анализ на ДНК последователността на ITS региона и морфологична характеристика. Изолатът RZIPan2016/25a демонстрира силна патогенност към олеандър и азалия в биологичен тест върху откъснати листа. Приложението на фунгицидите Funguran OH 50 WP, Dithane® M-45, Acanto® и Acanto® Plus доведе до *in vitro* инхибиране на растежа на *P. plurivora*. Обсъжда се потенциалната заплаха от *P. plurivora* за широк спектър от видове гостоприемници, включително декоративни растения, както и необходимостта от ефективен контрол за предотвратяване на разпространението на патогена в световен мащаб.

7.2. Slavov, S., Lyubenova, A., Kostov, K., & Christova, P. (2018). Oomycetes from genus *Pythium* found in water and soil samples in Bulgaria. *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans*, 21(2), 161–171. <https://jmabonline.com/en/article/MsrUwqzgnsDxtHSYviia>

Abstract

Pythium spp. are water moulds, present in most cultivated soils, but also in natural environment. Many of them are recorded as plant pathogens of economic importance in agriculture with large range of hosts and are more devastating by causing the root rot on plants. As Oomycetes they produce sporangia which release numerous swimming zoospores. The caused diseases are more severe during an extended period of high soil moisture, or in water systems, as motile zoospores move and spread through the water to infect healthy plants. Thus these plant pathogens can spread in irrigation water as well as by contaminated soil. We have investigated the presence of *Pythium* species in soil samples associated with different plant hosts, derived from natural habitats or cultivated areas, and in water samples from rivers passing through diverse environments and regions in Bulgaria. Oomycetes organisms of genus *Pythium* were found to be largely spread across the country. Totally 22 *Pythium* spp. were isolated from soil samples. Among them 7 isolates were obtained from garden trade centers and forest nurseries, 10 from forests areas, 3 from orchards, one from a city park and one from a private yard. Another 20 isolates from rivers were also collected and determined as *Pythium* spp. according to the DNA sequencing of the internal transcribed spacer (ITS) region. Data shows the high inoculum potential of *Pythium* spp. present in soil and rivers

throughout entire territory of Bulgaria, possible to trigger destructive plant diseases in nurseries and watering crops areas under favorable conditions.

Резюме

видовете от род *Pythium* известни като водни плесени, присъстват както в повечето обработваеми почви, така и в естествена среда. Много от тях са познати като растителни патогени с икономическо значение в селското стопанство с голям спектър от гостоприемници, причиняващи кореново гниене по растенията. Като оомицети те произвеждат спорангии, които освобождават множество плуващи зооспори. Причинените заболявания са по-тежки по време на продължителни периоди на висока почвена влажност или във водни системи, тъй като подвижните зооспори се движат и разпространяват посредством водата, за да инфектират здрави растения. Тези растителни патогени могат да се разпространяват както чрез водата за напояване, така и със замърсена почва. Изследвахме наличието на видове от р. *Pythium* в почвени проби, свързани с различни растителни гостоприемници, получени от естествени местообитания или обработваеми площи, както и във водни проби от реки, преминаващи през различни региони в България. Установено е, че оомикотните организми от род *Pythium* са широко разпространени в цялата страна. Общо двадесет и два вида *Pythium* бяха изолирани от почвени проби. Сред тях седем изолата са получени от градински търговски центрове и горски разсадници, десет от горски райони, три от овощни градини, един от градски парк и един от частен двор. Други двадесет изолата от реки също са събрани и определени като принадлежащи към род *Pythium* въз основа на ДНК секвенирането на региона на вътрешния транскрибиран спейсър (ITS). Данните показват високия инфекциозен потенциал на представителите на род *Pythium*, присъстващи в почвата и реките в цялата страна, като е възможно да предизвикват разрушителни болести по растенията в разсадници и земеделски площи при благоприятни условия.

7.3. Christova, P., **Lyubenova, A.**, Kostov, K., & Slavov, S. (2018). Diversity and pathogenicity of *Phytophthora* species, isolated from Osam River. *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans*, 21(1), 179–191. <https://jmabonline.com/en/article/XiKuiQSocgitv402UVRM>

Abstract

Phytophthora is a genus of the class *Oomycetes*, consisting of more than 150 species. Some of them cause damage on forest vegetation, while others are pathogens on crop plants. Some *Phytophthora* species are related to aquatic habitats, as well as moist soil environments. The aim of this study is isolation and characterization of *Phytophthora* species from the upper stream of the Osam River. Twenty *Phytophthora* isolates were recovered from four different locations in the river using a baiting method. Four species, *P.*

lacustris, *P. gonapodyides*, *P. chlamydospora* and *P. syringae*, were identified using classical morphological methods and molecular analyses. *P. lacustris* was defined as the most common and widely spread *Phytophthora* species in the investigated region. Pathogenicity of isolated *Phytophthora* species to berry plants (strawberry, blackberry, cranberry) was analyzed by inoculation of detached leaves. Results of the analyses showed that *P. lacustris*, *P. chlamydospora*, *P. syringae* and *P. gonapodyides* can infect wild berry plants, as well as cultivated species. They are a potential threat for the vegetation in the region of the Osam River and can affect different plant species in both natural ecosystems and agricultural areas.

Резюме

Род *Phytophthora* е от клас *Oomycetes*, и включва над 150 вида. Някои от тях причиняват щети на горската растителност, а други са патогени по културните растения. Някои видове *Phytophthora* са свързани с водни местообитания, както и с влажни почвени среди. Целта на това изследване е изолиране и характеризиране на видове от род *Phytophthora* от горното течение на река Осъм. Двадесет изолата на *Phytophthora* са открити в четири различни места в реката с помощта на метода на уловките. Четири вида, *P. lacustris*, *P. gonapodyides*, *P. chlamydospora* и *P. syringae*, са идентифицирани с помощта на класически морфологични методи и молекулярни анализи. *P. lacustris* е най-често на изолираните видове *Phytophthora* към ягодоплодните растения (ягода, къпина, червена боровинка) е анализирана чрез инокулация на откъснати листа. Резултатите от анализите показват, че *P. lacustris*, *P. chlamydospora*, *P. syringae* и *P. gonapodyides* могат да заразят както диви, така и култивирани видове. Тези патогени представляват потенциална заплаха за растителността в района на река Осъм и могат да засегнат различни растителни видове както в естествени екосистеми, така и в земеделски райони.

7.4. Christova, P. K., **Lyubenova, A. B.**, Kostov, K. V., & Slavov, S. B. (2019). First report of *Phytophthora pseudosyringae* recovered from aquatic ecosystems in Bulgaria. *Forest Pathology*, 49(3). Scopus. <https://doi.org/10.1111/efp.12505>

Abstract

Two *Phytophthora pseudosyringae* isolates were recovered from aquatic ecosystems in Bulgaria during a two-year investigation of *Phytophthora* distribution in water sources in the country. Isolate RVit2016/6d was derived from Boyana Lake at the Vitosha Mountain, whereas isolate RTr2016/32d was obtained from Erma River at the Ruy Mountain. Both isolates belong to *P. pseudosyringae* species according to their morphological and physiological characteristics, as well as to the DNA sequence analysis of the internal transcribed spacer (ITS) region. The pathogenicity of the isolates to wild cranberry plants (*Vaccinium vitis-idea*) was studied by detached leaves experiments and *in planta*. Both *P. pseudosyringae* isolates were able to cause leaf necrosis and death of plants within 3 months. The ability of the pathogens to infect

cranberry leaves at different temperatures was also investigated. The significance of *P. pseudosyringae* species and its potential threat for forest ecosystems is discussed. To our knowledge, this is the first report of *P. pseudosyringae* isolation in Bulgaria.

Резюме

Два изолата *Phytophthora pseudosyringae* бяха получени от водни екосистеми в България по време на двугодишно изследване на разпространението на *Phytophthora* във водни източници в страната. Изолат RVit2016/6d е получен от Боянското езеро във Витоша, докато изолат RTr2016/32d е получен от река Ерма в планината Руй. И двата изолата принадлежат към вида *P. pseudosyringae* според техните морфологични и физиологични характеристики, както и според анализа на ДНК последователността на вътрешния транскрибиран спейсър (ITS) регион. Патогенността на изолатите към дива червена боровинка (*Vaccinium vitis-idea*) е изследвана чрез експерименти с отделени листа и *in planta*. И двата изолата на *P. pseudosyringae* са способни да причинят некроза на листата и смърт на растенията в рамките на 3 месеца. Изследвана е и способността на патогените да заразяват листата на червена боровинка при различни температури. Обсъжда се значението на *P. pseudosyringae* и неговата потенциална заплаха за горските екосистеми. Доколкото ни е известно, това е първият доклад за изолиране на *P. pseudosyringae* в България.

7.5. Lyubenova, A., Slavov, S., & Kostov, K. (2019). *In vitro* susceptibility to fungicides by *Phytophthora* species isolated from different ecosystems in Bulgaria. *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans*, 22(2), 205–211. <https://jmabonline.com/en/article/bICRWojZQ0cyBbrCDXZA>

Abstract

Six *Phytophthora* species originating from Bulgaria (*Phytophthora rosacearum*, *P. cryptogea*, *P. plurivora*, *P. cambivora*, *P. citricola* and *P. megasperma*) were tested in *in vitro* experiment for susceptibility to different fungicides. Four popular fungicides registered for control of the *Oomycetes* were used: Verita WG (667 g/kg fosetyl aluminum and 44 g/kg fenamidone), Acrobat M DG (90 g/kg dimethomorph and 600 g/kg mancozeb), Infinito SC (625 g/l propamocarb hydrochloride and 62.5 g/l fluopicolide) and Ridomil Gold MZ 68 WP (64% mancozeb and 4% metalaxyl-M). The four fungicides exhibited varying mycelial growth inhibiting effect on the tested isolates. Among the tested isolates, the most sensitive to all fungicides was *P. rosacearum* T 8/2. The fungicide Verita had the lowest impact on the growth of isolates in the *in vitro* experiments, which may be explained by its action mechanism.

Резюме

Шест вида *Phytophthora* с произход от България (*Phytophthora rosacearum*, *P. cryptogea*, *P. plurivora*, *P. cambivora*, *P. citricola* и *P. megasperma*) бяха тествани в *in vitro* експеримент за чувствителност към различни фунгициди. Използвани са четири популярни фунгицида, регистрирани за контрол на оомицетите: Verita WG (667 g/kg фосетил алуминий и 44 g/kg фенамидон), Acrobat M DG (90 g/kg диметоморф и 600 g/kg манкозеб), Infinito SC (625 g/l пропамокарб хидрохлорид и 62.5 g/l флуопиколоид) и Ridomil Gold MZ 68 WP (64% манкозеб и 4% металаксил-М). Четирите фунгицида проявиха различен инхибиращ ефект върху растежа на мицела на тестваните изолати. Най-чувствителен към всички фунгициди е *P. rosacearum* Т 8/2. Фунгицидът Verita е оказал най-слабо влияние върху растежа на изолатите в *in vitro* експериментите, което може да се обясни с механизма му на действие.

7.6. Slavov, S., Christova, P., Kostov, K., & **Lyubenova, A.** (2019). *Phytophthora* Species Inhabiting Middle and Lower Watercourse of Tundzha River in Bulgaria. *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans*, 22(1), 270–281. <https://jmabonline.com/en/article/nG55ds8UYMKssCWIInbyo>

Abstract

Identification of *Phytophthora* species along the Tundzha River in Bulgaria was conducted as a part of thorough research on the distribution of those organisms in the rivers of the country. The isolation of oomycete species of the genus *Phytophthora* was performed by baiting method with *Rhododendron* leaves, placed in areas of middle and lower watercourse of the river. The exact species of obtained isolates were determined on the base of colony and spore morphology and sequence analyses of the ITS region of the nuclear DNA. A difference in the composition of *Phytophthora* species inhabiting the middle and lower course of the river was found. In the middle stream of the river predominantly the species *P. citricola* and *P. plurivora* were registered which are known as pathogens with wide host range including raspberry, hop, orchards (walnut, almond, apricot, peach, cherry) often grown in mountain and semi mountain areas, as well as forest trees (beech, oak, chestnut, poplar). In the lower flow of the river mainly the weak pathogenic species *P. lacustris* was isolated. *P. hydropathica* was also found in both middle and down streams of the Tundzha River.

Резюме

Идентифицирането на видове *Phytophthora* по поречието на река Тунджа в България е проведено като част от задълбочено проучване на разпространението на тези организми в реките на страната. Изолването на оомицетни видове от род *Phytophthora* е извършено чрез метод на примамка с листа от род рододендрон, поставени в участъци от средното и долното течение на реката. Точният вид на получените изолати е определен въз основа на морфологията на колонии и спорите и секвенционния анализ на ITS региона на ядрената ДНК. Установена е разлика в състава

на видовете *Phytophthora*, обитаващи средното и долното течение на реката. В средното течение на реката са регистрирани предимно видовете *P. citricola* и *P. plurivora*, които са известни като патогени с широк спектър от гостоприемници, включително малина, хмел, овощни градини (орех, бадем, кайсия, праскова, череша), често отглеждани в планински и полупланински райони, както и горски дървета (бук, дъб, кестен, топола). В долното течение на реката е изолиран предимно слабо патогенният вид *P. lacustris*. *P. hydropathica* е открита също както в средното, така и в долното течение на река Тунджа

7.7. Ivaylo N. Tsvetkov, **Aneta Lyubenova**, Nikolina Tzvetkova, & Slavtcho Slavov. (2019). Initial physiological responses of *Quercus* spp. and *Castanea sativa* Mill. Seedlings infected with *Phytophthora* spp. *Silva Balcanica*, 20(3), 87–96. <https://silvabalcanica.wordpress.com/wp-content/uploads/2020/03/sb-203-2019-071-085.pdf>

Abstract

Some aspects underlying the ‘host-pathogen’ interactions are of key importance for better understanding the mechanism of infection. This study was aimed at exploring the dynamics of the early stage photosynthetically-based responses in young seedlings of three forest species (*Quercus cerris* L., *Quercus rubra* L. and *Castanea sativa* Mill.) infected with *Phytophthora* spp. Three-month container-grown plants have been inoculated with three different species of *Phytophthora* (*P. cactorum*, *P. plurivora* and *P. quercina*). The net CO₂ assimilation, stomatal conduction and transpiration was measured at biweekly intervals during the early post-inoculation period (over nine weeks). The dynamics of the photosynthesis-related parameters was analysed and commented in the frame of the specificity of both the host and pathogen species. While the different species of *Phytophthora* did not essentially affect the surveyed physiological reactions during the initial stage of the infection, the turkey oak (*Q. cerris* L.) performed differentially as a result of the pathogen inoculation. The specificity of the performance of *Q. cerris* might be linked to its generally higher tolerance to unfavourable environmental conditions.

Резюме

Някои аспекти, лежащи в основата на взаимодействията „гостоприемник-патоген“, са от ключово значение за по-доброто разбиране на механизма на инфекцията. Това проучване имаше за цел да изследва динамиката на фотосинтетичните реакции в ранен стадий при млади фиданки на три горски вида (*Quercus cerris* L., *Quercus rubra* L. и *Castanea sativa* Mill.), заразени с *Phytophthora* spp. Тримесечни растения, отглеждани в контейнери, са инокулирани с три различни вида *Phytophthora* (*P. cactorum*, *P. plurivora* и *P. quercina*). Нетната асимилация на CO₂, устичната проводимост и транспирацията са измервани на интервали от две седмици по време на ранния период след инокулацията (в продължение на девет седмици). Динамиката на параметрите,

свързани с фотосинтезата, е анализирана и коментирана в рамките на специфичността както на вида гостоприемник, така и на вида патоген. Докато различните видове *Phytophthora* не са повлияли съществено на изследваните физиологични реакции по време на началния етап на инфекцията, церът (*Q. cerris* L.) се е представил различно в резултат на инокулацията с патогена. Специфичността на представянето на *Q. cerris* може да се свърже с неговата по-висока толерантност към неблагоприятни условия на околната среда като цяло.

7.8. Kostov, K., Christova, P., **Lyubenova, A.**, & Slavov, S. (2019). Distribution of *Phytophthora gonapodyides* in Mountain River Systems of Bulgaria. *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans*, 22(1), 282–293. <https://jmabonline.com/en/article/nG55ds8UYMKssCWInbyo>

Abstract

In order to study the distribution and diversity of *Phytophthora* species in mountain river systems (from 700 to 2000 m. above sea level) of Bulgaria rhododendron "baits" were placed along the rivers in Vitosha, Plana, Ruy, Rila, Rhodopes and Balkan Mountains. The identity of the obtained isolates was determined on the basis of genetic similarities with known species. From overall 37 isolates 67% belong to *Phytophthora gonapodyides*, a species often isolated from rivers and riparian ecosystems. According to the literature, it demonstrates weak to moderate pathogenicity to some important for Bulgaria forest tree species, such as oak and beech by causing root rot. Its distribution must be taken into account when creating new forest stands involving sensitive species, in places with increased soil moisture and using surface water for irrigation.

Резюме

С цел изследване на разпространението и видовото разнообразие на *Phytophthora* spp. в планински речни системи (от 700 до 2000 m надморска височина) в България са заложени "уловки" с листа от рододендрон по протежението на реки на територията на планините Витоша, Плана, Руй, Рила, Родопи и Стара планина. Видовата принадлежност на получените изолати е определена на база генетични сходства с известни видове. От общо 37 изолати 67% принадлежат към *Phytophthora gonapodyides*, вид често изолиран от реки и крайречни екосистеми. По литературни данни той е с умерен до слаб патогенитет спрямо някои основни за България горски дървесни видове като дъб и бук, като е установено, че е способен да причинява гниене на кореновата система. Наличието му трябва да се има предвид при създаване на нови горски насаждения с участието на чувствителни видове, на места с повишена почвена влажност и при използването на повърхностни води за напояване.

7.9. Christova, P., Kostov, K., **Lyubenova, A.**, & Slavov, S. (2019). Occurrence and diversity of *Phytophthora* species in mountain area of Vit River. *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans*, 22(1), 259–269. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/pdf/10.5555/20203328839>

Abstract

The aim of this study is isolation and identification of *Phytophthora* species in the mountain area of Vit River. Fifteen *Phytophthora* isolates were recovered from six different locations in the river (Beli Vit River, Cherni Vit River and shortly after their interflow in the region of Teteven town) using a baiting method. The phylogenetic analysis of ITS sequences of collected isolates determined occurrence of four *Phytophthora* species – *P. gonapodyides*, *P. lacustris*, *P. chlamydospora* and *P. syringae*. Three of these species (*P. lacustris*, *P. gonapodyides* and *P. chlamydospora*) belong to clade 6 of the genus *Phytophthora*, whereas *P. syringae* is a member of clade 8. *P. gonapodyides* and *P. syringae* were defined as the most common *Phytophthora* species in the investigated mountain region of Vit River and represent respectively 40% and 33% of the collected isolates. The pathogenicity of selected isolates from each of collected *Phytophthora* species to blackcurrant and chokeberry was evaluated and the ability of *P. lacustris*, and *P. gonapodyides* to infect leaves of both plant species was proved.

Резюме

Целта на това изследване е изолиране и идентифициране на видове от род *Phytophthora* в планинската част на р. Вит. Получени са 15 изолата принадлежащи към *Phytophthora* spp. от шест различни локации на реката (р. Бели Вит, р. Черни Вит и малко след сливането им в района на гр. Тетевен) по метода на уловките. Филогенетичният анализ на ITS секвенциите на събраните изолати показва наличието на четири вида *Phytophthora* – *P. gonapodyides*, *P. lacustris*, *P. chlamydospora* и *P. syringae*. Три от тези видове (*P. lacustris*, *P. gonapodyides* и *P. chlamydospora*) принадлежат към клад 6 на род *Phytophthora*, докато *P. syringae* е представител на клад 8. *P. gonapodyides* и *P. syringae* са определени като най- често срещани видове *Phytophthora* в изследвания планински район на река Вит и представляват съответно 40% и 33% от събраните изолати. Анализирана е патогенността на избрани изолати от четирите вида *Phytophthora* към касис и арония и е доказана способността на *P. lacustris*, *P. chlamydospora* и *P. gonapodyides* да заразяват листа от двата растителни вида.

7.10. S. Slavov, **A. Lyubenova**, K. Kostov, P. Christova, & G. Bardarska. (2020). Influence of sewage sludge application on the growth and development of forest plant species. *FOREST SCIENCE, Special Issue*. <https://naukazagorata.files.wordpress.com/2021/02/17-slavov-et-al.pdf>

Summary

The aim of the study is to assess and characterize the infectious risk of wastewater treatment sludge from a phytopathological perspective, as well as the impact of sludge on the development of young woody plants if applied as soil improvers in forestry. Traditional microbiological and contemporary molecular methods were used for identification of potentially dangerous for the forest flora microorganisms along wastewater route in WWTP Batanovtsi as well as in the final product (stabilized dehydrated sludge). Pot and field experiments were carried out in order to establish the influence of wastewater sludge on the growth and development of black and scots pine, sessile oak, Turkish oak and black locust. The fungal isolates obtained from the sludge did not show phytopathogenicity in the performed tests. The inclusion of sludge in soil mixtures for growing of seedlings in pots had a positive effect on the growth of black locust seedlings and a negative effect on sessile oak, scots pine and black pine. The use of dry sludge from Batanovtsi WWTP on previously burned terrain afforested with black pine had a negative impact on plant growth and development. We conclude that before using sludge from waste water treatment plants in nurseries or burned forest terrains, a thorough study of the possible impact on the growth and development of each particular plant species is required

Резюме

Целта на изследването е оценка и характеризиране на инфекциозния риск от фитопатологична гледна точка на утайки, получени от пречистване на отпадъчни води за евентуалното им прилагане като почвени подобрители в горското стопанство и оценка на тяхното влияние върху развитието на млади горски растения. Използвани са традиционни microbiological и съвременни молекулярни методи за установяването на потенциално опасни за горската флора видове микроорганизми както по пътя на отпадъчните води в ПСОВ гр. Батановци, така и в крайния продукт (стабилизирана обезводнена утайка). Проведени са съдови опити за установяване на влиянието на утайките върху растежа и развитието на бял и черен бор, зимен дъб, цер и бяла акация, както и теренен опит с черен бор. Получените от утайките гъбни изолати не проявиха фитопатогенност в проведените тестове. При включването на утайки в почвени смеси за отглеждане на фиданки в саксийни условия е отчетено положително влияние върху растежа на бялата акация и негативно влияние при зимен дъб, бял бор и черен бор. Внасянето на сухи утайки от ПСОВ Батановци на опожарен терен залесен с черен бор, влияе негативно върху растежа и развитието на растенията. При използване на утайки от пречиствателните станции в разсадници или опожарени горски терени е необходимо предварително обстойно изследване на влиянието им върху растежа и развитието на всеки конкретен растителен вид.

- 7.11. **Lyubenova, A.**, Rusanova, M., Nikolova, M., & Slavov, S. B. (2023). Plant extracts and *Trichoderma* spp: Possibilities for implementation in agriculture as biopesticides. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 37(1), 159–166. <https://doi.org/10.1080/13102818.2023.2166869>

Abstract

The overuse of agrochemicals and development of pesticide resistance in plant pathogens is a main challenge in conventional agriculture. The use of biopesticides based on natural substances is recognized as an effective alternative of conventional pesticides. Besides the beneficial microorganisms, some plant species can be a source of microbiologically active compounds. Among the most promising are *Origanum vulgare* ssp. *hirtum*, *Centaurea finazzi*, *Achillea crithmifolia*, *Artemisia* spp, *Thymus pulegioides*, *Tanacetum parthenium*, *Clinopodium vulgare*, *Salvia sclarea*, *Lavandula officinalis* and *Mentha piperita*. The filamentous fungi from genus *Trichoderma* are some of the most studied biocontrol agents because of their versatile mode of action. They employ several different strategies to combat plant pathogens, like direct mycoparasitism, production of enzymes and antibiotic substances, competition, ability to induce resistance in plants to a variety of stresses. Cost-effective cultivation and mass production of *Trichoderma* sp. biomass and formulations will allow utilization of locally available low-cost materials, such as different wastes and by-products that could be used as a growth substrate for production of adequate biomass containing effective propagules with or without minimal adjustments to the composition of cultivation media. This review outlines the two major mass production methods - solid and liquid state fermentation of *Trichoderma* spp. The possibilities for development of novel products for the bioindustry are highlighted.

Резюме

Прекомерната употреба на агрохимикали и развиването на резистентност към пестициди при растителните патогени е основно предизвикателство в конвенционалното земеделие. Използването на биопестициди на базата на естествени вещества е признато за ефективна алтернатива на конвенционалните пестициди. Освен полезните микроорганизми, някои растителни видове могат да бъдат източник на микробиологично активни съединения. Сред най-обещаващите са *Origanum vulgare* ssp. *hirtum*, *Centaurea finazzi*, *Achillea crithmifolia*, *Artemisia* spp., *Thymus pulegioides*, *Tanacetum parthenium*, *Clinopodium vulgare*, *Salvia sclarea*, *Lavandula officinalis* и *Mentha piperita*. Нишковидните гъби от род *Trichoderma* са едни от най-изследваните биоконтролни агенти поради гъвкавия си начин на действие. Те използват няколко различни стратегии за борба с растителните патогени, като директен микопаразитизъм, производство на ензими и антибиотични вещества, конкуренция, способност за индуциране на резистентност в растенията към различни стресови фактори. Рентабилното култивиране и масовото производство на биомаса и формулировки на

базата на *Trichoderma* sp. ще позволят използването на локално достъпни евтини материали, като например различни отпадъци и странични продукти, които биха могли да се използват като растежен субстрат за производство на адекватна биомаса, съдържаща ефективни пропагули, със или без минимални корекции в състава на култивационните среди. Този преглед очертава двата основни метода за масово производство - ферментация в твърдо и течено състояние на *Trichoderma* spp. Подчертават се възможностите за разработване на нови продукти за биоиндустрията.

7.12. Lyubenova, A., Georgieva, L., & Antonova, V. (2023). Utilization of plant secondary metabolites for plant protection. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 37(1), 2297533. <https://doi.org/10.1080/13102818.2023.2297533>

Abstract

In the past two decades, the need for a new concept in agriculture has emerged. The new “Greener revolution” should rely on the implementation of sustainable practices in crop production and the achievement of increased yields under the conditions of reduction of water, fertilizer, and pesticide use. The utilization of plant secondary metabolites is viewed by many authors as a possible alternative to synthetic chemicals. Bioactive botanical compounds can be obtained from plants in the form of extracts, essential oils (EO), or both. There are four main groups of plant secondary metabolites depending on their chemical structure: terpenes, phenolics, nitrogen-, and sulfur-containing compounds. A growing body of publications is devoted to the pesticidal properties of various secondary metabolites obtained from plants. The botanical families *Meliaceae*, *Rutaceae*, *Asteraceae*, *Annonaceae*, *Labiatae*, and *Canellaceae* include the most valuable species that are rich in secondary metabolites. The strong fumigant properties of the EOs from many plant species make them attractive in different Integrated Post-Harvest Pest Management systems. Suitable carriers for EOs delivery can be designed using nanoencapsulation. On a worldwide scale, the main botanical insecticides that are commercially available at present are Pyrethrum, Azadirachtin from Neem, and EOs from various plant species. Among the botanicals with considerable antimicrobial activity, there are some successfully authorized and developed commercial phenolics, terpenes, and alkaloids. Among the proven active substances are cinnamaldehyde, l-glutamic acid and gamma-aminobutyric acid, Jojoba oil, essential oils, and others.

Резюме

През последните две десетилетия се появи необходимостта от нова концепция в селското стопанство. Новата „по-зелена революция“ трябва да се основава на прилагането на устойчиви практики в производството на култури и постигането на повишени добиви при условия на намаляване на употребата на вода, торове и пестициди. Използването на растителни вторични метаболити се разглежда от много автори като възможна алтернатива на синтетичните химикали.

Биоактивните ботанически съединения могат да бъдат получени от растения под формата на екстракти, етерични масла (ЕМ) или и двете. Съществуват четири основни групи растителни вторични метаболити в зависимост от тяхната химическа структура: терпени, феноли, азот- и сяросъдържащи съединения. Все по-голям брой публикации са посветени на пестицидните свойства на различни вторични метаболити, получени от растения. Ботаническите семейства *Meliaceae*, *Rutaceae*, *Asteraceae*, *Annonaceae*, *Labiatae* и *Canellaceae* включват най-ценните видове, богати на вторични метаболити. Силните фумигантни свойства на ЕМ от много растителни видове ги правят привлекателни в различни интегрирани системи за борба с вредителите след прибиране на реколтата. Подходящи носители за доставяне на ЕМ могат да бъдат проектирани с помощта на нанокапсулиране. В световен мащаб основните ботанически инсектициди, които се предлагат на пазара в момента, са пиретрум, азадирахтин от нийм и етиленгликоли от различни растителни видове. Сред ботаническите продукти със значителна антимикробна активност има някои успешно одобрени и разработени търговски феноли, терпени и алкалоиди. Сред доказаните активни вещества са цинамалдехид, l-глутаминова киселина и гама-аминомаслена киселина, масло от жожоба, етерични масла и други.

7.13. Avramov, Z., **Lyubenova, A.**, Kostov, K., Koleva, L., & Slavov, S. (2023). Canes Wilting with Collar and Root Rot of Raspberry Caused by *Phytophthora pseudocryptogea* in Bulgaria. *Scientific Papers-Series B-Horticulture*, 67(1), 23–28. <https://horticulturejournal.usamv.ro/index.php/scientific-papers/issues?id=1270>

Abstract

A wide range of herbaceous and woody plant species are known as host plants of *Phytophthora pseudocryptogea*, a relatively newly described species. Recently *P. pseudocryptogea* was isolated from raspberry plants in Bulgaria. Diseased plants were found in the 4 to 5 years old variety Ljulin plants on the biological production orchards in Kostenets region. Canes suddenly wilt and turn brown at the onset of warm temperatures. The plants manifested disease symptoms such as collar and root rot. The precise species determination of obtained isolate was done on the basis of the colony and asexual spores morphology and sequence analyses of the ITS region of the nuclear DNA. The pathogenicity of the fungus was tested by detached leaf bioassay on several raspberry cultivars in the laboratory.

Резюме

Широка гама от тревисти и дървесни растителни видове са известни като гостоприемници на *Phytophthora pseudocryptogea* – сравнително наскоро описан вид. Неотдавна *P. pseudocryptogea* беше изолирана от малинови насаждения в България. Заразени растения от сорт „Люлин“ бяха открити в 4-5 годишни биологични малинови насаждения в района на Костенец. С повишаването

на температурите стъблата внезапно увяхват и покафеняват. Растенията проявяват симптоми на гниене на корените и кореновата шийка. Точното таксономично определяне на получения изолат беше извършено въз основа на морфологията на колонииите, безполовите спори и секвенционен анализ на ITS региона на ядрената ДНК. Патогенността на оомицета беше тествана в лабораторни условия чрез биологичен тест с отделени листа от няколко сорта малини.

7.14. Lyubenova, A., Nikolova, M., & Slavov, S. B. (2024). Impact of *O. vulgare* subsp. *hirtum* (Link) Ietswaart derived extracts and essential oil on plant pathogens from genus *Phytophthora*. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*. https://journal.agrojournal.org/page/en/details.php?article_id=4784

Abstract

In the present study we evaluate the potential of essential oil and extracts obtained from Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart) to inhibit the mycelial growth of economically important plant pathogens from genus *Phytophthora*. The metabolite profiles of the essential oil, exudate, extract and methanolic polarity-based fractions were analyzed by GC/MS. The inhibitory activity of the essential oil and extracts against *P. nicotianae* var. *nicotianae*, *P. rosacearum*, *P. citricola*, *P. plurivora* and *P. cryptogea* was evaluated in an *in vitro* bioassay. Carvacrol (55.48%), p-cymene (11.06%) and γ -terpinene (15.04%) were the most abundant in the essential oil composition. In the acetone exudate and non-polar fraction, the main compound was carvacrol (48.15% and 50.34% respectively). In least amount carvacrol was found in the methanolic extract (13.24%) and completely absent in the polar fraction, where carbohydrates were the most abundant. All *Phytophthora* isolates responded to extracts and essential oil treatments with a decline of the vegetative growth to a different extend. A complete inhibitory effect was observed with *P. nicotianae* var. *nicotianae* in the essential oil, nonpolar fraction, acetone exudate and methanol extract variants, while the mycelial growth of *P. cryptogea* and *P. plurivora* was inhibited to a moderate degree. *P. rosacearum* was the most tolerant among tested oomycete representatives in these variants. We conclude that the economically important *Phytophthora* species, investigated in this study are susceptible to the impact of essential oil, methanol extract, the methanol's non-polar fraction, and acetone exudates of the aromatic plant *O. vulgare* subsp. *hirtum*. Essential oil, methanol extract, acetone exudate and non-polar fraction of Greek oregano are rich of carvacrol and could find further application in different sustainable crop protection systems

Резюме

В настоящото изследване оценяваме потенциала на етеричното масло и екстрактите, получени от гръцки риган (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart), за инхибиране на мицелния растеж на икономически важни растителни патогени от род *Phytophthora*. Метаболитните профили на

етеричното масло, ексудата, екстракта и метанолните фракции, базирани на полярност, бяха анализирани чрез GC/MS. Инхибиторната активност на етеричното масло и екстрактите спрямо *P. nicotianae* var. *nicotianae*, *P. rosacearum*, *P. citricola*, *P. plurivora* и *P. cryptogea* беше оценена в *in vitro* биологичен анализ. Карвакрол (55,48%), р-цимен (11,06%) и γ-терпинен (15,04%) бяха в най-голямо количество в състава на етеричното масло. В ацетонния ексудат и неполярната фракция основното съединение беше карвакрол (съответно 48,15% и 50,34%). Най-малко количество карвакрол беше открит в метанолния екстракт (13,24%) и напълно липсваше в полярната фракция, където въглехидратите бяха най-изобилни. Всички изолати на *Phytophthora* реагираха на третиране с екстракти и етерични масла с намаляване на вегетативния растеж в различна степен. Пълен инхибиторен ефект беше наблюдаван при *P. nicotianae* var. *nicotianae* във вариантите с етерично масло, неполярна фракция, ацетонния ексудат и метанолов екстракт, докато мицелният растеж на *P. cryptogea* и *P. plurivora* беше инхибиран в умерена степен. *P. rosacearum* беше най-толерантен сред тестваните представители на оомицетите в тези варианти. Заклучваме, че икономически важните видове от род *Phytophthora*, изследвани в това проучване, са чувствителни към въздействието на етерично масло, метанолов екстракт, неполярната фракция на метанола и ацетонови ексудати на ароматното растение *O. vulgare* subsp. *hirtum*. Етеричното масло, метаноловият екстракт, ацетоновият ексудат и неполярната фракция от гръцки риган са богати на карвакрол и биха могли да намерят по-нататъшно приложение в различни устойчиви системи за растителна защита.

7.15. **Lyubenova, A., & Dimitrova-Mateva, P. (2025).** Severe Dieback of European Ash Shelterbelts in Northeastern Bulgaria Associated with *Diplodia fraxini*. *Forests*, 16, 1701. <https://doi.org/10.3390/f16111701>

Abstract

The Common European ash (*Fraxinus excelsior* L.) is one of the main species constituting the field protection forest belts in Northeastern Bulgaria. Studies conducted in shelterbelts in Dobrich and Balchik in July 2020 and in Tutrakan and Dulovo in June–July 2022 revealed severe dieback of ash. The observed symptoms included density thinning of the crowns, dieback of branches, presence of sunken necrotic cankers, and light green to yellow foliage and premature defoliation. Parts of the shelterbelts were completely destroyed with 100% tree mortality. To determine whether the invasive *Hymenoscyphus fraxineus* or other pathogens are present in the ash field protective forest belts in Northeastern Bulgaria, fungal isolation was undertaken. Samples were collected from four locations: Dobrich and Balchik in June 2020, and Tutrakan and Dulovo in June–July 2022. The morphology, temperature-growth rate relationships, and pathogenicity of the two pathogenic fungal species isolated in this study - *Diplodia*

fraxini and *Diplodia seriata* were examined. Morphological and physiological studies confirm the molecular identification of the obtained plant pathogens. The *Diplodia fraxini* isolates (Dobrich 3, Tutrakan 2, and Dulovo 4) showed mycelial growth between 5 °C and 35 °C, with minimal growth at 5 °C (0.20–0.27 mm/day) and an optimum growth rate of 3.9–4.5 mm/day at 20–25 °C. Growth declined sharply above 30 °C, ceasing entirely at 35 °C. In contrast, *D. seriata* (Dulovo 5) exhibited higher growth rates, showing limited growth above 5 °C (~1 mm/day), and maximum growth of approximately 8 mm/day at 25 °C. Growth in *D. seriata* remained moderate up to 35 °C and ceased near 40 °C, indicating a broader temperature tolerance and higher upper thermal limit than *D. fraxini*. The results from the pathogenicity tests show that *D. fraxini* can cause necrosis on ash - both on leaves and twigs - and is likely involved in the investigated ash decline cases. Further studies of the spread and epidemiology of *D. fraxini* are needed in order to establish its occurrence on the territory of Bulgaria.

Резюме

Обикновеният ясен (*Fraxinus excelsior* L.) е един от основните видове, съставляващи полезащитните горски пояси в Североизточна България. Проучвания, проведени в защитни пояси в Добрич и Балчик през юли 2020 г. и в Тутракан и Дулово през юни-юли 2022 г., разкриха масово съхнене на ясена. Наблюдаваните симптоми включват изтъняване на гъстотата на короните, изсъхване на клоните, наличие на хлътнали некротични язви, светложелена до жълта листна маса и преждевременно обезлистване. Части от защитните пояси бяха напълно унищожени със 100% смъртност на дърветата. За да се определи дали инвазивният *Hymenoscyphus fraxineus* или други патогени присъстват в защитните горски пояси на ясеновите полета в Североизточна България, бяха събрани проби за изолиране на патогенни гъби. Проби са събрани от четири места: Добрич и Балчик през юни 2020 г. и Тутракан и Дулово през юни-юли 2022 г. Изследвани са морфологията, зависимостите температура-скорост на растеж и патогенността на двата вида гъби, изолирани в това проучване - *Diplodia fraxini* и *Diplodia seriata*. Морфологичните и физиологичните изследвания потвърждават молекулярната идентификация на получените растителни патогени. Изолатите на *Diplodia fraxini* (Добрич 3, Тутракан 2 и Дулово 4) се развиват при температури между 5°C и 35°C, с минимален растеж при 5°C (0,20–0,27 mm/ден) и оптимална скорост на растеж от 3,9–4,5 mm/ден при 20–25°C. Темпът на растежа рязко намалява над 30°C, спирайки напълно при 35°C. За разлика от него, *D. seriata* (Дулово 5) се характеризира с по-високи темпове на растеж, като проявява ограничено развитие при температури над 5°C (~1 mm/ден) и достига максимална скорост на растеж около 8 mm/ден при 25°C. Растежът при *D. seriata* остава умерен до 35°C и спира близо до 40°C, което показва по-широка температурна толерантност и по-висока горна термична граница в сравнение с *D. fraxini*. Резултатите от тестовете за патогенност показват, че *D. fraxini* може да причини некроза по тъканите на ясена - както по листата, така и по клонките

и вероятно е замесен в изследваните случаи на увяхване на ясена. Необходими са допълнителни проучвания на разпространението и епидемиологията на *D. fraxini*, за да се установи разпространението му на територията на България.

7.16. Lyubenova, A. (2025). *Botrytis elliptica*: Discovery in Bulgaria and characterization. *AS*, 17(46), 22–28. <https://doi.org/10.22620/agrisci.2025.46.003>

Abstract

Lilies are grown for various purposes and rank among the top flower bulbs and cut flowers globally. *Botrytis* blight impacts lilies in almost all cultivation areas and is regarded as the primary foliar disease affecting *Lilium* spp. *Botrytis elliptica* is considered a limiting factor in the cultivation of ornamental lilies, being one of the most common *Botrytis* species impacting *Lilium* spp, together with *B. cinerea*. In the current study is described the isolation and identification of *B. elliptica* from *Lilium* sp. in Bulgaria. Manifestation of the disease include oblong purple-brown lesions on the leaves and crown rot. Initially, on potato dextrose agar (PDA) *B. elliptica* formed white colonies which turn gray with the aging of the mycelia and black sclerotia appear in older cultures. The ITS region sequences of isolate Krem Pernik are 100% identical to those of *B. elliptica* isolates deposited in the NCBI GenBank. The conidiospores are predominantly ovoid and ellipsoid, smooth, and translucent with average size of 23.95 µm in length and 17.61 µm in width, with a corresponding ratio of 1.37. The established general growth temperatures for *B. elliptica* isolate are as follows: minimal above 5°C, optimal 20°C and maximum below 30°C. The isolate form necrotic lesions on *Lilium* leaves, but not on *Capsicum annum*. The presence of economically important pathogen on *Lilium* is confirmed in Bulgaria, based on morphology, molecular and pathogenicity tests.

Резюме

Лилиите се отглеждат за различни цели и се нареждат сред най-популярните луковични и рязани цветя в световен мащаб. *Botrytis* засяга лилиите в почти всички райони на отглеждане и се счита за основната листна болест, засягаща вид *Lilium*. *Botrytis elliptica* се счита за ограничаващ фактор при отглеждането на декоративни лилии, като е един от най-често срещаните видове *Botrytis*, засягащи род *Lilium*, заедно с *B. cinerea*. В настоящото изследване е описано изолирането и идентифицирането на *B. elliptica* от *Lilium* sp. в България. Проявите на заболяването включват продълговати лилаво-кафяви петна по листата и гниене на короната. Първоначално върху картофено-декстрозен агар (PDA) *B. elliptica* образува бели колонии, които стават сиви с остаряването на мицела, а в по-старите култури се появяват черни склероции. ITS секвенции на изолатат „Крем Перник“ са 100% идентични с тези на изолатите от *B. elliptica*, депозирани в NCBI GenBank. Конидиоспорите са предимно яйцевидни и елипсовидни, гладки и полупрозрачни, със среден размер от 23,95 µm дължина и 17,61 µm ширина, със съответно съотношение от 1,37.

Установените температури на растеж за изолата *B. elliptica* са следните: минимална над 5°C, оптимална 20°C и максимална под 30°C. Изолатът образува некротични петна по листата на *Lilium*, но не и по *Capsicum annum*. Наличието на икономически важен патоген по лилиите е потвърдено в България въз основа на морфологични, молекулярни и тестове за фитопатогенност.

- 7.17. Nikolova, M., Lyubenova, A., & Aneva, I. (2026). *Thymus longedentatus* essential oil and methanolic extract: Chemical composition and activity against filamentous plant pathogens. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 32(1), 130–136. <https://www.agrojournal.org/32/01-14.html>

Abstract

Thymus longedentatus (Degen & Urum.) Ronniger is a Balkan endemic species with a lemon-like odor that has a limited distribution in Bulgaria. The species has been studied phytochemically, and was successfully cultivated in the ex situ collection of IBER, BAS in the last years. The reported strong herbicidal properties for the species' essential oil (EO) led us to examine it for other pesticidal actions. The present study aimed to determine the chemical composition of *Thymus longedentatus* EO and methanolic extract (ME) and to evaluate their growth inhibitory activity against filamentous fungal and oomycete plant pathogens.

The chemical composition of EO and ME was studied, using gas-chromatography/mass spectrometry (GC/MS). The antifungal activity was evaluated by conducting in vitro bioassay towards economically important plant pathogens: *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* var. *fragariae*, *Fusarium oxysporum* var. *cyclaminis*, *Phytophthora cryptogea* and *Phytophthora nicotianae*. Citral isomers – neral (26.8%) and geranial (43.1%) were identified as the main components of the EO profile. Rosmarinic acid, chlorogenic acid, feruloylquinic acid, oleanolic acid, ursolic acid, micromeric acid, arbutin, geranic acid and hydroquinone were the main secondary metabolites in the methanolic extract. A strong inhibiting effect against *Botrytis cinerea*, *Phytophthora nicotianae* and *Phytophthora cryptogea* was established for the essential oil. Oppositely, the methanol extract, in which the Citral isomers were not found, did not affect the mycelial growth of the tested plant pathogens. The potency of the essential oil rich in Citral isomers, against oomycete and fungal plant pathogens is revealed

Резюме

Thymus longedentatus (Degen & Urum.) Ronniger е балкански ендемичен вид с лимоноподобна миризма, който има ограничено разпространение в България. Видът е изследван фитохимично и е

успешно култивиран в *ex situ* колекцията на ИБЕИ, БАН през последните години. Съобщените силни хербицидни свойства на етеричното масло (ЕМ) от вида ни накараха да го изследваме за други пестицидни действия. Настоящото изследване имаше за цел да определи химичния състав на ЕМ от *Thymus longedentatus* и метаноловия екстракт (МЕ) и да оцени тяхната инхибираща растежа активност срещу филаментозни гъбични и оомицетни растителни патогени. Химичният състав на ЕО и МЕ беше изследван с помощта на газова хроматография/маспектрометрия (GC/MS). Противогъбичната активност беше оценена чрез провеждане на *in vitro* биологичен анализ спрямо икономически важни растителни патогени: *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* var. *fragariae*, *Fusarium oxysporum* var. *cyclaminis*, *Phytophthora cryptogea* и *Phytophthora nicotianae*. Цитралните изомери – нерал (26,8%) и гераниал (43,1%) бяха идентифицирани като основни компоненти на теричномасленият профил. Розмаринова киселина, хлорогенова киселина, ферулоилхинова киселина, олеанолова киселина, урсолова киселина, микромерна киселина, арбутин, геранинова киселина и хидрохинон бяха основните вторични метаболити в метаноловия екстракт. За етеричното масло е установен силен инхибиращ ефект срещу *Botrytis cinerea*, *Phytophthora nicotianae* и *Phytophthora cryptogea*. Обратно, метаноловият екстракт, в който не са открити цитрални изомери, не е повлиял на мицелния растеж на тестваните растителни патогени. Разкрита е ефикасността на етеричното масло, богато на цитрални изомери, срещу оомицети и гъбни растителни патогени.

7.18. Lyubenova, A. (2026). *Phytophthora sojae* and other pathogens on soybean (*Glycine max* L. Merrill) detected in Bulgaria. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, (4).

Abstract

Soybean (*Glycine max* L.) production is increasingly threatened by a complex of pathogens, whose occurrence and impact remain insufficiently characterized under Bulgarian field conditions. During the 2020 and 2021 growing seasons, symptomatic soybean plants and soil samples were collected from the Soybean Experimental Station in Pavlikeni, Central Northern Bulgaria for identification of associated pathogens. Isolation and rhizosphere soil baiting assays yielded bacterial, fungal and oomycete isolates, which were identified using molecular sequencing of the ITS regions and comparison with reference sequences in the NCBI GenBank database. The pathogens identified included *Phytophthora sojae*, *Globisporangium ultimum*, *Alternaria alternata*, as well as bacterial pathogen *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. Here we report for the first time the association of *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* with soybean in Bulgaria. Morphological, physiological, and pathogenicity assays confirmed the identity of *P. sojae* and demonstrated differences in cultivar susceptibility, with cultivar Isidor showing high resistance and Srebrina and Daniela exhibiting high susceptibility. These findings

highlight the complex etiology of soybean diseases in Bulgaria and underscore the importance of pathogen monitoring and the use of resistant cultivars as key components of sustainable disease management strategies

Резюме

Производството на соя (*Glycine max* L.) е все по-застрашено от комплекс от патогени, чието разпространение и въздействие остават недостатъчно характеризирани при българските полски условия. През вегетационните сезони 2020 и 2021 г., симптоматични соеви растения и почвени проби бяха събрани от Опитната станция по соя в Павликени, Централна Северна България, за идентифициране на свързани със соята патогени. Изолирането от ризосферна почвата и анализите доведоха до получаването на бактерии, гъби и оомицети, които бяха идентифицирани чрез молекулярно секвениране на ITS регионите и сравнени с референтни последователности в базата данни на NCBI GenBank. Идентифицираните патогени включват *Phytophthora sojae*, *Globisporangium ultimum*, *Alternaria alternata*, както и бактериалния патоген *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. Тук за първи път докладваме за изолирането на *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* от соя в България. Морфологични, физиологични и фитопатологични анализи потвърдиха идентичността на *P. sojae* и демонстрираха разлики в чувствителността на сортовете, като сортът Изидор показва висока устойчивост, а Сребрина и Даниела - висока чувствителност. Тези открития демонстрират сложната етиология на болестите по соята в България и подчертават значението на мониторинга на патогените и използването на резистентни сортове като ключови компоненти на стратегиите за устойчиво управление на болестите.

7.19. Lyubenova, A., Baranowska, M., Menkis, A., Davydenko, K., Nowakowska, J., Borowik, P., & Oszako, T. (2024). Prospects for Oak Cultivation in Europe Under Changing Environmental Conditions and Increasing Pressure from Harmful Organisms. *Forests*, 15(12), 2164. <https://doi.org/10.3390/f15122164>

Abstract

It is assumed that climate change (global warming) worsens the living conditions for conifers and at the same time favours the cultivation of deciduous trees, including oaks. In fact, in Poland, for example, many more oaks are now being planted as forest-forming tree species than in the 1980s and 1990s. However, the monitoring of the health status of European forests (according to the International Co-operation Project) does not confirm these optimistic assumptions, and oak has been cited as one of the most damaged tree species in terms of defoliation in recent decades. The prospects for oak cultivation in

European forestry are therefore a combination of abiotic conditions and biotic damage factors. This review article focuses in particular on the new threats posed by pathogenic organisms causing emerging diseases. These include newly identified bacteria responsible for the so-called Acute Oak Decline (AOD), *Oomycetes* (especially those specialised in damaging fine roots, such as *Phytophthora quercina* T.Jung) and semi-parasites of the genus *Loranthus*. At the same time, the pressure from commonly observed insects and fungi described in connection with the complex syndrome of oak decline, which is divided into predisposing, inciting, and contributing factors (according to Manion's disease spiral), has not abated. Therefore, international, interdisciplinary research (such as that proposed in Oakland) is needed, using modern technologies (RS remote sensing) based on the comparison of satellite images (from different years), not only to inventory the most valuable oak stands in Europe (microrefugia) but also to identify trends in changes in their condition and biodiversity. As RS has its limitations (e.g., resolution), aerial monitoring should be complemented by quantitative and qualitative inventory from the ground, e.g., monitoring of the presence of soil microorganisms using effective molecular biological methods (e.g., Next-Generation Sequencing NGS).

Резюме: Предполага се, че изменението на климата (глобалното затопляне) влошава условията за живот на иглолистните дървета и същевременно благоприятства отглеждането на широколистни дървета, включително дъбове. Всъщност, в Полша например, сега се засаждат много повече дъбове като горообразуващи дървесни видове, отколкото през 80-те и 90-те години на миналия век. Мониторингът на здравното състояние на европейските гори (според Международния проект за сътрудничество) обаче не потвърждава тези оптимистични предположения и дъбът е посочен като един от най-увредените дървесни видове по отношение на обезлистването през последните десетилетия. Следователно перспективите за отглеждане на дъб в европейското горско стопанство зависят от комбинация от абиотични условия и биотични фактори на увреждане. Тази обзорна статия се фокусира по-специално върху новите заплахи, породени от патогенни организми, причиняващи нововъзникващи болести. Те включват новоидентифицирани бактерии, отговорни за така наречения Остър дъбов спад (AOD), оомицети (особено тези, специализирани в увреждане на фините корени, като *Phytophthora quercina* T.Jung) и полупаразити от рода *Loranthus*. В същото време, натискът от често наблюдавани насекоми и гъби, описани във връзка със сложния синдром на дъбов спад, който е разделен на предразполагащи, подбуждащи и допринасящи фактори (според спиралата на болестта на Манион), не е намалял. Следователно са необходими международни, интердисциплинарни изследвания (като предложените в Оукланд), използващи съвременни технологии (дистанционно наблюдение с радиочестотно сканиране), базирани на сравнение на сателитни изображения (от различни години), не само за инвентаризация на най-

ценните дъбови насаждения в Европа (микрорефугиуми), но и за идентифициране на тенденции в промените в тяхното състояние и биоразнообразие. Тъй като RS има своите ограничения (напр. резолюция), въздушният мониторинг трябва да бъде допълнен от количествена и качествена инвентаризация от земята, напр. мониторинг на наличието на почвени микроорганизми, използвайки ефективни молекулярно-биологични методи (напр. NGS за секвениране от следващо поколение).

7.20. Lyubenova, A., Nikolova, M., & Slavov, S. (2023). Inhibitory effect of Greek oregano extracts, fractions and essential oil on economically important plant pathogens on soybean. *Agricultural Science and Technology*, 15(12), 61–66.

Abstract

The inhibitory potential of Greek oregano extracts, fractions and essential oil on three economically important plant pathogens on soybean was examined. In vitro experiments were conducted to determine the effects of essential oil (EO), acetone exudate (AE), methanol extract (ME), and its polar (PF) and non-polar (NPF) fractions, originating from *O. vulgare* ssp. *hirtum* plants, on the mycelial growth of *Phytophthora sojae*, *Pythium debaryanum*, and *Alternaria alternata*, which were isolated from diseased soybean plants. Seven variants: EO, AE, ME, PF, NPF at concentrations of 100 mg/ml, blank (with the solvent - DMSO) and control (without treatment) were performed with all isolates. The mycelial growth of *P. sojae* was inhibited to the greatest extent - over 95% reduction of growth under the impact of EO, ME, AE and NPF. In *A. alternata* variant there was also a high degree of growth inhibition - most pronounced in EO variant (97%) and least in ME variant (78%). The weakest inhibitory effect of the studied extracts was observed in *P. debaryanum* – between 27% (NPF) and 36% (ME). In polar fraction treatments, growth enhancement was observed in *P. sojae* and *A. alternata*. Oregano essential oil, methanol extract, acetone exudate and non-polar fraction can be considered as promising candidate active compounds of potential biopesticide formulations for the control of soybean diseases.

Резюме

Изследван е инхибиторният потенциал на екстракти, фракции и етерично масло от гръцки риган върху три икономически важни растителни патогена по соята. Проведени са *in vitro* експерименти за определяне на ефектите на етерично масло (ЕМ), ацетонов ексудат (АЕ), метанолов екстракт (МЕ) и неговите полярни (ПФ) и неполярни (НПФ) фракции, получени от *O. vulgare* ssp. *hirtum*, върху мицелния растеж на *Phytophthora sojae*, *Pythium debaryanum* и *Alternaria alternata*, изолирани от болни соеви растения. Мицелният растеж на *P. sojae* е инхибиран в най-голяма степен - над 95% редуциране на растежа под въздействието на ЕО, МЕ, АЕ и НПФ. При *A. alternata* също е наблюдавана висока степен на инхибиране на растежа - най-силно изразено при варианта с ЕМ

(97%) и най-слабо при варианта с МЕ (78%). Най-слаб инхибиращ ефект на изследваните екстракти е наблюдаван при *P. debarianum* - между 27% (НПФ) и 36% (МЕ). При третирания с полярна фракция е наблюдавано усилване на растежа при *P. sojae* и *A. alternata*. Етерично масло от риган, метанолов екстракт, ацетонов ексудат и неполярна фракция могат да се разглеждат като обещаващи кандидат-активни съединения в потенциални биопестицидни формулировки за контрол на болести по соята.

7.21. Kostov, K., Christova, P., **Lyubenova, A.**, & Slavov, S. (2019). Diversity of Oomycete Species in the Riparian Ecosystem of Iskar Gorge. *Book 4 - Scientific Sessions of the Faculty of Biology*, 104, 90–99. https://www.uni-sofia.bg/index.php/eng/content/download/217048/1459639/version/2/file/KD_2018_11.pdf

Abstract

The fungus-like oomycete organisms are often associated with inland waters and riparian ecosystems. Some of them are primary saprophytes utilizing plant debris. Others are able to infect different plant species causing diseases, occasionally with devastating intensity. Rivers are major environment and distribution route of these organisms and as such their presence and composition in the inland waters is a subject of intensive research in the last years. In order to study the diversity of the oomycete species, with an accent to those which belong to genus *Phytophthora*, in the longest river in Bulgaria - Iskar, we have used a "baiting" method to catch swimming zoospores. "Baits" were placed in the river at 7 locations along the Iskar Gorge. The collected isolates were grown on nutrient media for their morphological and genetic characterization. As a result, we have found species of 3 genera - *Phytophthora*, *Phytophythium* and *Pythium* with respectively 3 (*Phytophthora lacustris*, *Phytophthora gonapodyides*, *Phytophthora chlamydospora*), 2 (*Phytophythium litorale*, *Phytophythium montanum*) and 1 (*Pythium* sp.) representatives. All the above *Phytophthora* species are phylogenetically related as members of clade 6, the representatives of which are commonly isolated from rivers. Some of these species had demonstrated weak to moderate pathogenicity against several plant species in controlled experiments. Most of the oomycete species we found are probably natural inhabitants of the studied riparian ecosystem. No quarantine species have been found.

Резюме

Гъбоподобните оомицетни организми често са свързани с вътрешни водоеми и крайречни екосистеми. Някои от тях са първични сапрофити, използващи растителни остатъци. Други са способни да заразяват различни растителни видове, причинявайки болести, понякога с опустошителна интензивност. Реките са основна среда и път на разпространение на тези

организми и като такива тяхното присъствие и състав във вътрешните водоеми е обект на интензивни изследвания през последните години. За да проучим разнообразието на видовете оомицети, с акцент върху тези, които принадлежат към род *Phytophthora*, в най-дългата река в България - Искър, използвахме метод на "примамка", за да уловим плуващи зооспори. "Примамки" бяха поставени в реката на 7 места по протежение на Искърското дефиле. Събраните изолати бяха култивирани върху хранителни среди за тяхното морфологично и генетично характеризиране. В резултат на изследването бяха идентифицирани видове от три рода – *Phytophthora*, *Phytopythium* и *Pythium*, а именно: *Phytophthora lacustris*, *Phytophthora gonapodyides*, *Phytophthora chlamydospora*, *Phytopythium litorale*, *Phytopythium montanum* и *Pythium* sp. Всички изолирани представители на род *Phytophthora* са филогенетично свързани в клад 6, чиито членове обикновено се изолират от речни екосистеми. При контролирани експерименти някои от тези видове проявяват слаба до умерена патогенност спрямо няколко растителни вида. Повечето от установените оомицети вероятно са естествени обитатели на изследваната крайречна екосистема. Не са констатирани карантинни видове.