СЕЛСКОСТОПАНСКА АКАДЕМИЯ

ИНСТИТУТ ПО ПОЧВОЗНАНИЕ, АГРОТЕХНОЛОГИИ
И ЗАЩИТА НА РАСТЕНИЯТА

ПОЧВЕНИ ПАТОГЕННИ ГЪБИ ПО ЖИТНИ КУЛТУРИ: ВИДОВ СЪСТАВ, РАЗПРОСТРАНЕНИЕ, МЕТОДИ И СРЕДСТВА ЗА БОРБА

ИВО ТОДОРОВ ЯНАШКОВ

АВТОРЕФЕРАТ

за присъждане на образователна и научна степен „Доктор”
по професионално направление **6.2 Растителна защита**
научна специалност Фитопатология

Научен ръководител: доц. д-р Ценко Димитров Въчев

София, 2018

Дисертационният труд съсържа 169 страници на формат А4, 19 таблици и 21 фигури. В библиографската справка са включени 497 заглавия, от които 25 на кирилица и 472 на латиница. Експерименталната работа е извършена във фитомикологична, фитобактериологична лаборатории, вегетационна къща и фитостатно помещение на направление Защита на растенията към ИПАЗР „Н. Пушкаров", Костинброд, към Селскостопанска академия.

Дисертационният труд е обсъден на разширено заседание на направление Защита на растенията към ИПАЗР „Н. Пушкаров", проведено на 12.02.2018 г. и насрочен за защита пред научно жури, сформирано със заповед № НП-08-34/20.03.2018 г. на Председателя на ССА.

Научно жури:

1. Доц. д-р Ценко Въчев
2. Проф. дсн Невена Богацевска
3. Проф. дн Марияна Накова
4. Проф. д-р Стойка Машева
5. Проф. д-р Иван Киряков

Защитата на дисертационния труд ще се състои на … ….от…….в зала „Проф. Иван Гърбучев" на ИПАЗР „Н. Пушкаров", София.

Материалите по защитата се намират на разположение на сайта на ССА и ИПАЗР „Н. Пушкаров", София.

Изказвам най-искрените си благодарности към моя научен ръководител, доц. д-р Ценко Въчев за неговата всеотдайност, търпение, висок професионализъм и ценни съвети.

Благодаря на проф. дсн Невена Богацевска за оказаната помощ при идентифициране на бактериални щамове.

Отправям благодарности към доц. д-р Светла Манева за помощта при статистическа обработка на данни.

Благодаря най-сърдечно на Зоя Кръстанова за съдействието при извършената лабораторна и експериментална работа.

СЕЛСКОСТОПАНСКА АКАДЕМИЯ

ИНСТИТУТ ПО ПОЧВОЗНАНИЕ, АГРОТЕХНОЛОГИИ
И ЗАЩИТА НА РАСТЕНИЯТА

ПОЧВЕНИ ПАТОГЕННИ ГЪБИ ПО ЖИТНИ КУЛТУРИ: ВИДОВ СЪСТАВ, РАЗПРОСТРАНЕНИЕ, МЕТОДИ И СРЕДСТВА ЗА БОРБА

ИВО ТОДОРОВ ЯНАШКОВ

АВТОРЕФЕРАТ

за присъждане на образователна и научна степен „Доктор”
по професионално направление **6.2 Растителна защита**
научна специалност Фитопатология

Научен ръководител: доц. д-р Ценко Димитров Въчев

София, 2018

Увод

Житните култури със слята повърхност, в т.ч. пшеница, ечемик, ръж, овес и др., отглеждани в различни региони по света са обект на нападение от редица почвообитаващи гъби, гъбоподобни (Agrios, 2005) оомицети (*Pythium* spp.), както и примитивни зооспорови гъби. Засегнати са всички фази от развитието на растенията – гниене на семена и кълнове, кореново и базично гниене в по-късните фенофази. Някои коренови инфекции остават латентни до поява на благоприятни условия или до реколтиране на посевите. Сред най-широко разпространените почвени патогени по житните култури са гъби от род *Fusarium*. Инфекции по корените от видовете *F. graminearum, F. culmorum, F. avenacearum,* са свързани със значителни икономически загуби в топлите региони и тези с умерен климат, а *F. nivale* – в условията на по-хладен климат. Други видове от род *Fusarium,* като *F. poae, F. moniliforme, F. equiseti* и *F. oxysporum* се считат за широко разпространени във всички региони, в които се отглеждат житни култури. Видовете *Gaeumannomyces graminis, Pseudocercosporella herpotrichoides* и *Drechslera sorokiniana* се съобщават често, като причинители на кореново и базично гниене по житни растения предвид широкото им разпоространение и икономическо значение. Видовете от род *Rhizoctonia – R. solani* и *R. cerealis* са свързани с чести повреди по житните култури, дължащи се на инфекции по корените и основата на стъблата. По-рядко съобщавани по житни култури са видовете *Colletotrichum graminicola, Aureobasidium bolleyi* и представители на разред *Agaricales*, включващи паразитните видове *Naucoria cereali, Pholiota dura* и *Marasmius tritici*. Голям брой гъбоподобни представители от род *Pythium* и *Lagena* (*Oomycota*), включително *P. graminicola, P. ultimum, P. irregulare, P. aristosporum, P. volutum* и др., както и видът *Lagena radicicola* са някои от най-разпространените патогени, атакуващи кореновата система на житни култури в мокри, хладни условия. Примитивни зооспорови гъби, като *Olpidium brassicae, Rhizophydium graminis* и *Ligniera pilorum* са описани като причиняващи инфекции по кореновите власинки, а *Polymyxa graminis* е известен като вектор на някои икономически важни вируси по житни култури. Различни видове от род *Fusarium*, заедно с *Gaeumannomyces graminis, P. herpotrichoides, D. sorokiniana* и *Rhizoctonia* spp. са откривани многократно по корените и базите на житни култури със слята повърхност в България. Лисват, обаче, достатъчно данни, както за разпространението на отделните видове, така и за причиняваните загуби за зърнопроизводството в страната. Описаните патогенни видове заразяват житни растения самостоятелно и независимо, или в различни комбинации от два и повече патогенни вида. Патогени от родовете *Fusarium, Drechslera, Pseudocercosporella* и *Rhizoctonia* са съобщени, като причинители на смесени инфекции по корените и базите от растенията. Икономическите загуби, причинени от почвени заболявания по житните култури със слята повърхност варират широко в различните региони според вида на гостоприемниците, екологичните и агрономически условия на отглеждане.

Цели и задачи

Основната цел на настоящата дисертационна работа беше да се установи видовия състав и разпространение на почвени гъбни патогени по житни култури със слята повърхност в България, и да се проучат алтернативни подходи за борба с причиняваните от тях заболявания.

За реализиране на целта бяха поставени следните задачи:

(1) Проучване на видовия състав и разпространение на почвените патогенни гъби, и оомицети в зърнопроизводителни райони на страната;

(2) актуализиране на информацията за етиологията на преобладаващите почвенопреносими заболявания по корените и базите на растенията;

(3) проследяване на особености на патологичния процес и попълване на познанията върху екологията на заболяванията. Изясняване на мащаба на щетите, причинявани върху българското зърнопроизводство;

(4) проучване на ефективността на алтернативни химични, агротехнически и биологични методи, и средства за борба с основни патологични явления по културите (по смисъла от дисертационния труд на Каров, 1985).

Материали и методи

1. Установяване на видовия състав и разпространението на патогенни гъби по корени и бази на житни култури със слята повърхност в България

1.1. Период и обекти на обследване.

Настоящото изследване беше проведено в рамките на три календарни години – от началото на 2014 г. до края на 2016 г. То обхваща – напълно или частично, четири вегетационни сезона на житни култури със слята повърхност. Посещенията на житни посеви в страната бяха провеждани през периодите от септември (след сеитба и поникване) до края на ноември, и от февруари до юни-юли – непосредствено преди жътвата. Обследванията обхващаха следните фенофази от развитие на културите – 15-20 дни след сеитбата по време на поникване (BBCH 00-12), трети лист (BBCH 13-19), братене (BBCH 20-29), вретенене (BBCH 30-49), изкласяване (BBCH 51-59), цъфтеж (BBCH 61-69), наливане и узряване на зърното (BBCH 71-77, Meier, 2001). За установяване на видовия състав и разпространението на почвените патогенни гъби по житни култури в България бяха посещавани и обследвани 151 полета с производствени посеви в основни зърнопроизводителни региони на страната, в т.ч. гр. Монтана – с. Пишурка; гр. Ловеч – с. Дойренци; Велико Търново – с. Ресен; гр. Тутракан – с. Нова Черна и с. Стефан Караджа; гр. Исперих – с. Лудогорци; гр. Шумен – с. Венец; гр. Добрич – с. Полковник Иваново; гр. София – гр. Божурище, гр. Костинброд и с. Негован; гр. Елин Пелин – с. Григорово и с. Нови хан; гр. Сливница – с. Гълъбовци; гр. Кюстендил – с. Драгодан; гр. Благоевград – с. Кочериново; гр. Сандански – с. Вихрен; гр. Пазарджик – с. Злокучене; гр. Садово; гр. Стара Загора – с. Гълъбовци; гр. Сливен; гр. Ямбол – с. Дряново; гр. Карнобат; гр. Бургас – с. Българово, с. Драганци с. Росен и с. Русокастро. Във всяко землище бяха обследвани от един до 27 отделни посева (блока), заети с житни култури. Част от посевите бяха посещавани двукратно в рамките на един и същ вегетационен сезон за да се проследят евентуални промени във видовия състав на патогенните асоциации по корените, и основата на стъблата в различни фенофази на растенията.

Обект на обследване бяха обикновена (зимна) пшеница (*Triticum aestivum* L.) – 110 посева, твърда пшеница (*Triticum durum* Desf.) – два посева, ечемик (*Hordéum vulgáre* L.) – 20 посева, овес (*Avena sativa* L.) – 15 посева, ръж (*Secale cereale* L.) – един посев, тритикале (*Triticosecale* Wittm. ex A. Camus) – един посев, еднозърнест лимец (*Triticum monococcum* L.) – един посев и спелта (*T. spelta* L.) – един посев (Фигура 1).

1.2. Наблюдения и събиране на растителни проби

Във всеки посев бяха извършвани наблюдения по периферията и диагоналите на съответното поле (Ledingham et al., 1973). Растителни проби бяха събирани по методите на Piening et al. (1976), Sinclair and Dhingra (1995), Iram et al. (2003), Mehrotra and Aggarwal (2013). В допълнение към пробите от отглежданата култура бяха вземани проби от житни плевели, в т.ч. пирей (*Agropyrum repens* L.), див овес (*A. fatua* L.) и кокоше просо (*Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv.): целта беше да се установи потенциалната роля на дивите видове, като резервоари на патогенни за житните култури микроорганизми.

1.3. Симптоми на заболяване и изолиране на гъбни и гъбоподобни организми

Фитопатологичните анализи на растителни проби бяха извършвани по стандартни методи (Alexopoulos, 1962; Gams et al., 1975; Sinclair and Dhingra, 1995; Mehrotra and Aggarwal, 2013). От спорообразуващите гъбни изолати бяха получавани моноспорови култури (Commonwealth Mycological Institute (Great Britain), 1968).

1.4. Идентифициране на получените изолати

Всички получени изолати бяха идентифицирани на базата на културални и морфологични особености в съответствие с критерии, отразени от Marasas et al. (1984) и Leslie and Summerell (2006) за гъби от род *Fusarium*, Christensen (1922) и Morejon (2006) за род *Drechslera*, Wise (1987), Tredway and Burpee (2001) за род *Rhizoctonia* и Nagrale et al. (2013) за род *Alternaria*, с помощта на микроскоп Olympus BX60F5 (увеличение x800). Видовата принадлежност на изолати от род *Pythium* беше определяна с помощта на водни култури (Илиева, 1979; Ilieva at al., 1995; Arthur and Lévesque, 2004) на базата на морфологични характеристики в съответствие с критериите, описани от Plaats-Niterink (1981), Ванев и др. (1993).

1.5. Патогенитет на изолираните гъби

Патогенитетът на изолатите беше изпитван двукратно по два метода – в Петриеви блюда при лабораторни условия и във вегетационни съдове при оранжерийни условия.

По първия метод, разработен от Въчев (Въчев, *непубликувани данни*), по пет броя пшеничени семена (с. Ласка-5) бяха предварително повърхностно дезинфекцирани чрез потапяне в 70% етилов алкохол за една минута и промивани със стерилна дестилирана вода. Семената бяха поставяни върху филтърна хартия, навлажнена със стерилна дестилирана вода в 90 mm Петриеви блюда. След покълване на семената – в резултат на тридневно инкубиране на тъмно при 26 °C, до всяко семе беше поставено по едно агарово блокче с диаметър 6 mm, изрязано от периферията на петдневна чиста култура на съответния изследван изолат, развит върху овесена агарова среда. За всеки изолат бяха използвани по четири повторения. За контрола служеха експериментални единици, подготвени по идентичен начин, с агарови блокчета без развит патоген. Блюдата с инокулирани и неинокулирани кълнове бяха подреждани върху лабораторен плот по напълно рандомизиран блоков дизайн и инкубирани при лабораторни условия (19-22 °C) в продължение на 10 дни. Ежедневно бяха отчитани появата и развитието на видими симптоми на заболяване по

отделните части на кълновете във всяко блюдо. За потвърждаване на наличие на патоген в тъканите, видимо болни и здрави части от инокулираните кълнове бяха подлагани на фитопатологичен (микробиологичен) анализ по описания по-горе метод за изолиране на патогенни организми (Mehrotra and Aggarwal, 2013).

По втория метод на изследване изпитваните гъбни изолати бяха култивирани при 26 °C в Петриеви блюда с предварително разлят ОА в продължение на 7-14 дни в зависимост от вида на съответния изолат. След като културите изпълваха блюдата, съдържанието на всяко блюдо беше смесвано с 1 L стерилизирана почва, насипана в отделни вегетационни съдове (саксии). Във всяка саксия бяха посявани по 10 броя семена от пшеница, сорт Ласка-5, ечемик, с. Обзор, ръж, с. Милениум, овес, с. Калоян, тритикале, с. Вихрен или еднозърнест лимец, Българска популация, в зависимост от вида на културата, от която е получен съответния изолат. За всеки изолат се използваха по четири еднолитрови саксии (повторения). За контрола служеха четири повторения, подготвени по идентичен начин, но без внесен в тях патоген. Опитните единици бяха подреждани по напълно рандомизиран блоков дизайн върху бетонен плот в застъклена, експериментална, неотопляема оранжерия. В продължение на два месеца беше проследявано развитието на пшеничените растения във всяка саксия. В края на опитите, инокулираните и неинокулирани (контролни) растения бяха изваждани внимателно, кореновата им система беше промивана на течаща вода и подсушавана между двуслойна филтърна хартия. Отчитани бяха прояви на кореново и базично гниене (Ledingham et al., 1973). Степента на нападение по корените и базите на всяко растение беше отчитана по разработена от нас шест-бална скала (0-5), където 0 съответства на липса на видими повреди по корените, 1=1-25%, 2= 26-50%, 3=51-75%, 4=76-100% от кореновата система е обхванатата от некротични напетнявания, 5=кореновата система, изцяло обхванатата от гниене, при което болните растения увяхват трайно и загиват.

Индексът на нападение беше изчислен като средна стойност от степените на нападение по корените на растенията от всяко отделно повторение и вариант. Всички опити бяха проведени двукратно. За потвърждаване на патогенните свойства на всеки изолат, от видимо болни тъкани бяха правени реизолации по описания по-горе метод (Mehrotra and Aggarwal, 2013).

2. Методи и средства за борба с гъбни болести по корени и бази на житни култури със слята повърхност

2.1. Химични методи и средства

2.1.1. Приложение на фунгицидни средства за борба с основни причинители на кореново и базично гниене по пшеница

2.1.1.1. Прицелни патогенни видове

В това изследване бяха използвани патогените *Fusarium culmorum*, *Drechslera sorokiniana* и *Pythium ultimum*, с мотива, че са сред основните причинители на гниене на кълновете и пониците, водещо до прореждане на посевите от житни култури със слята повърхност. Освен това същите видове са част от комплекса патогенни гъби, причиняващи кореново и базично гниене по житните в по-късни фази на развитие.

2.1.1.2. Изпитвани фунгициди

В изследването бяха включени общо шест фунгицидни продукта за изпитване в официално препоръчваните за употреба дози, както следва: BAS 700 05 F (флуксапироксад 333 g/L), 75 ml; BAS 591 01 F (прохлораз 60 g/L + тритиконазол), 150 ml; BAS 595 01 F (тритиконазол 25 g/L), 150 ml; BAS 9242 4 F (тирам 200 g/l + карбоксин 200 g/L), 75 ml; Витавакс 2000 (тирам

200 g/l + карбоксин 200 g/L), 40 ml; Ранкона И-микс (ипконазол 20 g/L + имазилил 50 g/L), 100 ml, съответно за всеки отделен продукт в 4 L вода за 100 kg семена.

2.1.1.3. Опити *in vitro*

Първоначално при лабораторни условия беше проследяван ефектът на изпитваните фунгицидни продукти върху растежа на мицела на трите патогенни гъби. Използван беше метод описан от Sinclair и Dhingra (1995), Russel (2004) и много др. Всеки от изследваните фунгициди беше добавян към разтопена (45 °C) овесена, агарова (ОА), хранителна среда, предварително разлята и стерилизирана в стъклени колби (х 200 ml среда в една колба). Всеки фунгицид беше довеждан до концентрация, съответстваща на препоръчителната доза, отбелязана върху етикета на продукта за 4 L вода и предвидена за третиране на 100 kg семена. За целта отделните фунгицидни формулации бяха добавяни към хранителната среда в следните количества: BAS 700 05 F, 3.7 ml; BAS 591 01 F, 7.5 ml; BAS 595 01 F, 7.5 ml; BAS 9242 4 F, 15 ml; Витавакс 2000, 15 ml; Ранкона И-микс, 2 ml, съответно за всеки отделен продукт в 200 ml агарова хранителна среда. След хомогенизиране чрез интензивно бълникане в продължение на 30 sec, така подготвените агаровите среди бяха разливани в стерилни Петриеви блюда, 90 mm в диаметър (х 20 ml във всяко блюдо) и оставяни да се втвърдят на стайна температура. Двадесет и четири часа по-късно в центъра на всяко блюдо беше поставяно по едно 6 mm агарово блокче, изрязано от периферията на седемдневна чиста култура на съответната гъба, развита в Петриево блюдо върху ОА. За контроли служеха идентично подготвени експериментални единици – гъбни посявки в Петриеви блюда с разлят ОА без фунгицид. Всеки вариант (вид патоген х фунгициден продукт) беше залаган в пет повторения. Инокулираните с патоген блюда бяха инкубирани при 26 °C на тъмно в продължение на 14 дни или до изпълване на контролите с мицел на култивираните гъби. Ежедневно беше измерван диаметърът на формираните гъбни колонии (без този на агаровото блокче в центъра на блюдото). Потенциалният фунгициден ефект на тестваните продукти, показали пълно (100%) инхибиране на растежа на гъбния мицел, беше изпитван чрез прехвърляне на експонираните на действието на фунгициди агарови блокчета в Петриеви блюда с чиста хранителна среда (ОА) без добавен фунгицид. В продължение на 14 дни беше проследявано формиране на нови гъбни колонии от агаровите блокчета, белег за запазена жизнеспособност на гъбите (Sinclair и Dhingra, 1995).

2.1.1.4. Опити във вегетационни съдове

Тези опити бяха проведени съгласно методика, описана от Sinclair и Dhingra (1995), и в съответствие със Стандарт на EPPO PP 1/19. Бяха включени три от изпитваните фунгицидни продукти, показали 100% инхибиращ ефект върху растежа на колониите и фунгициден ефект по втрху трите прицелни патогена. Ефективността на фунгицидите беше проследявана спрямо индивидуалните заболявания, причинявани от всеки отделен патоген.

Производство на инокулум и инокулиране на семена. Инокулум от трите вида патогени беше произведен след 7-дневно култивиране на чисти култури от *F. culmorum* и *P. ultimum*, или 14-дневно на културите от *D. sorokiniana* върху картофено-декстрозен агар (КДА) в 90 mm Петриеви блюда, на тъмно, при 26 °C. Съдържанието на по 10 блюда (агар с мицел и спори) от всеки патоген беше добавяно към 1000 ml чешмяна вода. Мицелно-споровата суспензия беше хомогенизирана с миксер на средни обороти за около 30 sec. Високо качествен семенен материал от сорт Мадара със 100% кълняемост беше инокулиран по варианти чрез опръскване на семената със суспензия на съответен патоген – по 250 ml мицелно-спорова суспензия за един килограм семена. Като неинокулирана контрола служеха семена от същия сорт и партида пшеница, които

бяха опръсквани с чиста чешмяна вода без инокулум на патоген. След механично размесване, семената бяха просушавани върху филтърна хартия при лабораторни условия в продължение на 72 часа. Проби от по 100 семена от всяко повторение бяха тествани за наличие на повърхностен инокулум. За целта беше използван блотинг тест с инкубиране на семена между два слоя навлажнена филтърна хартия и директни посявки от семена върху КДА (Sinclair and Dhingra, 1995; Waller et al., 2002). Кълняемостта на семената по варианти беше отчитана по идентичен начин след провеждане на допълнителни тестове.

Третиране на семената с фунгицидни средства. Инокулирани и неинокулирани с патоген семена бяха третирани по варианти с един от следните фунгициди: BAS 9242 4 F, Витавакс 2000 и Ранкона И-микс в официално препоръчваните дози. Използваните в опитите количества продукт и вода за полумокро третиране бяха преизчислявани към 1 kg семена или съответно 3 ml, 2 ml, и 1 ml, разтворени в по 40 ml вода за всеки от трите фунгицида. Всяка третирана проба (повторение) беше поставяна в полиетиленов плик и размесвана до пълно, и равномерно покритие на семената с приложения химичен агент.

Сеитба и условия на култивиране. По 40 третирани или нетретирани с фунгицид семена бяха засявани по варианти във вегетационни съдове (алуминиеви тарини с размери 25x25x7 cm и обем 4.4 L) с насипана торово-почвена смес (Fitogea, София) със следните характеристики: електропроводимост: 40 mS/m; pH H_2O 5.5-6.5; органично вещество 80% W/W; смес от светъл и тъмен торф 90-95%; перлит 5-10%; калциев карбонат ($CaCO_3$) 3-5 kg/m^3; влажност на търговския продукт 60-70%. Беше спазвана редова схема на сеитба 3 x 2 cm и дълбочина 3 cm. За всеки вариант (патоген x фунгицидно третиране) бяха използвани по три повторения (вегетационни съда). Експериментални единици, подготвени по идентичен начин и засети с инокулирани или неинокулирани семена бяха използвани като нетретирани контролни варианти. Съдовете бяха подреждани върху метални стелажи във фитостатно помещение по напълно рандомизиран блоков дизайн. Условията за култивиране на опитните растения бяха както следва: температура 20 ± 2°C, осветеност 2000-3000 lux, осигурявани от живачни лампи с бяла светлина и фотопериод 16:8 часа.

Отчитане на нападението. Броят на непоникналите, загинали след поникването и видимо болни растения – с некротични прояви по корените и базите, беше отчитано във всяко повторение периодично от поникване на опитните растения до фенофаза 1-2 лист. Разпространението (честота на срещане) на заболяването по варианти беше изчислявано като процент загинали поници и процент болни растения със симптоми на кореново и базично гниене в края на опита спрямо съответния общ брой засети семена.

2.2. Агротехнически и културностопански методи и средства

2.2.1. Ефект на естествен тревен прелог върху фузарийното кореново и базично гниене по пшеница

2.2.1.1. Моделна патологична система

За целите на настоящото изследване беше използвано фузарийното кореново и базично гниене по пшеницата. Предвид беше взето масовото разпространение и икономическото значение на заболяването по житните култури със слята повърхност в България. Поради многокомпонентния характер на етиологията на заболяването, включваща различни патогенни гъби от род *Fusarium*, в изследването бяха включени наши изолати на три вида патогенни гъби, в т.ч. *Fusarium culmorum, F. graminearum* и *F. oxysporum*. Използваните патогени бяха изолирани през предходни години от корени и бази на симптомни, пшеничени растения, и са доказани

причинители на гниене на кълновете, загиване на пониците, кореново и базично гниене, и гниене по класовете.

2.2.1.2. Изследвани почви

В настоящото изследване бяха сравнявани два почвени типа от района на направление Защита на растенията на ИПАЗР „Н. Пушкаров" край гр. Костинброд – Черноземно-Смолник (1.2% пясък 64.5% глина, 16.6% прах, pH (KCl) 5.46, 4.71% хумус) и Алувиално-Ливадна (30.0% пясък, 17.5% прах, 52.0% глина pH (KCl) 6.56, 4.03% хумус), от обработваеми (без прекъсване през последните 25 години) и временно необработваеми („пустеещи") земеделски площи. Последните бяха разглеждани от нас като почви в състояние на „непреднамерен" прелог – естествено затревени в продължение на четири и седем години, съответно за Черноземния и Алувиално-Ливаден почвен тип. От избраните терени бяха събирани индивидуални почвени проби на дълбочина до 20 cm, по решетъчна, пропорционална, квадратна схема (Alef and Nannipieri, 1995) с петметрово отстояние между точките на пробовземане. Събраните индивидуални проби от всяка почва бяха размесвани, пресявани през сито (3x3 cm) и използвани за биологично тестиране.

2.2.1.3. Експериментален модел

Прилаган беше биологичен тест, оптимизиран в предходни проучвания (Вълчев, *непубликувани данни*). Експерименталният модел включваше внасяне в изследваните почви на изкуствено развит инокулум на един от трите патогена с последващо култивиране на пшеничени растения. За оценка и сравнение на нивото на супресивност на всяка от почвите се съдеше по интензитета на проявите на заболяване по корените и базите на опитните растения, причинявано от всеки един от трите патогена.

Допълнителни опити бяха провеждани с естествени (нестерилизирани) и термично стерилизирани (240 °C за 2 h) аналози на изследваните почви, за да се потвърди биологичното естество на тяхната супресивност. Използван беше вида *F. culmorum*, в качеството му на най-агресивен патоген сред причинителите на фузарийно кореново и базично гниене по житните.

2.2.1.4. Производство на инокулум и инокулиране

Инокулум на патогените беше развиван в чисти култури, в продължение на 14 дни, в стъклени колби при 26 °C върху предварително автоклавирани (30 min на 121 °C) ечемичени зърна. Изследваните почви бяха инокулирани по варианти, като по 25 g инокулум на съответната гъба беше внасян на един литър почва или оставяни неинокулирани – контроли с внесено същото количество неинокулирани ечемичени зърна.

2.2.1.5. Експериментален дизайн и условия на култивиране

Инокулираните и неинокулирани с патоген почви бяха насипвани в пластмасови саксии с обем 1L. Саксиите бяха подреждани върху бетонен плот в отделни, изолирани клетки на неотопляема, застъклена оранжерия по напълно рандомизирана блокова схема. Опитните единици бяха поливани, като влажността на почвата беше довеждана до около 75% от ППВ. След едноседмично инкубиране във всяка саксия бяха засявани по 15 семена от пшеница, с. Ласка 5. След успешно поникване броят на пшеничените растения във всяка саксия беше довеждан до 10. Всеки вариант се състоеше от по пет повторения (саксии и почва с обем 1L). При необходимост оранжерийните клетки бяха засенчвани с варов разтвор, така че във всички опити растенията бяха култивирани при дневни температури между 11.5 °C до 27 °C. Растенията бяха поливани

между един и три пъти седмично в зависимост от техните нужди, при което влажността на почвата беше поддържана на ниво около 70 % от ППВ. Шестдесет дни след сеитбата опитните растения бяха изваждани внимателно, корените им промивани на течаща вода, подсушавани между двуслойна филтърна хартия и отнасяни в лаборатория за анализ. Степента на нападение по корените и базите на всяко растение беше отчитана по разработената от нас шест-бална скала. Индексът на нападение беше изчислен като средна стойност от степените на нападение по корените на растенията от всяко отделно повторение и вариант. Всички опити бяха проведени двукратно в рамките на две календарни години. В края на всеки опит от корените и основата на стъблата на опитните растения от вариантите с инокулиране бяха правени реизолации за потвърждаване на естеството на заболяване и инфекцията от съответния вид патоген.

2.3. Биологични методи и средства

2.3.1. Приложение на компостиран овчи тор за повишаване на почвената супресивност към ризоктонийно кореново гниене по пшеница

2.3.1.1. Моделна патологична система

Експерименталният модел включваше естествена (нестерилизирана) или стерилизирана почва, инокулирана с изкуствено развит инокулум на патогена при добавяне на различни количества (20, 60 или 100 ml L^{-1} почва) органичен подобрител (компостиран овчи тор) и почва без добавка на подобрител (контролни варианти) за култивиране на пшеничени растения. Биологичните тестове бяха провеждани с пшеница, сорт Ласка 5 и високо агресивен изолат на *Rhizoctonia solani* AG 4, получен от симптомни пшеничени растения в предходни наши проучвания.

2.3.1.2. Почва и внасяне на подобрител

За целите на изследването беше използвана Алувиално-Ливаден тип почва от района на направление Защита на растенията на ИПАЗР „Никола Пушкаров" край гр. Костинброд (30.0% пясък, 17.5% прах, 52.0% глина pH (KCl) 6.56, 4.03% хумус). От избрания необработваем терен бяха събирани индивидуални почвени проби – монолити, на дълбочина до 20 cm с петметрово отстояние между точките на пробовземане. Събраните индивидуални монолити бяха смесвани и напълно хомогенизирани чрез размесване, след което почвата беше пресявана през сито (3 x 3 cm). Част от почвата беше термично стерилизирана в сух стерилизатор на 140 °C за 6 h, а останалата беше използвана като естествена (нестерилизирана) почва. Еднакви количества (7.0 L) от стерилизираната и нестерилизирана почва бяха разпределяни в метални съдове с размери 30 x 30 x 8 cm. За подобрител на почвата беше използван добре разложен, овчи оборски тор, добит от частно, придворно стопанство край гр. Костинброд. По варианти към почвата в съдовете бяха добавяни по 0, 20, 60 или 100 ml от подобрителя на 1L почва, съответстващи на дози на торене 0, 5, 15 и 25 m^3 органичен тор на един декар площ при 25 cm дълбочина на орния слой. След пълно хомогенизиране съдовете бяха разполагани върху лабораторен плот във фитостатно помещение и покривани с листове филтърна хартия. Третираните и нетретирани с подобрител почви бяха инкубирани в продължение на 90 дни при температура 19-22 °C. За оптимално протичане на микробиологичните процеси, влажността на почвата беше поддържана в границите 70-75% от ППВ чрез периодични поливки с чешмяна вода.

2.3.1.3. Биологичен тест за супресивност

В настоящото изследване за установяване на нивото на супресивност на нетретирана и третирана почви спрямо ризоктонийно кореново гниене беше използван директен метод,

приложен за пръв път при пшеница. Методът се основава на способността на болестта да се разпространява огнищно по пшеничените растения в посева от единичен източник на инфекция (под формата на „хармани", Sneh et al., 1996; Schroeder and Paulitz, 2008) и е оптимизирана версия на биологичен тест, използван в предходни наши изследвания (Vatchev and Dijst, 2010). По 1.1 L от изследваната почва за всеки вариант беше насипвана в правоъгълни, пластмасови съдове с размери 26 x 6 x 8 cm. Във всяка опитна единица (съд) бяха засявани по два реда от по 12 (24 във всеки съд) висококачествени семена пшеница, сорт Ласка 5 на разстояние 2 cm в реда и 3 cm между двата реда. Опитните единици – по четири за всеки вариант, бяха разполагани в напълно рандомизирани блокове в лаборатория с пряк достъп на дневна светлина и температура от около 20 °C. Инокулум на *R. solani* беше развиван предварително в чисти култури в Петриеви блюда върху автоклавирани (30 min на 121 °C) ечемичени зърна в продължение на 14 дни при 26 °C. След поникване на опитните растения (пет дни след сеитбата) бяха внасяни по 20 инокулумни зърна в единия край на всеки съд на около 0.5-1 cm дълбочина в почвата, под формата на фокален (точков) източник на инфекция. Целеше се гъбата да се разпространява от източника на инфекция чрез нарастващия мицел във и под въздействие на изследваната почва. Всеки съд беше снабден с подложка, позволяваща ръчно подаване на вода от подложката към отворите на дъното на вегетационния съд. Ежедневно в подложката на всеки съд беше добавяна чешмяна вода, така че в нея да се поддържа постоянен воден стълб с височина 1 cm. По този начин на повърхността на изследваната почва (7 cm колона) беше създаван постоянен воден потенциал (pF) от около -30 mBar. От друга страна, с поливка чрез просмукване на водата в почвата откъм основата на съда се избягваше допълнителен, механичен пренос на вегетативни структури на патогена от източника на инокулум.

2.3.1.4. Честота и параметри на отчитане.

Опитите бяха отчитани на всеки седем дни в продължение на 35 дни след инокулиране. Здравното състояние на всяко пшеничено растение беше оценявано визуално като „здраво", „болно", „загинало" или „липсващо". Резултатите бяха нанасяни върху схематични карти. На базата на тези карти беше определяна дистанцията (периметър) на разпространение на ризоктонийното гниене в двата реда растения от източника на инфекция. Дистанцията на разпространение и площта под кривата на болестта служеха за основен параметър, характеризиращ нивото на супресивност на почвата по отношение на заболяването във всяко повторение. Допълнителен критерий за нивото на супресивност на изследваната почва бяха общият брой на загиналите и болни растения, респективно броят на оставащите видимо здрави растения във всяка експериментална единица (вегетационен съд).

2.3.2. Антагонистична активност на почвени и ризосферни бактерии по отношение на почвообитаващи гъбни патогени по житни култури със слята повърхност

2.3.2.1. Прицелни патогенни видове

За целите на настоящото изследване бяха използвани вирулентни изолати от седем гъбни патогена – *Fusarium culmorum, F. graminearum, F. oxysporum, F. sporotrichiella, F. equiseti, Drechslera sorokiniana* и *Pythium ultimum*, изолирани от болни тъкани на симптомни растения от житни култури. Същите видове бяха установени като причинители на гниене на семена и кълнове, загиване на поници и прореждане на посевите, гниене по корените, и основата на стъблата на растенията в по-късни фенофази от развитието на житни култури със слята повърхност в България.

2.3.2.2. Изолиране и идентифициране на почвени и ризосферни бактерии, потенциални антагонисти

От корени на пшеница, сортове Алтиго (гр. Ямбол) и Енола (гр. Костинброд), както и овес, сорт Дунав (гр. Карнобат) бяха изолирани отделни бактериални щамове, за които предварително беше установено, че подтискат растежа на мицела на различни почвообитаващи гъбни патогени по житните култури. Един от изпитваните бактериални щамове беше изолиран от корени на обикновен щир (*Amaranthus retroflexus* L.). За диференциране на отделните щамове до род бяха установявани основни физиологични и биохимични характеристики от метаболитния профил на бактериите (Schaad et al., 2001). За целта беше използвана автоматизирана система Biolog™. Изолираните бактериални щамове бяха идентифицирани до вид с идентификационна система Biolog™ (GN, GP-микроплаки**),** базиращ се на метаболитната активност на Грам положителни и Грам отрицателни бактерии спрямо 95 въглеродни източника. Получените резултати бяха анализирани с програмен продукт MicroLog™ version 4.20.05 (Biolog™, CA, USA).

2.3.2.3. Антагонистична активност на изпитваните бактерии

Потенциалният инхибиращ ефект на изпитваните бактериални щамове върху растежа на мицела на прицелните гъбни патогени беше проследяван в лабораторни условия. Използван беше модифициран от нас *in vitro* метод, описан от Sinclair и Dhingra (1995), и Hameeda et al. (2006). Втечнен (42 °C) картофено-декстрозен агар (КДА) беше разливан в 90 mm в диаметър стерилни Петриеви блюда (х 20 ml агарова среда във всяко блюдо) и оставян на стайна температура в продължение на 24 часа. Върху хранителната среда в права линия по диагонала на всяко блюдо беше нанасяна чиста култура от отделен бактериален вид с помощта на стерилно Йозе. Инокулираните Петриеви блюда бяха инкубирани в продължение на 72 часа на тъмно при 26 °C. По две агарови блокчета (6 mm в диаметър), изрязани от периферията на седемдневна чиста култура на съответната патогенна гъба, развита в Петриево блюдо върху КДА, бяха поставяни симетрично от двете страни на развитата под формата на ивица бактериална колония, на отстояние около 40 mm от нея. Всеки вариант (гъбен патоген х бактериен щам) беше залаган в четири повторения (Петриеви блюда). За контроли служеха идентично подготвени експериментални единици – гъбни посявки в блюда с разлят КДА, без предварително развита бактерийна култура. Инокулираните с патоген блюда бяха инкубирани при 26 °C на тъмно. Диаметърът на формираните гъбни колонии (без размера на агаровите блокчета) беше измерван на трети, пети, седми и десети ден след посявката. Данните от последното измерване бяха използвани за изчисляване на инхибирането на растежа на гъбния мицел в отделните варианти спрямо контролите по формулата на Abbott (1925): $GI_{\%} = 100-(D*100/ C)$, където:

$GI_{\%}$ – Инхибиране на растежа на мицела;

D – Диаметър на гъбната колония (mm) във вариант с отделен биоагент;

C – Диаметър на гъбната колония (mm) в контролата.

2.4. Статистически анализи

Всеки опит (*in vitro* и във вегетационни съдове) беше проведен двукратно. Експерименталните данни от два последователно проведени опита бяха анализирани поотделно за установяване на хомогенност на резултатите, след което – обединени и анализирани съвместно. Получените данни бяха обработвани статистически и анализирани по стандартен метод за вариационен анализ и по метода на Duncan, използващи *F*-тест за оценка на значимостта на анализа и *t*-тест за значимост на разликите при нива на достоверност при $P \leq 0.05$, $P \leq 0.01$ и

P≤0.001 (Gardiner, 1997). Всички анализи бяха извършвани с програмен продукт, разработен в направление Защита на растенията, гр. Костинброд на ИПАЗР „Никола Пушкаров", гр. София (Манева, 2007).

2.5. Ниво на контрол

Ефективността на всяко фунгицидно третиране по варианти беше калкулирана по формулата на Abbott: $E_{\%} = 100-(T*100/K)$, където:

$E_{\%}$ – ефективност (директна ефикасност) на фунгицидното третиране, ниво на контрол;

Т – сума от % загинали и % симптомни растения във вариант с фунгицидно третиране;

К – сума от % загинали и % симптомни растения в контролния вариант с изкуствено инокулирани, нетретирани с фунгицид семената (Abbott, 1925).

Нивото на контрол над ризоктонийното кореново гниене по пшеницата чрез повишаване на почвената супресивност по варианти беше калкулирано според площта под кривата на болестта по формулата на Abbott (1925), където:

$E_{\%}$ – ефективност на третирането, ниво на контрол;

Т – площ под кривата на болестта за съответен вариант с третиране (cm^2);

К – площ под кривата на болестта за контролен вариант без третиране.

Резултати и обсъждане

1. Установяване на видовия състав и разпространението на патогенни гъби по корени и бази на житни култури със слята повърхност в България

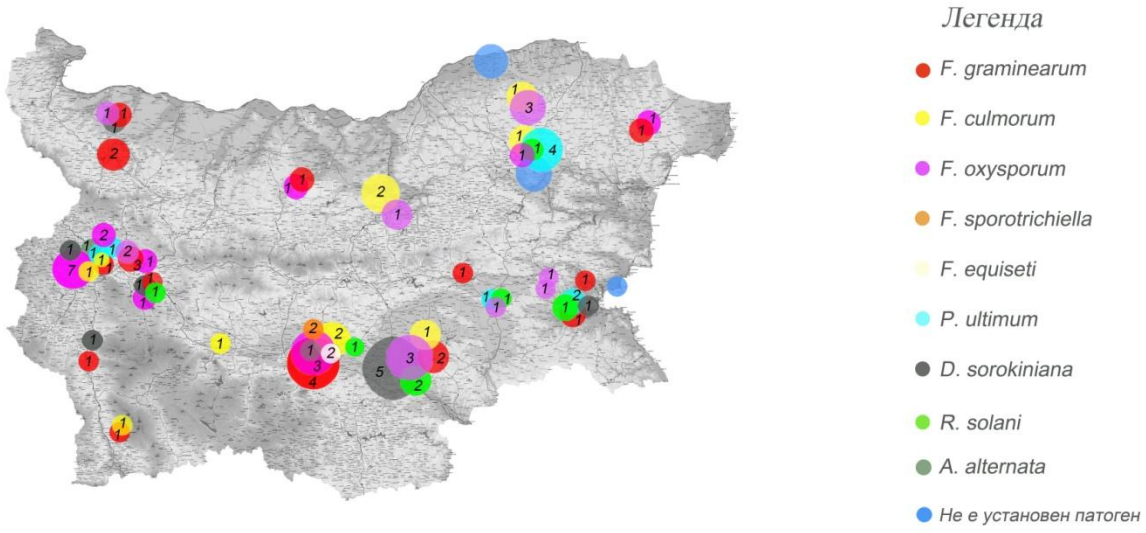
1.1. Симптоми на заболяване

В обследваните посеви, в резултат на прегледи, извършени на полето и в лабораторни условия – след промиване на кореновата система на събраните растения, беше установено разпространение на кореново и базично гниене между 20% и 30% от растенията в по-голяма част от посевите. Видими патологични изменения по надземните части на растения от обследваните посеви бяха наблюдавани единствено по обикновена пшеница в района на гр. Исперих и еднозърнест лимец край с. Гълъбовци, района на гр. Сливница. В тези посеви беше констатирано заболяване, обхващащо до 100% от растенията. Симптомите включваха масирана хлороза по листната маса, некротични напетнявания, развиващи се откъм периферията на петурите и водещи до прегаряне на част от листата. По основата на стъблата и корените на всички симптомни растения беше наблюдавано гниене и покафеняване на тъканите. Наблюдаваната симптоматика по посевите в нашата страна не се отличава от описаните в литературата прояви на кореново и базично гниене по житни култури със слята повърхност (Караджова, 1979; Димитров, 1980; Mathre, 1982; Weise, 1987; Mathre et al, 2003; Cook, 2012). В пет от обследваните посеви (3.3% от общия брой обследвани), в райони около Божурище, Карнобат, Добрич, Шумен и Тутракан, не бяха регистрирани видими прояви на заболяване.

1.2. Изолиране на гъбни и гъбоподобни патогенни видове

През периода на изследване бяха получени общо 94 патогенни изолата от 82 (54.3%) от обследваните посеви, заети с житни култури с прояви на кореново и базично гниене. Установените фитопатогени се отнасяха към пет отделни рода. Най-често срещани бяха

представителите на род *Fusarium* – 66 получени изолата или 70.2% от общия брой изолирани патогени. Патогени от този род бяха изолирани от 60 полета – 39.7% от всички обследвани посеви. Сред видовете от род *Fusarium* с най-широк ареал на разпространение се отличаваше *F. oxysporum*. Този вид беше установен в 28 полета (18.5% от всички обследвани), а делът на получените изолати от този вид – 30 броя, съставляваше 45.5% от изолираните *Fusarium* spp. Следващ най-масово разпространен вид беше *F. graminearum*, чиито изолати – 21, съставляваха 31.8%, следван от *F. culmorum* с 11 изолата или 16.7% от общия брой на изолатите, отнасящи се към род *Fusarium*. Спрямо всички получени гъбни изолати съотношението на трите вида бе както следва: 31.9%, 22.4% и 11.7%. В отделни посеви беше констатирано нападение от видовете *F. sporotrichiella* и *F. equiseti*. От тях бяха получени по два изолата, съответстващи на 3.0% от изолатите от род *Fusarium* и 2.1% от общия брой изолирани гъби. Други изолирани патогенни видове, в т.ч. *Drechslera sorokiniana, Pythium ultimum, Pythium* spp., *Rhizoctonia solani* и *Alternaria alternata* съставляват съответно 10.6%, 6.4%, 3.2% и 2.1% от общия брой изолати, получени от житни култури със слята повърхност (Фигура 1, Таблица 1).



Фигура 1.

Обследвани посеви и брой получени патогенни изолати от съответен патогенен вид за периода 2014-2016 г.

Таблица 1.

Видов състав и разпространение на установени патогенни видове по житни култури със слята повърхност в България

№	Вид патоген Pathogenic species	Брой получени изолати	% получени изолати от съответния род	% от общия брой получени изолати	Брой места на изолиране (блок/поле)	% от общия брой обследвани полета
1	*F. culmorum*	11	16.7	11.7	11	7.3
2	*F. graminearum*	21	31.8	22.4	20	13.3
3	*F. oxysporum*	30	45.5	31.9	28	18.5
4	*F. sporotrichiella*	2	3.0	2.1	2	1.3
5	*F. equiseti*	2	3.0	2.1	2	1.3
6	*D. sorokiniana*	10	100	10.6	10	6.6
7	*R. solani*	7	100	7.5	7	4.6
8	*P. ultimum*	6	66.7	6.4	6	4.0
9	*Pythium* spp.	3	33.3	3.2	3	2.0
10	*A. alternata*	2	100	2.1	2	1.3

Представени по култури, видът *F. oxysporum* беше изолиран от корени и бази на пшеница, ечемик и овес; *F.graminearum* – пшеница, ечемик, тритикале и овес; *F. culmorum* – пшеница, ечемик и тритикале; *F. sporotrichiella* – пшеница; *F. equiseti* – пшеница и ръж; *D. sorokiniana* – пшеница, ечемик и за пръв път в България – лимец; *P. ultimum* – пшеница и *R. solani* – пшеница. Освен от земеделски култури *F. oxysporum* беше изолиран от див овес и кокоше просо, а *F. graminearum* – от пирей.

Сред обследваните посеви бяха установени общо девет смесени инфекции, шест от които в полета с пшеница, причинени от видовете – *P. ultimum* и *F. graminearum*; *F.graminearum* и *F. equiseti*; *F. culmorum* и *F. oxysporum*; *F. oxysporum* и *R. solani*; *D. sorokiniana* и *R. solani* (в два посева). По други култури бяха констатирани три смесени инфекции – две по ечемик, причинени от *D. sorokiniana* и *F. graminearum*, и една по тритикале с участието на *F.culmorum* и *F.graminearum*. Очевидно с преобладаващо значение е един или друг патогенен вид в зависимост от гостоприемника и условията на отглеждане.

Наред с фитопатогените бяха получавани и изолати на непатогенни гъби от род *Alternaria*, *Penicillium*, *Mucor* и *Aspergillus*.

1.3. Идентифициране на получените изолати

Върху агарови хранителни среди изолатите от вида *Fusarium oxysporum* Schlecht. emend. Snyder and Hansen, клас *Sordariomycetes*, сем. *Nectriaceae* формираха бял, по рядко с жълто-оранжев оттенък, фин, паяжиновиден, стелещ се по повърхността въздушен мицел, който със застаряване на гъбната култура се уплътняваше и набръчкваше. Развити върху картофено-декстрозен агар (КДА), pH 5,5 повечето изолати от този вид оцветяваха средата от белезникаво до бледожълто, а върху ОА – от розово-червено до виолетово. Продуцираха многобройни, събрани в "главички", едноклетъчни или двуклетъчни, хиалинни микроконидии с овално-елипсовидна или цилиндрична форма, прави или леко извити, с размери 2.6-4.2 μm x 5.4-12.0 μm. Макроконидии се образуваха върху относително къси разклонения на въздушния мицел и по-рядко в спородохии. Този тип спори бяха безцветни, вретеновидно-сърповидни, прави или леко извити, с равен диаметър по дължината, постепенно и равномерно стесняващи се към

краищата, най-често с 3-5 напречни прегради, с размери 3.8-5.0 µm x 33.0-60.5 µm. Връхната клетка беше неудължена, а основната – оформяше ясно изразено „краче". Безцветни хламидоспори с гладка или грапава повърхност се формираха обикновено 14 дни след посявката, терминално или интеркаларно – в хифите на мицела или на повърхността им (Фиг. 2).

Изолатите от вида *Fusarium graminearum* Schwabe, клас *Sordariomycetes*, сем. *Nectriaceae* формираха добре развит, пухест въздушен мицел, първоначално бял, а впоследствие розов до яркочервен. Колониите на гъбата оцветяваха субстрата от розово-червено до винено-червено, червено-жълто или тъмно кремаво. Продуцираха безцветни макроконидии с 3-6 напречни прегради и размери 3.2-6.2 µm x 23.2-74.6 µm. Макроконидиите бяха сърповидни или вретеновидни с постепенно, и равномерно стесняваща се конусовидна връхна клетка, и с ясно изразено краче в основата. Формираха се в спородохии или върху хифите на въздушния мицел. Липсваха микроконидии, хламидоспори и склероции (Фиг. 2).

Изолатите на *Fusarium culmorum* (Wm.G.Sm.) Sacc., клас *Sordariomycetes*, сем. *Nectriaceae* образуваха добре развит въздушен мицел, достигащ на височина 6-8 mm над повърхността на средата, първоначално бял, а със застаряване на културата – оранжево-кафяв или червеникавокафяв. Пигментирането на средата беше жълто-кафяво до тъмнокафяво. Не се наблюдаваха склероции, хламидоспори и микроконидии. Макроконидиите се образуваха в спородохии и във въздушния мицел. Те бяха безцветни, сърповидни, вретеновидни, елипсовидно извити или почти прави, със стеснена връхна клетка, най-често с 3-5 напречни прегради, имаха ясно изразено краче в основата и размери 4.2-8.8 µm x 18.3-64.7 µm (Фиг. 2).

Изолатите, отнасящи се към вида *Fusarium sporotrichiella* Bilai, клас *Sordariomycetes*, сем. *Nectriaceae* образуваха първоначално бял или бледорозов, а впоследствие – карминено-червен въздушен мицел. Хранителната среда под колонията беше първоначално безцветна, а по-късно се оцветяваше в жълто до кафяво. Върху хифите на въздушния мицел се формираха многобройни, безцветни микроконидии с крушовидна, лимоновидна или сферична форма. Образуваните макроконидии бяха сравнително малко на брой, сърповидно извити, слабо разширени в средата с 1-3, по-рядко 4-5 напречни прегради и размери 3.0-4.9 µm x 9.2-38.5 µm. Хламидоспори се формираха интеркаларно в хифите, поединично или във верижки (Фиг. 2).

Получените изолати от вида *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc. клас *Sordariomycetes*, сем. *Nectriaceae* формираха добре развит, паяжиновиден, въздушен мицел, първоначално бял, а по-късно – бледожълт или светлокафяв, в който често се формираха оранжеви спородохии. Върху хифите на въздушния мицел се развиваха овални или слабо извити микроконидии с 1-2 септи и размери 9.2-17.2 µm. Макроконидиите бяха сърповидно извити, с базална клетка под формата на „краче", тънкостенни, с пет, рядко до осем ясно изразни септи и размери 54.2-60.1 µm. Често апикалната клетка се характеризираше със силно удължена форма или наподобяваше камшиче. Видът образуваше множество единични или подредени във верижки хламидоспори (Фиг. 2).

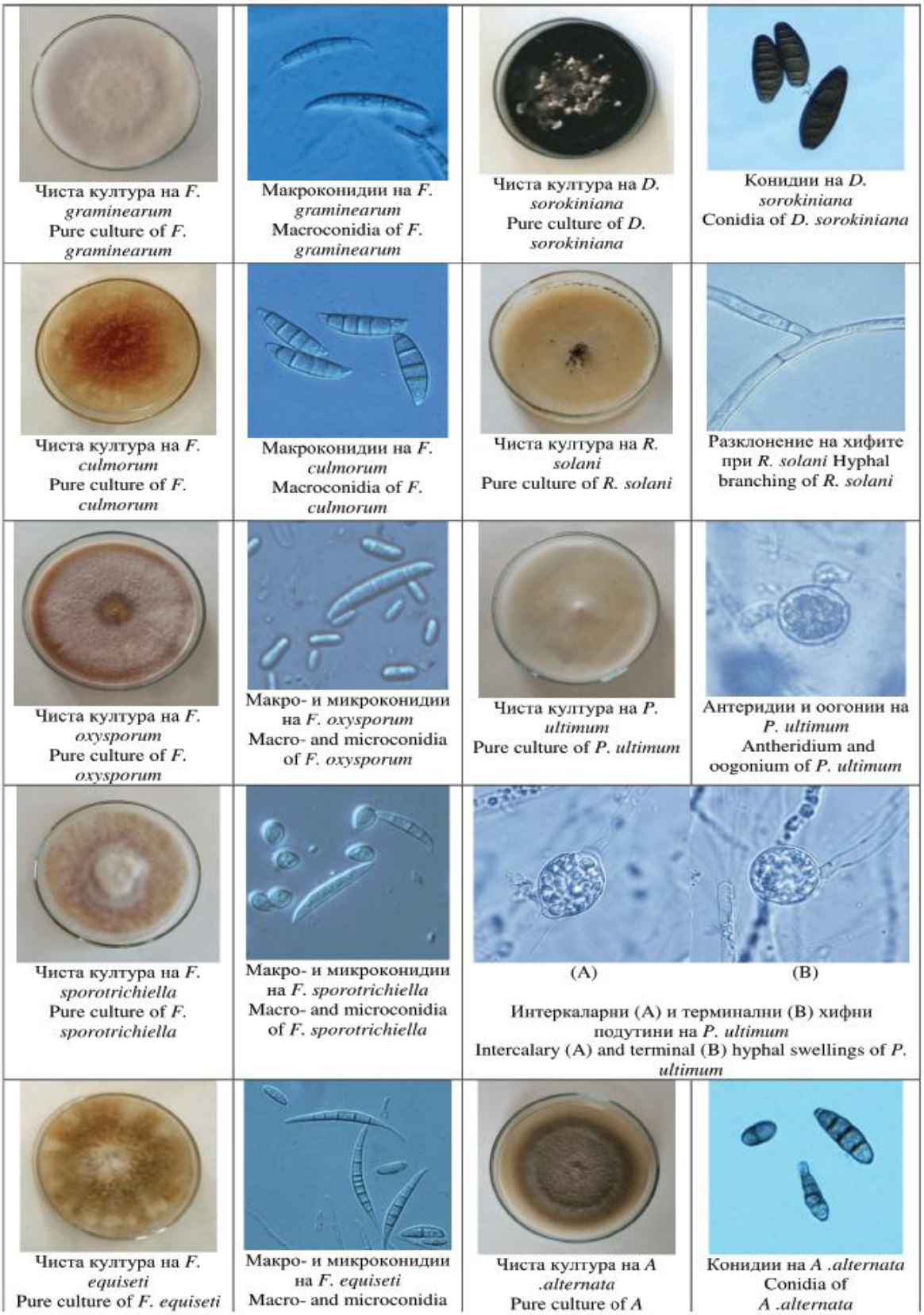
Върху КДА изолатите от вида *Drechslera sorokiniana* (Sacc.) Subram. and B.L. Jain, клас *Dothideomycetes*, сем. *Pleosporaceae* образуваха тъмен, маслинено-кафяв, сравнително бавно растящ мицел. Културите на гъбата продуцираха изобилие от прости, септирани, единични или на групи конидионосци с размери 110-220 µm x 6-10 µm. Конидиоспорите бяха едри, елипсовидни, или цилиндрични, тъмнокафяви или масленозелени, с 3-8 септи, и размери 50.0-70.0 µm x 15.0-20.0 µm (Фиг. 2).

Изолатите от вида *Pythium ultimum* Trow, клас *Oomycota*, сем. *Pythiaceae* образуваха колонии от плътен, въздушен, памуковиден мицел. Микроскопските наблюдения разкриваха наличие на закръглени до сферични хифни подутини, предимно интеркаларни, 14-28 µm в диаметър. Върху агарови хранителни среди беше наблюдавано формиране на спорангии със

закръглена или бъчвовидна форма, с размери 12-26 µm, терминални, понякога интеркаларни. Спорангиите на тези изолати прорастваха с кълн; не беше наблюдавано освобождаване на зооспори. Видът е хомоталичен. Във водни култури на изолатите се образуваха сферични оогонии, терминални, по-рядко интеркаларни, с гладка повърхност и размери 16-25 µm в диаметър. Антеридиите бяха мехуривидно издути, предимно моноклинни, възникващи непосредствено под оогония, извити, докосващи последния с остър връх. Формираните в резултат на половия процес ооспори бяха сферични, с гладка обвивка, аплеротични, 16-21 µm в диаметър (Фиг. 2).

Получените изолати от вида *Rhizoctonia solani* Kühn, клас *Agaricomycetes*, сем. *Ceratobasidiaceae* развиваха белезникав, въздушен и стелещ се, субстратен мицел. По-късно колониите потъмняваха, придобивайки светлокафява пигментация и характерно радиално разрастване на мицелните хифи от агаровото блокче към периферията на Петриевото блюдо. Гъбите развиваха септиран мицел с кафеникаво оцветяване и широчина на хифите между 5 и 15 µm. Хифите формираха разклонения в близост до крайната (връхна) септа. Новото разклонение често излизаше под прав или остър с характерното за вида прищипване (стесняване) в основата на новата хифа и формиране на септа на близко разстояние от мястото на разклонението. Изолатите от този вид не формираха спороношение. След 7-14 дни в колониите се образуваха светлокафяви до тъмнокафяви склероции, разпръснати или групирани, често в концентрични кръгове около агаровото блокче и по периферията на колонията (Фиг. 2).

Върху агарови хранителни среди изолатите от *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl., клас *Dothideomycetes*, сем. *Pleosporaceae* формираха буен, тъмнозелен или кафяв в центъра въздушен мицел, преминаващ до мръсно бял към краищата на колонията. Често в културата се наблюдаваше по-тъмно до черно прошарване в центъра и под формата на концентрични кръгове. Спороношението беше представено от тъмно маслиненозелено оцветени конидионосци, прости или разклонени, разположени поединично, или на групи. Конидиоспорите се формираха поединично или във верижки, често от по 7 до 10 конидии с удължена крушовидна или обратно бухалковидна форма, светло до златисто кафяво оцветяване, 2-6 тъмнокафяви до черни надлъжни и 0-3 напречни прегради. Спорите на този вид се характеризираха с добре изразен апикален израстък – по-къс от самата спора и конична форма на базалната клетка. Размерът на конидиите варираще между 21.7 µm и 45.0 µm на дължина и 10.0-12.5 µm в диаметър (Фигура 2).

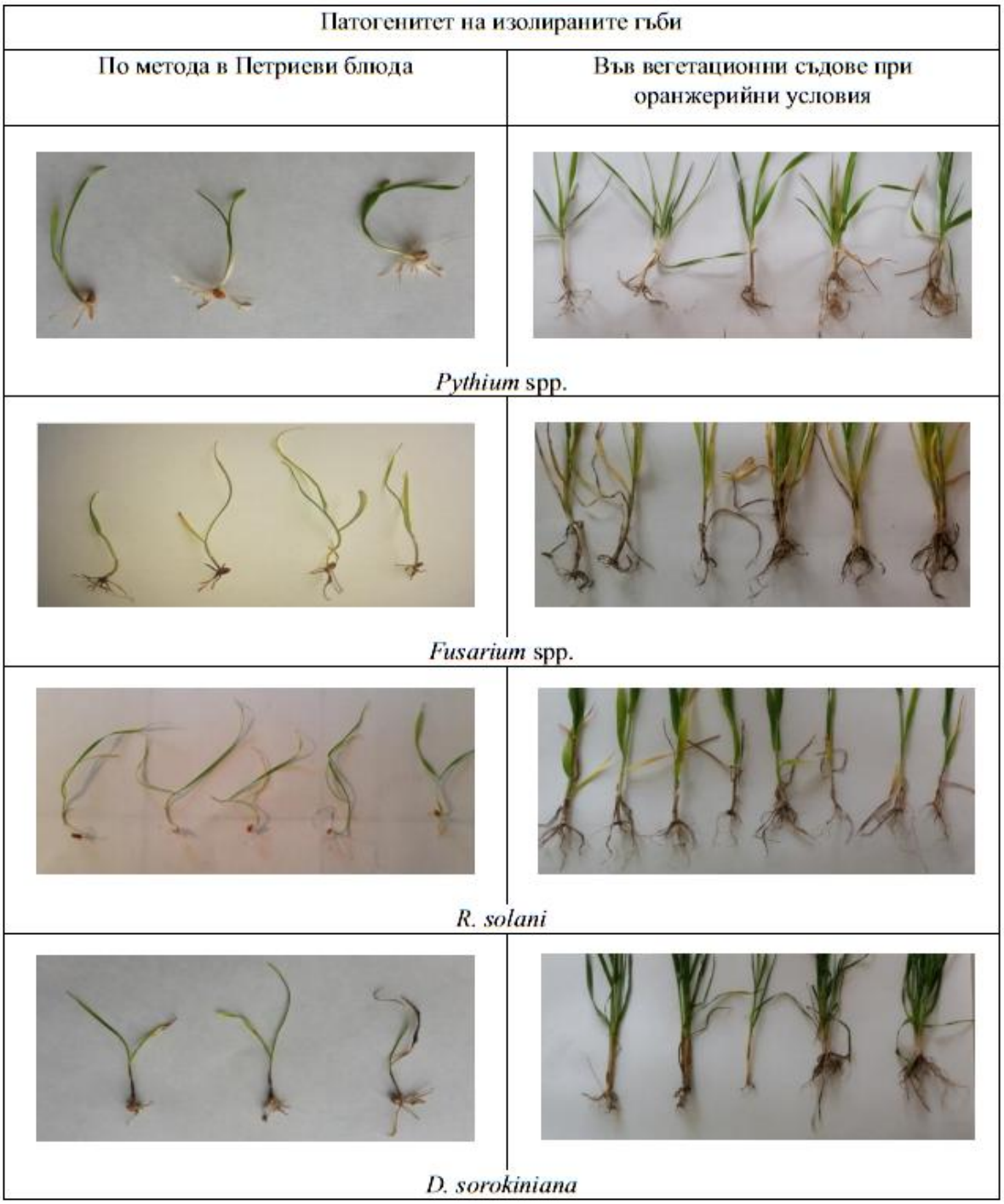


Фигура 2. Морфологични особености на фитопатогенни гъби, изолирани от корени и бази на житни култури със слята повърхност

1.4. Патогенитет на изолираните гъби

По метода за доказване на патогенитет в Петриеви блюда при лабораторни условия, изследваните изолати причиняваха некротични напетнявания, често прерастващи в гниене, по коренчетата и стъблата на инокулираните пшеничени кълнове. Некротични прояви бяха наблюдавани на 4-5-ти ден след инокулиране с всички изолати от род *Pythium*, 5-7 дни след инокулиране с гъбите от род *Fusarium* и 10-14 дни с изолатите от *R. solani* и *D. sorokiniana*. Освен по коренчетата и стъблото, *D. sorokiniana* предизвикваше некрози, и по листата на инокулираните кълнове. При направените впоследствие реизолации от повредените тъкани бяха получени чисти култури с таксономични характеристики, идентични на изходните щамове. Два от изпитваните осем изолата на гъбата *A. alternata* предизвикваха поява на сходни некротични напетнявания по опитните растения, като проявите бяха с видимо по-слаба интензивност в сравнение с останалите таксономични групи. Част от изолатите на този вид не заразяваха и не предизвикваха поява на симптоми на заболяване по инокулираните пшеничени кълнове.

В опитите за патогенитет, провеждани във вегетационни съдове при оранжерийни условия всички изпитвани изолати от род *Fusarium* предизвикваха гниене по корените и отчасти по основата на стъблата на отделни инокулирани растения от съответния гостоприемник. По-силни прояви на заболяване се наблюдаваха след инокулации с изолатите от видовете *F. culmorum*, *F. graminearum* и *F. sporotrichiella*. Инфекциите с тези видове често водеха до загиване и прореждане на част от растенията в опитните съдове. Всички изпитвани изолати от видовете *F. oxysporum* и *F. equiseti* причиняваха по-слаби прояви на кореново и базично гниене, като само отделни инокулирани растения от съответната култура загиваха преди края на опита. Изолатите от вида *D. sorokiniana* предизвикваха кореново, както и силно изразено базично гниене, засягащо практически всички опитни растения. Изкуствените заразявания с този патоген рядко водеха до загиване на отделни растения. С прояви на некротично напетняване по корените бяха свързани изкуствените заразявания с изолатите на *Pythium* spp., в т.ч. *P. ultimum*. Слабо кореново гниене и по-силно изразени некротични напетнявания в основата на стъблата бяха наблюдавани при заразяване на отделните гостоприемници с изолатите на *R. solani*. Изолатите от този вид предизвикваха загиване на значителна част от опитните растения, отглеждани в Алувиално-Ливадна почва. По-слабо развитие на болестта беше наблюдавано при провеждане на опитите в почва от типа Чернозем-Смолник. Аналогични резултати са установени в предходни изследвания, провеждани от Blair (1943) и Rovira (1986). Изолатите от вида *A. alternata* причиняваха слаби прояви на кореново и базично гниене или инфектираха растенията без видима проява на симптоми (Фигура 3).



Фигура 3. Кореново и базично гниене, причинено от гъбни и гъбоподобни видове

За изолатите на *F. oxysporum*, получени от див овес и кокоше просо беше изчислен индекс на нападение съответно 1.7 и 1.9 за *F. graminearum* (от пирей) – 2.1.

При направените реизолации от болни опитни растения бяха получавани реизолати с културални и морфологични особености, идентични с тези на внесените инокуланти.

Резултатите, представени в настоящето изследване показват, че редица почвени патогенни гъби и гъбоподобни организми, в т. ч. *F. oxysporum, F. graminearum, F. culmorum, F. sporotrichiella, F. equiseti, D. sorokiniana, Pythium ultimum, Pythium* spp., *R. solani* и *A. alternata*, атакуват корените и базите на житни култури със слята повърхност в България. Разпространението на патогените е повсеместно в обследваните зърнопроизводствени региони в страната. Отделните видове нападат житните растенията, както самостоятелно, така и в комплекси от по няколко патогенни вида. Предвид потенциалните загуби, свързани с причиняваните повреди по корените и основата на стъблата на растенията, налице е необходимост от разработване на ефективни стратегии за контрол над вредата, повишаване на добивите и качеството на зърното.

1.5. Изводи:

1) В резултат на проведените наблюдения на посеви с житни култури със слята повърхност в цялата страна са установени масово разпространени прояви на загиване на пониците и прореждане на посевите в началото на вегетационния период, кореново и базично гниене и некротични напетнявания в основата на стъблата, предимно в по-късни фази от развитие на растениията.

2) Като причинители на споменатите патологични явления са установени различни почвенопреносими гъбни и гъбоподобни фитопатогени. Констатираните морфологични характеристики на установените видове съответстват на тези, описани в използваните определители.

3) Гъбите от род *Fusarium* са сред най-широко разпространените причинители на некротични прояви по корените и базите на житни култури със слята повърхност в България, в т.ч. пшеница, ечемик, ръж, овес и тритикале. Видовете *F. oxysporum, F. graminearum* и *F. culmorum*, съставляват съответно 32%, 22%, и 17% от общия брой патогенни изолати, получени от симптомни житни растения. Видове *F. sporotrichiella* и *F. equiseti* се срещат спорадично по корените и основата на стъблата на вегетиращи житни (пшеничени и ръжени) растения в отделни посеви в страната.

4) Видът *F. equiseti* се съобщава за първи път като патоген, причиняващ кореново и базично гниене по пшеница и ръж.

5) Други почвообитаващи патогени, свързани с некротични повреди по корените и базите на пшеница, ечемик и лимец са *Drechslera sorokiniana* и *Rhizoctonia solani*. Двата вида съставляват съответно 11% и 8% от общия брой изолирани патогенни гъби.

6) Гъбата *D. sorokiniana* е установена още по еднозърнест лимец. Културата се съобщава като нов за нашата страна гостоприемник на патогена.

7) Гъбоподобни представители от род *Pythium*, сред които видът *P. ultimum* и отделни неидентифицирани изолати *Pythium* sp., заемат 10% от всички изолирани патогенни гъби. Представителите на този род са сред най-разпространените патогени, атакуващи кореновата система предимно на млади растения от пшеница, култивирани в преовлажнени и студени почви.

8) Установените видове заразяват растенията самостоятелно или в комбинации от два, и повече патогена едновременно. Смесени инфекции с участие на представители от род *Fusarium*,

Pythium и *Rhizoctonia* са установени в част от обследваните посеви от пшеница, ечемик и тритикале в страната.

9) Плевелни растения, като див овес, кокоше просо и пирей, са установени като алтернативни гостоприемници на *F. oxysporum* и *F. graminearum*.

10) Патогенните гъби от род *Fusarium* и видът *D. sorokiniana* предизвикват силни до умерени прояви на гниене по корените и по основата на стъблата на растения от съответния гостоприемник. По-силното нападение често води до загиване на растенията.

11) Инфекциите с *Pythium* spp. са свързани с прояви на некротично напетняване по корените и загиване на младите растения.

12) При заразяване на отделните гостоприемници с *R. solani* се наблюдават силно изразени некротични напетнявания в основата на стъблата и относително слабо гниене по корените. Атаките на патогена са свързани със загиване и полягане на растенията в по-късни фази на развитие.

2. Методи и средства за борба с гъбни болести по корени и бази на житни култури със слята повърхност

2.1. Химични методи и средства

2.1.1 Приложение на фунгицидни средства за борба с основни причинители на кореново и базично гниене по пшеница

2.1.1.1.Опити *in vitro*

Четири от изпитваните фунгицидни продукти – BAS 591 01 F, BAS 9242 4 F, Витавакс 2000 и Ранкона И-микс инхибираха напълно (100%) растежа на мицела на вида *F. culmorum* (*данните не са представени*). Допълнителни посявки на експонирани на фунгицидно въздействие агарови блокчета с предварително развита върху тях гъба върху чиста хранителна среда не показаха развитие на *F. culmorum* в продължение на 14 дни. Това категорично доказва, че тези четири продукта имат фунгициден ефект върху патогена. Същевременно използваният в опитите изолат на *F. culmorum* се развиваше успешно върху хранителна среда без добавка на фунгицид и изпълваше Петриевото блюдо до четиринадесетия ден след стартиране на *in vitro* опита, когато диаметърът на колонията достигаше 84.0 mm. Двата продукта подтискат напълно развитието на патогена до четвъртия ден след посявката. Значително редуциран е растежът на гъбата ($P \leq 0.001$) във вариантите с фунгицид в сравнение с нетретираната контрола, като тази тенденция се запазва до края на експериментирането. Значително по-силен инхибиращ ефект ($P \leq 0.001$) върху патогена се наблюдава във варианта с BAS 595 01 F, където растежът на колонията на *F. culmorum* беше преустановен след осмия ден от началото на опита.

Всички изпитвани фунгицидни продукти показаха 100% инхибиращ ефект върху растежа на мицела на вида *D. sorokiniana* (*данните не са представени*). Гъбата се развиваше успешно единствено в контролния вариант без добавен фунгицид. Гъбата не показа развитие в продължение на 14 дни след като експонирани на фунгицидно въздействие агарови блокчета с предварително развит върху тях мицел бяха прехвърлени от хранителна среда с фунгицид върху чиста хранителна среда. Този факт неоспоримо доказва, че всички изпитвани фунгициди проявяват летален ефект върху *D. sorokiniana*.

По идентичен начин, спрямо вида *P. ultimum* BAS 591 01 F, BAS 9242 4 F, Витавакс 2000 и Ранкона И-микс проявиха 100% инхибиращ ефект върху растежа на мицела и фунгицидно действие върху патогена.

Фунгицидът BAS 595 01 F инхибираше значително (*P≤0.001*) растежа на мицела на *P. ultimum* в сравнение с развитието на гъбата в контролния вариант без добавен фунгицид в хранителната среда. BAS 700 05 F демонстрираше незначителен фунгициден ефект върху патогена, но само в началото на експериментирането. След третия ден в този вариант гъбата се развиваше така, както и в нетретираната контрола.

2.1.1.2. Опити във вегетационни съдове.

Във всички проведени опити резултатите за разпространението на болестта, включващи процента на непоникналите и загинали пониции скоро след поникване, както и процента на растенията със видими симптоми на кореново и базично гниене в края на опита, показаха статистически доказани разлики между вариантите с предсеитбено, фунгицидно третиране на инокулираните семена и нетретираните контролни варианти при *P≤0.05*. Силно нападение беше отчетено в контролния, нетретиран вариант, съответно 21.7% загинали пониции и 57.5% симптомни растения в края на опита. Спрямо контролата, във вариантите с фунгицидно третиране на семената загиването на растенията в ранни фази беше редуцирано значително (*P≤0.001*), като процентът на загиване варираще между 0% във варианта с Ранкона И-микс до 1.7% в този с Витавакс 2000. Не бяха установени статистически доказани разлики в действието на трите фунгицида по отношение на прореждане на посевите в началото на вегетацията на опитните растения. Същата тенденция се запазваше до края на опита – значително (*P≤0.05*) редуциране на проявите на кореново и базично гниене във вариантите със фунгицидно третиране в сравнение с нетретираната контрола. Инхибирането на болестта варираще между 75.8% за Витавакс 2000 до 63.3% за BAS 9242 4 F, но между постигнатите нива на ефективност с използване на трите фунгицида не бяха констатирани статистически доказани разлики.

Силен инхибиращ ефект върху заболяването с причинител *D. sorokiniana* беше постигнат чрез третиране на семената и с трите изпитвани фунгицидни продукта. В сравнение с нетретираната контрола, загиването на младите пониции във вариантите с третиране беше незначително при *P≤0.001* – от 0% за Витавакс 2000 до 1.7% за BAS 9242 4 F. Същевременно, в края на вегетацията не бяха отчетени болни растения след третиране с BAS 9242 4 F, докато нападението във вариантите с Витавакс 2000 и Ранкона И-микс беше съответно 14.2% и 9.2%, с висока статистическата достоверност на разликите в действието на трите фунгицида *P≤0.001*. Спрямо контролния вариант и трите фунгицида демонстрираха относително високо ниво на контрол – BAS 9242 4 F – 96.1% (пълен контрол), Ранкона И-микс – 77.3% и Витавакс 2000 – 67.8%.

Трите изпитвани фунгицида демонстрираха сходна ефективност по отношение на заболяването, причинено от вида *P. ultimum*. Двете отчитани прояви на заболяване – загиване на кълновете, кореновото и базично гниене по пшеницата са редуцирани значително (*P≤0.001*) във вариантите с фунгицидно третиране спрямо нетретираната контрола. Едновременно с това, редуцирането на болестта с използване на трите фунгицидни средства варира между 92.2% и 81.9%, съответстващо на ниво пълен контрол.

Три от изследваните от нас фунгицидни продукта – BAS 9242 4 F, Витавакс 2000 и Ранкона И-микс показаха достатъчно силен инхибиращ и фунгициден ефект върху и трите, прицелни за изследването патогена. По-нататъшни изследвания, провеждани във вегетационни съдове с третиране на изкуствено инокулирани семена от пшеница, демонстрираха висока ефективността на фунгицидите по отношение на причиняваните от *F. culmorum, D. sorokiniana* и *P. ultimum* индивидуални заболявания по културата.

Резултатите от настоящото изследване показват, че съществуват разработени, ефективни фунгицидни продукти за контрол на комплекса от семеннопреносими, почвообитаващи, патогенни гъби по пшеница и други житни култури със слята повърхност. Предвид ежегодните загуби, свързани с прореждане на посевите, повреди по корените и основата на стъблата на растенията в производството, налице е необходимост от разработване на ефикасни, широкоспектърни формулации и/или подходящи резервоарни смеси от фунгициди за контрол над целия комплекс от патогенни организми, и за повишаване на добивите и качеството на зърното. За тази цел е необходимо провеждане на допълнителни, по-нататъшни изследвания на терен и в условия на производство.

2.1.1.3. Изводи

1) Сред тестираните в условия *in vitro* фунгицидите BAS 591 01 F (прохлораз 60 g/L + тритиконазол 20 g/L), BAS 9242 4 F (тирам 200 g/L + карбоксин 200 g/L), Витавакс 2000 (тирам 200 g/L + карбоксин 200 g/L) и Ранкона И-микс (ипконазол 20 g/L + имазилил 50 g/L) показват 100% инхибиращ ефект върху растежа и фунгицидно действие спрямо трите изпитвани патогена – *F. culmorum*, *D. sorokiniana* и *P. ultimum* при 37.5, 75, 10 и 25 ml на литър агар, съответно. BAS 700 05 F (флуксапироксад 333 g/L) и BAS 595 01 F (прохлораз 60 g/L + тритиконазол 20 g/L) проявиха фунгицидни свойства към вида *D. sorokiniana* и фунгистатичен (задържащ растежа на мицела) ефект върху *F. culmorum* и *P. ultimum* при 18.75 и 37.5 ml на литър агар.

2) В опити, провеждани във вегетационни съдове с изкуствено инокулирани семена от пшеница най-силен потискащ ефект (75.8%) по отношение на гниенето на кълновете и пониците, причинено от *F. culmorum* се откроява фунгицидът Витавакс 2000, приложен предсеитбено в препоръчителната доза за продукта 200 ml за 100 kg семена. Високо ефективни срещу болестта са още Ранкона И-микс в доза 100 ml/100 kg и BAS 9242 4 F в доза 300 ml/100 kg семе, като постигнатите нива на контрол са съответно 69.4% и 63.3%.

3) Пълен контрол над заболяването по пшеницата с причинител *D. sorokiniana* показва BAS 9242 4 F – 96.1% редуциране на проявите на загиване в ранни фази от развитие на растенията. Фунгицидното третиране на семена на културата с Ранкона И-микс и Витавакс 2000 води до значителен, макар и по-слаб инхибиращ ефект – 77.3% и 67.8%, съответно.

4) Високи нива на ефективност срещу загиването на кълновете и пониците на пшеница, причинено от *P. ultimum* – между 92.2% и 81.9%, се постигат чрез използване и на трите фунгицида – Витавакс 2000, BAS 9242 4 F, и Ранкона И-микс, приложени предсеитбено върху инфектирани с патогена семена.

2.2. Агротехнически и културностопански методи и средства

2.2.1. Ефект на естествен тревен прелог върху фузарийното кореново и базично гниене по пшеница

В резултат на култивиране на пшеничени растения в неинокулирани допълнително с патоген почви, събрани от необработваеми и обработваеми площи (варианти 1 и 2, Таблица 2), бяха констатирани ниски нива на кореново и базично гниене. В края на опита от корените на растения бяха изолирани гъби от род *Fusarium*, вероятна причина за нападението. Относително висок индекс на нападение – 4.38, 4.32 и 2.46, се констатира във вариантите, в които опитните почви бяха изкуствено инокулирани, съответно с *F. culmorum*, *F. graminearum* или *F. oxysporum*. Сравнявайки ефекта на състоянието на почвите – обработваеми без прекъсване и необработваеми (затревени), върху проявите на заболяване, причинявано от всеки един от трите патогена е видно, че кореновото и базично гниене е по-интензивно при отглеждане на растенията в почви от

обработваеми терени в сравнение с тези от необработваеми. Разликите в индексите на нападение и за трите патогена в двете сравнявани почви са статистически значими (*P≤0.001*). Нивото на подтискане на проявите на заболяване във вариантите с необработваема почва, обаче е от порядъка на 9.6%-25.2% (*непредставени резултати*), което може да се разглежда като незначително от агрономическа гледна точка.

Таблица 2.

Прояви на фузарийно кореново и базично гниене по пшеница в излужена Чернозем-Смолница след инокулиране с три отделни патогенни гъби.

№	Вариант		Индекс на нападение*	Разпределение по Duncan**	Статистическа доказаност
	Почва	Патоген			
1	Необработваема	Без	0.18	a	Контрола
2	Обработваема	Без	0.24	a	ns
3	Необработваема	*F. culmorum*	3.96	d	+++
4	Обработваема	*F. culmorum*	4.38	e	+++
5	Необработваема	*F. graminearum*	3.76	d	+++
6	Обработваема	*F. graminearum*	4.32	f	+++
7	Необработваема	*F. oxysporum*	1.84	b	+++
8	Обработваема	*F. oxysporum*	2.46	c	+++
			F = 929,92 Sd = 0,081 $LSD_{0.001}$ = 0,164	ns – статистически недоказана разлика; + = *P≤0.05*; ++ = *P≤0.01*; +++ = *P≤0.001*	

*Индексът на нападение е изчислен, като средна стойност от степента на нападение по корените и базите на растенията в съответния вариант от два последователно проведени опита. Степента на нападение е отчетена по 0-5 бална скала, където 0 = липса на видими повреди по кореновата система; 5 = коренова система, изцяло обхваната от гниене, болните растения увяхват трайно и загиват.

**Стойности, обозначени с различни символи, са статистически различни при *P≤0.001*, съгласно метода за разпределение на Duncan.

Сходни резултати бяха получени при провеждане на опита с Алувиално-Ливадна почва (Таблица 3). Във вариантите без изкуствено инокулиране, както в обработваемата, така и в необработваема почви, не бяха констатирани видими прояви на заболяване. Този факт подчертава липсата на външен, за използваната експериментална система, инфекциозен натиск върху отчетените стойности на нападение в това изследване. Висок индекс на кореново и базично гниене беше констатиран във всички варианти с изкуствено инокулиране на опитните растения с видове от род *Fusarium*. Не бяха установени разлики в интензитета на заболяване между вариантите с обработваема и необработваема почва след инокулиране с *F. culmorum*, и *F. oxysporum*. Когато внесеният инокулум беше от вида *F. graminearum*, статистически по-нисък индекс на нападение беше отчетен по корените и базите на растенията, отглеждани в необработваема почва в сравнение с обработваемата (*P≤0.001*). Както в предходния опит с Чернозем-Смолник, така и в Алувиално-Ливадната почва, разликата в нападението във вариантите с обработваема и необработваема почва беше без значение от стопанска гледна точка.

Таблица 3.

Прояви на фузарийно кореново и базично гниене по пшеница в Алувиално-Ливадна почва след инокулиране с три отделни патогенни гъби.

№	Вариант		Индекс на нападение*	Разпределение по Duncan**	Статистическа доказаност
	Почва	Патоген			
1	Необработваема	Без	0.0	a	Контрола
2	Обработваема	Без	0.0	a	ns
3	Необработваема	*F. culmorum*	4.44	d	+++
4	Обработваема	*F. culmorum*	4.54	d	+++
5	Необработваема	*F. graminearum*	4.20	c	+++
6	Обработваема	*F. graminearum*	4.50	d	+++
7	Необработваема	*F. oxysporum*	2.27	b	+++
8	Обработваема	*F. oxysporum*	2.00	b	+++
			F = 387,05 Sd = 0,110 $LSD_{0.001}$ = 0,225	ns – статистически недоказана разлика; + = *P≤0.05*; ++ = *P≤0.01*; +++ = *P≤0.001*	

*Индексът на нападение е изчислен, като средна стойност от степента на нападение по корените и базите на растенията в съответния вариант от два последователно проведени опита. Степента на нападение е отчетена по 0-5 бална скала, където 0 = липса на видими повреди по кореновата система; 5 = коренова система, изцяло обхваната от гниене, болните растения увяхват трайно и загиват.

**Стойности, обозначени с различни символи, са статистически различни при *P≤0.001*, съгласно метода за разпределение на Duncan.

На таблица 4 са представени осреднените резултати от опити, сравняващ развитието на болестта с причинител вида *F. culmorum* в стерилизирана и нестерилизирана (естествена), обработваема и необработваема почва, тип Чернозем-Смолник. Липса или много ниски нива на заболяване бяха констатирани във всички почвени проби без допълнително внесен инокулум на патогена (варианти 1-4, таблица 4). И в този експеримент изследваната необработваема почва потиска в известна степен развитието на болестта, но ефектът е агрономически незадоволителен (варианти 7 и 8). Резултатите от опита показват, че естествената почва – обработваема и необработваема, оказва супресивен ефект върху заболяването. Това се демонстрира ясно чрез установеното статистически по-ниско ниво на нападение в нестерилизираните почви – обработваема и необработваема (варианти 7 и 8), в сравнение със стерилизираните им аналози (варианти 5 и 6). Очевидно, в резултат на термично стерилизиране изследваната почва губи своята супресивност. Това води до по-висок, при това статистически еднакъв индекс на нападение във вариантите със стерилизирани почви. Обяснението вероятно се дължи на биологичното (микробиологично) естество на почвената супресивност (Cook and Baker, 1983; Killham, 1994; Boudreau and Mundt, 1997), фактор, който бива елиминиран напълно в процеса на термичната стерилизация (Mazzola, 2010; Vatchev, 2016).

Таблица 4.

Прояви на фузарийно кореново и базично гниене по пшеница в излужена Черноземно-Смолница след инокулиране с *Fusarium culmorum*.

№	Вариант		Индекс на нападение*	Разпределение по Duncan**	Статистическа доказаност
	Почва	Патоген			
1	Необработваема, стерилизирана	Без	0.0	a	Контрола
2	Обработваема, стерилизирана	Без	0.0	a	ns
3	Необработваема, естествена	Без	0.30	b	+
4	Обработваема, естествена	Без	0.18	a,b	ns
5	Необработваема, стерилизирана	*F. culmorum*	4.60	e	+++
6	Обработваема, стерилизирана	*F. culmorum*	4.70	e	+++
7	Необработваема, естествена	*F. culmorum*	3.46	c	+++
8	Обработваема, естествена	*F. culmorum*	3.78	d	+++
			F = 728.43 Sd = 0.114 $LSD_{0.001}$ = 0.232	ns – статистически недоказана разлика; + = *P≤0.05*; ++ = *P≤0.01*; +++ = *P≤0.001*	

*Индексът на нападение е изчислен, като средна стойност от степента на нападение по корените и базите на растенията в съответния вариант от два последователно проведени опита. Степента на нападение е отчетена по 0-5 бална скала, където 0 = липса на видими повреди по кореновата система; 5 = коренова система, изцяло обхваната от гниене, болните растения увяхват трайно и загиват.

**Стойности, обозначени с различни символи, са статистически различни при *P≤0.001*, съгласно метода за разпределение на Duncan.

Осреднените резултати (представени на таблица 5) от два последователни опита, проведени с Алувиално-Ливадна почва разкриват същите тенденции в развитие на заболяването: липса или много слаби прояви на кореново гниене във вариантите без изкуствено инокулиране с *F. culmorum*, и по-нисък индекс на нападение в необработваемата, естествена почва в сравнение с обработваемата. И тук, както и в предходните опити, обаче, нивото на потискане на болестта в обработваемите почви очевидно не би имало стопанско значение за практиката. И при този почвен тип по-ниският индекс на нападение (*P≤0.001*) при култивиране на опитните растения в нестерилизирани почви – обработваема или в прелог, в сравнение със стерилизираните техни аналози показва наличие на известна супресивност на почвата по отношение на заболяването при „естествени" условия на полето. В потвърждение на представените по-горе резултати, по-високият индекс на нападение след стерилизиране показва, че супресивният ефект на почвата се губи напълно или частично след термичната обработка на почвата и е резултат от елиминирането на естествената почвена микрофлора. Установените в проучването факти са убедително доказателство за биологичния характер на естествената супресивност на двата почвени типа спрямо фузарийното кореново и базично гниене по пшеницата.

Таблица 5.

Прояви на фузарийно кореново и базично гниене по пшеница в Алувиално-Ливадна почва след инокулиране с *Fusarium culmorum*.

№	Вариант		Индекс на нападение*	Разпределение по Duncan**	Статистическа доказаност
	Почва	Патоген			
1	Необработваема, стерилизирана	Без	0.0	a	Контрола
2	Обработваема, стерилизирана	Без	0.0	a	ns
3	Необработваема, естествена	Без	0.14	a,b	ns
4	Обработваема, естествена	Без	0.20	b	+
5	Необработваема, стерилизирана	*F. culmorum*	4.32	e	+++
6	Обработваема, стерилизирана	*F. culmorum*	4.48	e	+++
7	Необработваема, естествена	*F. culmorum*	3.16	c	+++
8	Обработваема, естествена	*F. culmorum*	3.92	d	+++
			F = 272.18 Sd = 0.084 $LSD_{0.001}$ = 0.170	ns – статистически недоказана разлика; + = *P≤0.05*; ++ = *P≤0.01*; +++ = *P≤0.001*	

*Индексът на нападение е изчислен, като средна стойност от степента на нападение по корените и базите на растенията в съответния вариант от два последователно проведени опита. Степента на нападение е отчетена по 0-5 бална скала, където 0 = липса на видими повреди по кореновата система; 5 = коренова система, изцяло обхваната от гниене, болните растения увяхват трайно и загиват.

**Стойности, обозначени с различни символи, са статистически различни при *P≤0.001*, съгласно метода за разпределение на Duncan.

По данни от отделни литературни източници прелогът с естествен тревен чим или изкуствено създадена тревна растителност води до редуциране на инокулумния потенциал на инфектирани, земеделски почви с история на заболявания по житни (Gutteridge et al., 2006), или други култури (Ushiyama and Ogaki, 1970; Denny et al., 1993; Sileshi et al., 2008). Счита се, че биологичният механизъм, който стои зад ефекта е свързан с редуциране на популационната плътност на патогените в почвата в резултат на отсъствие на чувствителен гостоприемник през периода на прелог (Denny et al., 1993; Noling and Becker, 1994). Настоящото изследване проследява възможността за изграждане на супресивен ефект в обработваемите почви чрез поддържане на краткотраен тревен прелог върху съответната площ. Получените резултати, обаче, не потвърждават първоначалната хипотеза, както и предположения на други автори (Garbeva et al., 2004) за очаквано повишаване на естествената почвена супресивност спрямо фузарийно кореново и базично гниене по пшеницата, като резултат от поддържане на земеделската площ в състояние на тревен залеж (прелог). Макар че изследваните почви показват известна супресивност, изразяваща се в незначително, от стопанска гледна точка, по-слабо развитие на болестта в сравнение със стерилизираните техни аналози, „почивката" през периода на прелог не води до изграждане на допълнителен супресивен ефект върху прицелното заболяване.

Резултатите от настоящото изследване показват, към използването на естествен, тревен прелог трябва да се подхожда с повишено внимание, а препоръчването му като метод за контрол над болести по растенията, запазващи се с инокулум в почвата трябва да става след предварително проследяване на възможните ефекти върху конкретната патосистема.

2.2.2. Изводи

1) Изследваните два типа почви — оказват супресивен ефект спрямо фузарийното кореново и базично гниене по пшеницата с причинители *F. culmorum*, *F. graminearum* или *F. oxysporum*. Нивото на подтискане на проявите на заболяване, обаче, е незначително от агрономическа гледна точка – 9.6%-25.2%, съответно за трите патогена.

2) Поддържането на тревен прелог върху двата типа почви в продължение на четири и седем години, съответно за Чернозем-Смолник и Алувиално-Ливадна, не е в състояние да повиши почвената супресивност спрямо заболяването до практически значими нива на контрол.

3) Използването на прелог за контрол над болести по растенията, запазващи се с инокулум в почвата, трябва да се осъществява след предварително проучване на възможните ефекти от въвеждането му като метод при всяка конкретна патологична система: култура – патоген – почвен тип.

2.3. Биологични методи и средства

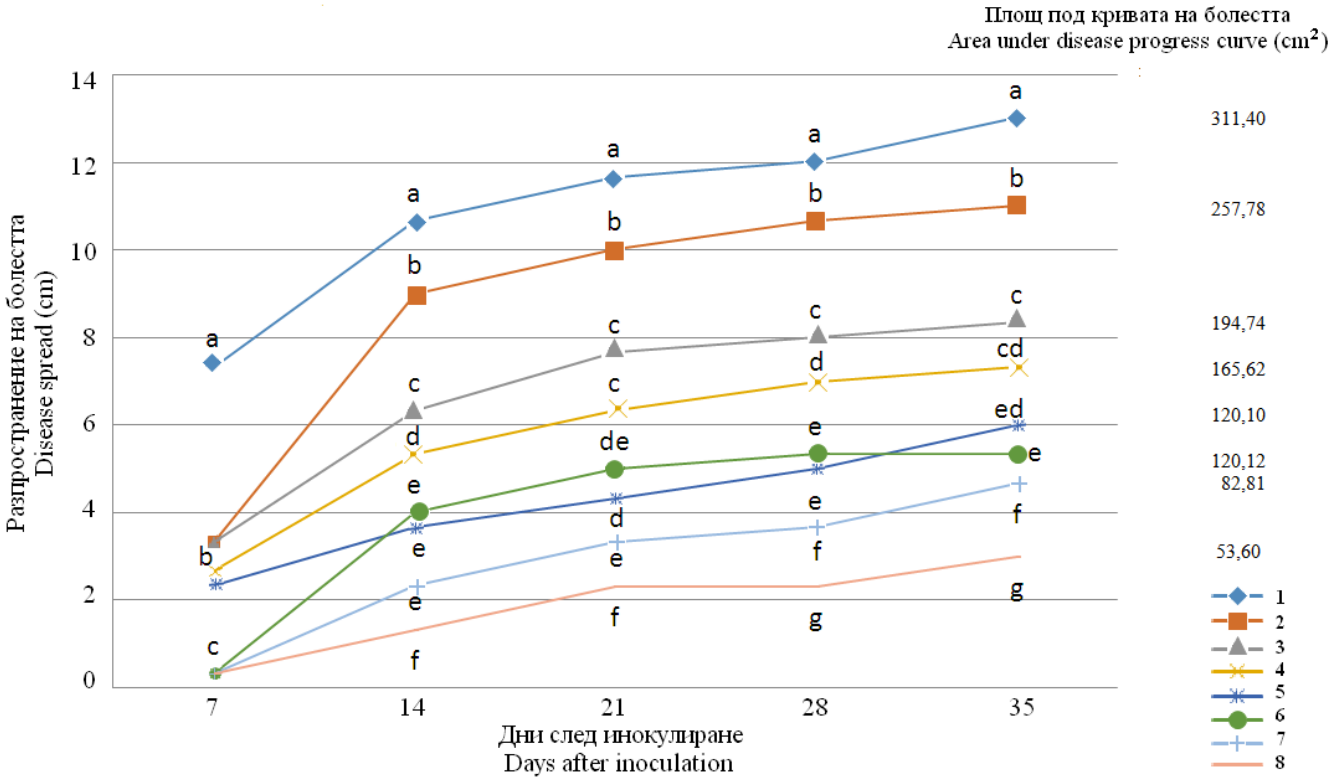
2.3.1. Приложение на компостиран овчи тор за повишаване на почвената супресивност към ризоктонийно кореново гниене по пшеница

На фигура 4 са представени резултатите за разпространение на ризоктонийното кореново гниене по пшеничените растения спрямо източника на инокулум в отделните варианти между седмия и 35-я ден след инокулиране. При всяко отчитане (през интервали от седем дни) бяха констатирани значителни статистически разлики ($P \leq 0.001$) между отделните третирания. Като цяло, значително по-силно нападение беше наблюдавано във вариантите със стерилизирана почва (1-4). Ризоктонийното кореново гниене се разпространяваше по опитните пшеничени растения на най-голяма дистанция от източника на инокулиране в нетретираната, стерилизирана контрола (вариант 1) – на 13 cm при последното, пето отчитане на 35-я ден след инокулирането. Същевременно, значително по-слабо ($P \leq 0.001$) разпространение на ризоктонийното кореново гниене беше отчетено в нестерилизираната (естествена), нетретирана контрола (вариант 5), където заболяването достигаше 6 cm дистанция от източника на инокулум (Фигура 4). Разликите между двете нетретирани почви се обясняват с елиминиране на общата супресивност в резултат на термичното стерилизиране на първата и превръщането ѝ в максимално кондусивна (благоприятна за развитие на болестта, Cook and Baker, 1983; Vatchev, 2016). Може да се приеме, че в процеса на приложеното термично въздействие (140 °C за 2 h), почти напълно е убита естествената микрофлора в почвата – основен фактор, определящ нивото на почвената супресивност към фитопатогенни организми и причинявани от тях заболявания (Killham, 1994; Boudreau and Mundt, 1997; Mazzola, 2010). След предварително обогатяване на стерилизираната почва с добре разложен овчи тор (варианти 2-4) беше отбелязвано значително по-забавено ($P \leq 0.001$) разпространение на ризоктонийното кореново гниене в сравнение със съответната нетретирана (без органичен подобрител) контрола за целия период на отчитане (Фигура 4). При това дистанцията на разпространение на болестта в тези варианти намаляваше с увеличаване на внесените количества органичен тор – от 20 и 60 до 100 ml/L^{-1}, и достигаше 11, 8 и 7 cm, съответно от източника на инокулум до приключване на опита. При последното отчитане статистически еднаква беше дистанцията на нарастване на заболяването във варианта с най-голямо количество внесен органичен тор (вариант 4) и нетретираната, нестерилизирана (естествена) контрола (вариант 5). Резултатите недвусмислено показват, че в резултат на инкорпориране на компостиран овчи тор в стерилизирана, високо кондусивна почва супресивният ефект спрямо ризоктонийното кореново гниене по пшеницата се възстановява, като

внесената доза от 100 ml/L^{-1} почти напълно възвръща нивото на супресивност, отчетено в естествената почва.

От данните, представени на фигура 4 се вижда, че в съответствие с предварителните очаквания заболяването по опитните пшеничени растения нараства значително по-слабо (*P≤0.001*) във вариантите с нестерилизирана, естествена почва (варианти 5-8). Инкорпорирането на добре разложен овчи тор в естествената почва допълнително повишава супресивния ефект. Това се доказва със значително по-краткото разстояние от източника на инокулум, до което достига заболяването във вариантите с 60 и 100 ml/L^{-1} почва през целия период на отчитане на опита (варианти 7 и 8). В края на изследването дистанцията на разпространение на ризоктонийното кореново гниене в тези варианти достигаше съответно 4.4 и 5 cm.

Аналогични тенденции в резултатите, съответно за стерилизираната и нестерилизирана почва, бяха установени и по отношение на процента на редуциране на заболяването на база площ под кривата на болестта в края на опита (постигнато ниво на контрол, фигура 4), изчислявано по формулата на Abbott (*непредставени данни*). Вследствие на внесения в стерилизираната почва оборски тор заболяването беше редуцирано съответно със 17.2%, 37.5% и 46.8%, за вариантите с 20, 60 и 100 ml/L^{-1} почва (варианти 2-4), спрямо нетретираната контрола (вариант 1). А след внасяне на подобрителя в нестерилизирана почва, постигнатото ниво на контрол над ризоктонийното кореново гниене беше 0%, 31.0% и 55.4%, съответно във вариантите с 20, 60 и 100 ml/L^{-1} почва (варианти 6-8), спрямо нетретираната, нестерилизирана контрола (вариант 5, *непредставени данни*). И двата отчитани параметъра – скъсената дистанция на разпространение от източника на инокулум и редуцираната площ под кривата на прогресиране на болестта потвърждават първоначалната хипотеза за значително повишен супресивния ефект в Алувиално-Ливадната почва вследствие на инкорпориране на компостиран овчи тор. При това, с увеличаване на внесеното количество компостиран тор до 100 ml/L^{-1}, нараства и супресивния ефект на съответната третирана почва върху заболяването.



Фигура 4. Разпространение на ризоктонийно кореново гниене от точков източник на инфекция по пшеничени растения в стерилизирана и нестерилизирана почва, с или без инкорпориран овчи тор. Стойности, обозначени с различен буквен символ са статистически различни при *P≤0.001*, съгласно метода за разпределение на Duncan.

Индуцираният супресивен ефект от инкорпориране на добре разложен овчи тор в Алувиално-Ливадна почва по отношение на ризоктонийното кореново и базично гниене по пшеницата се демонстрира и от данните за здравното състояние на опитните растения в края на опита (35-и ден след инокулиране). Отчитането на този показател беше от значение поради спецификата на използвания в изследването тест, а именно възможността част от опитните растения в периметъра на разпространяващото се от източника на инокулум заболяване да остават видимо здрави до приключване на експеримента (Vatchev and Dijst, 2010; Вачев, *непубликувани данни*). Статистически доказани разлики (*P≤0.001*) между отделните варианти бяха констатирани по показателите „загинали" и „здрави" растения. Видимо по-отчетливо повишаване на супресивния ефект беше отбелязано в стерилизираната почва, където с повишаване на количеството внесен подобрител намаляваше броят на загиналите и се повишаваше броят на оставащите видимо здрави опитни растения. Във вариантите с нестерилизирана почва статистически по-висок брой здрави растения беше отбелязан в почвата с най-висока доза внесен оборски тор (вариант 8). Най-малко загинали растения бяха отчетени във вариантите с 60 и 100 ml подобрител на 1 L нестерилизирана почва.

С резултатите от проведените опити, от една страна привеждаме убедителни доказателства за супресивния характер на компостирания овчи тор, като почвен подобрител, а от друга – верифицираме използвания бърз метод за установяване на нивото на почвена

супресивност към ризоктонийното кореново гниене по пшеницата. Методът ще даде възможност за бърз, директен скрининг на неограничен брой почви, със или без добавка на почвени подобрители, относно нивото на рецептивност – вариращa от кондусивност до супресивност (Oyarzun *et al*., 1994; 1997; Vatchev, 2004), към заболяването по пшеница и други житни култури със слята повърхност.

Настоящото изследване доказва по неоспорим начин възможността за значително повишаване на супресивността на Алувиално-Ливадна почва спрямо ризоктонийно кореново гниене по пшеница чрез инкорпориране на добре разложен, оборски, овчи тор. Резултатите от проведените опити показват, че с внасяне на изследвания подобрител в почвата се редуцира разпространението на заболяването в пшеничения посев, намалява се броят на симптомните – болни и загинали, растения като, съответно, се увеличава броят на видимо здравите, безсимптомно развиващи се пшеничени растения. При това, с увеличаване на количеството на инкорпорирания овчи тор от 20 на 60 и 100 ml на 1 L почва – термично стерилизирана или нестерилизирана (естествена), инхибиращият, супресивен ефект върху заболяването нараства значително с увеличаване на използваната доза.

Очаквано по-висок супресивен ефект беше установен в естествена със или без подобрител почва в сравнение с стерилизираните почвени аналози. Този факт потвърждава биологичния характер на установената обща супресивност на почвата по отношение на заболяването, очевидно дължаща се на естествената почвена микрофлора или отделни нейни компоненти. Прилаганите количества на органичния подобрител в изследването, съответстват на дози на торене от 5, 15 и 25 m^3 оборски тор за декар обработваема площ при 25 cm дълбочина на орния слой. Така получените резултати могат успешно да се екстраполират към производствените условия на полето и да бъдат директно внедрени в земеделската практиката за борба с ризоктонийното кореново и базично гниене по пшеницата. Данните от изследването сочат, че за да има значим практически ефект, внасяните количества от подобрителя трябва да надвишават 15 m^3/daa^{-1} площ. Това предполага преимуществено локално приложение на органичния тор – върху площи, върху които заболяването е било разпространено през предходни години. Така предлаганият от нас подход би бил напълно съвместим с принципите на прецизното, локално-специфично земеделие.

На този етап на провежданата изследователска работа представяме изводи, касаещи практически аспекти на борбата с ризоктонийното кореново гниене по пшеницата с използване на компостиран овчи тор, а именно:

Инкорпорирането на добре разложен овчи тор в дози между 60 L и 100 ml/L^{-1} води до значително повишаване на нивото на общата почвена супресивност към ризоктонийното кореново гниене по пшеница в предварително стерилизирана или нестерилизирана, естествена, Алувиално-Ливадна почва.

Преизчислени към единица площ и 25 cm дълбочина на почвения профил, посочените дози съответстват на 15 до 25 m^3 подобрител на декар обработваема площ. В съответствие с принципите на прецизното земеделие, такива относително високи норми на органично торене биха могли да се прилагат локално върху участъци от полето с доказана история на ризоктонийното кореново гниене. Като почвен подобрител, компостираният оборски тор може да бъде включен в цялостна интегрирана система за екологически устойчив контрол над вредата от заболяването по пшеница.

Репродуцирането на получените резултати към други, сходни патологични системи трябва да се базира на предварителни данни, генерирани по емпиричен път на експериментиране при конкретните условия. Използваният от нас биологичен тест носи оригинален характер и ще даде

възможност за бърз, директен скрининг на неограничен брой почви и почвени подобрители, относно нивото на рецептивност към ризоктонийно кореново гниене по пшеница и други житни култури със слята повърхност.

2.3.2. Изводи:

1) Инкорпорирането на 60 или 100 ml/L-1 овчи тор (съответстващи на дози на торене от 15 и 25 m3 dca-1 обработваема площ при 25 cm дълбочина на орния слой) води до значително ($P \leq 0.001$) скъсяване на дистанцията на разпространение на ризоктонийното кореново гниене в посева от опитни растения от източника на инокулум и по-голям брой видимо здрави растения до 35-я ден след инокулирането.

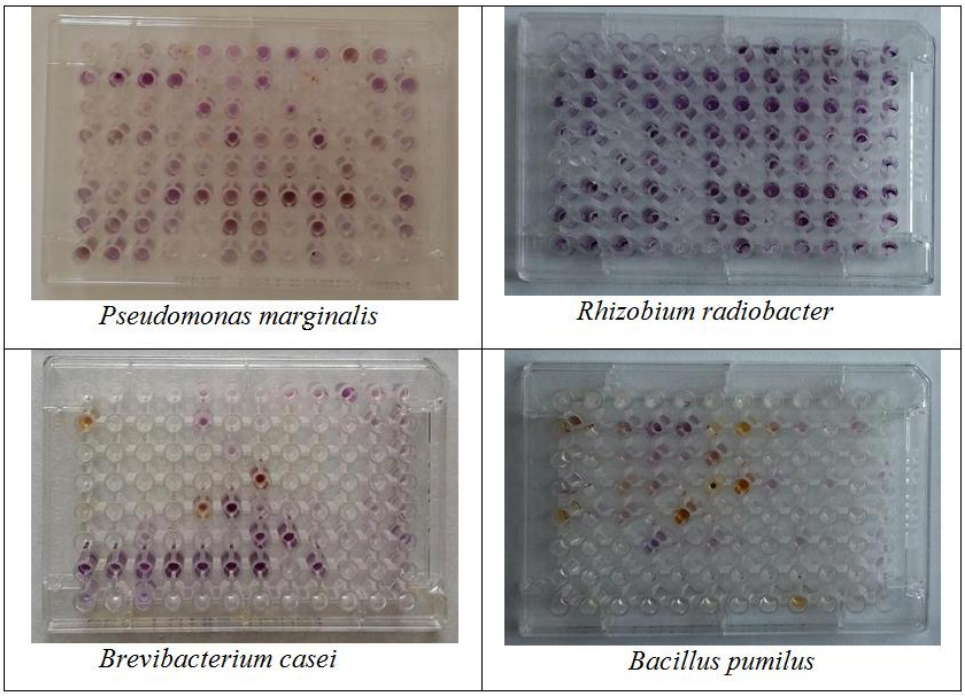
2) Компостираният овчи тор редуцира ризоктонийното кореново гниене по пшеницата, приложен самостоятелно върху участъци от полето с история на заболяване или като основен компонент на интегрирана система за опазване на културата.

3) Използваният от нас нов биологичен тест ще даде възможност за бърз, директен скрининг на неограничен брой почви и почвени подобрители, относно нивото на рецептивност към ризоктонийно кореново гниене по пшеница и други житни култури със слята повърхност.

2.3.3. Антагонистична активност на почвени и ризосферни бактерии по отношение на почвообитаващи гъбни патогени по житни култури със слята повърхност

2.3.3.1. Почвени и ризосферни бактерии, потенциални антагонисти

В настоящото изследване бяха идентифицирани общо пет вида бактерии, различаващи се по метаболитен профил. Софтуерът Microlog (Version- MicroLog™ 4.20.05) идентифицира изолатите от кореновата система на пшеница сорт Алтиго (Ямболски регион) като вида *Pseudomonas marginalis* със сходство 95%, сумарен индекс (SIM) 0.581 и дистанционен индекс (DIST) 6.08; *Rhizobium radiobacter*, обитаваща ризосферата на кореновата система на пшеница сорт Енола (гр. Костинброд) със сходство 100%, сумарен индекс (SIM) 0.615 и дистанционен индекс (DIST) 5.96; *Brevibacterium casei*, изолирана от корени на овес, сорт Дунав (гр. Карнобат) със сходство 100%, сумарен индекс (SIM) 0.662 и дистанционен индекс (DIST) 5.16; *Bacillus subtilis* със сходство 93%, сумарен индекс (SIM) 0.580 и дистанционен индекс (DIST) 5.86 GP-ROD SB; *Bacillus pumilus*, изолирана от кореновата система на овес, сорт Дунав (гр. Карнобат) със сходство 100%, сумарен индекс (SIM) 0.833 и дистанционен индекс (DIST) 2,51- GP-ROD SB (Фигура 5).



Фигура 5. Автоматизирана иденфикационна система, използваща микроблюда с 96 въглеродни източника.

2.3.3.2.Антагонистична активност на изпитваните бактерии

Резултатите за антагонистичната активност на изпитваните почвени и ризосферни бактерии върху вида *F. culmorum* са представени на таблица 6. Статистически значително ($P \leq 0.05$) потискане на растежа на мицела на патогена показаха три от изпитваните бактерии – *B. subtilis* (Фигура 6), *P. marginalis* и *B. casei*. В сравнение с контролния вариант, растежа на колонията на гъбата беше редуциран съответно с 22.6%, 16.7% и 11.8%. В присъствие на другите две бактерии *F. culmorum* също нарастваше по-слабо, но не бяха установени статистически разлики в размера на колониите между тези два варианта и нетретираната контрола.

Таблица 6.

Инхибиращ ефект на почвени и ризосферни бактерии върху растежа на мицела на гъбата *Fusarium culmorum* в опити *in vitro*.

Кандидат биоагент	Диаметър на гъбната колония (mm)[a] след различна продължителност на инкубиране (дни)				Инхибиране на растежа[b] (%)
	3	5	7	10	
Контрола	7.8 a	12.7 a	14.9 a	18.6 a	К
B. subtilis	4.1 b	5.5 c	6.8 c	14.4 d	22.6
R. radiobacter	6.1 b	9.1 b	15.4 a	17.8 ab	4.3
B. pumilus	6.6 b	10.9 ab	14.1 a	17.5 ab	5.9
P. marginalis	7.3 a	9.8 b	12.5 b	15.5 c	16.7
B. casei	6.1 b	9.6 c	13.5 ab	16.4 c	11.8
F=	11.221	34.500	36.810	18.060	
$LSD_{0.05}$=	0.109	0.100	0.149	0.106	

[a] Варианти, обозначени с еднакъв буквен символ се отнасят към един и същ клас на разпределение по Duncan спрямо изследвания признак – размер на колониите при нива на достоверност $P \leq 0.05$.

[b] Представената стойност се отнася за десетия ден на инкубиране.

Спрямо *F. graminearum*, от тестираните бактерии *B. subtilis* демонстрираше най-силен инхибиращ ефект (33.3% спрямо контролата, фигура 6), следвана от *P. marginalis* (24.3%), *B. casei* (22.8%) и *B. pumilus* (14.8%, Таблица 7). Видът *R. radiobacter* оказваше незначително стимулиращо действие върху растежа на мицела на изпитвания патоген до края на периода на експериментиране.

Таблица 7.

Инхибиращ ефект на почвени и ризосферни бактерии върху растежа на мицела на гъбата *Fusarium graminearum* в опити *in vitro*.

Кандидат биоагент	Диаметър на гъбната колония (mm)[a] след различна продължителност на инкубиране (дни)				Инхибиране на растежа[b] (%)
	3	5	7	10	
Контрола	7.3 a	11.7 a	16.3 a	18.9 a	К
B. subtilis	3.5 c	4.5 d	6.5 d	12.6 d	33.3
R. radiobacter	6.0 b	12.9 a	17.1 a	19.4 a	-2.6
B. pumilus	7.0 ab	9.6 b	12.6 b	16.1 b	14.8
P. marginalis	5.5 b	8.8 b,c	11.3 c	14.3 c	24.3
B. casei	4.6 c	8.4 c	12.1 b	14.6 c	22.8
F=	166.290	48.430	85.200	40.020	
$LSD_{0.05}$=	0.103	0.121	0.119	0.122	

[a] Варианти, обозначени с еднакъв буквен символ се отнасят към един и същ клас на разпределение по Duncan спрямо изследвания признак – размер на колониите.

[b] Представената стойност се отнася за десетия ден на инкубиране.

Аналогични резултати бяха получени в опити с *F. oxysporum*. Видовете бактерии *B. subtilis* (Фигура 6), *P. marginalis* и *B. casei* потискаха значително ($P \leq 0.05$) растежа на мицела на гъбния патоген, съответно с 30.7%, 29.0% и 29.5% (Таблица 8). *R. radiobacter* демонстрираше незначителен стимулиращ ефект в проведените опити (2.9%) върху растежа на мицела на гъбата.

Таблица 8.

Инхибиращ ефект на почвени и ризосферни бактерии върху растежа на мицела на гъбата *Fusarium oxysporum*, в опити *in vitro*.

Кандидат биоагент	Диаметър на гъбната колония (mm)[a] след различна продължителност на инкубиране (дни)				Инхибиране на растежа[b] (%)
	3	5	7	10	
Контрола	12.1 b	14.5 b	24.1 a	24.1 a	К
B. subtilis	5.9 d	6.9 e	8.9 c	16.7 c	30.7
R. radiobacter	15.8 a	20.0 a	22.9 a	24.8 a	-2.9
B. pumilus	11.0 b,c	12.3 c	15.0 b	18.9 b	21.6
P. marginalis	10.1 c	22.4 c	13.9 b	17.1 c	29.0
B. casei	4.8 d	8.9 d	14.4 b	17.0 c	29.5
F=	87.710	122.670	71.920	27.120	
$LSD_{0.05}$=	0.124	0.119	0.128	0.169	

[a] Варианти, обозначени с еднакъв буквен символ се отнасят към един и същ клас на разпределение по Duncan спрямо изследвания признак – размер на колониите при нива на достоверност $P \leq 0.05$.
[b] Представената стойност се отнася за десетия ден на инкубиране.

До петия ден след инокулиране на опитните единици с *F. sporotrichiella* всички изпитвани бактерии проявяваха значителен инхибиращ ефект върху растежа на мицела на гъбата (Таблица 9). До края на експериментите размерът на колониите на патогенната гъба в сравнение с контролата се запази значително по-малък във вариантите с *B. subtilitis*, *B. pumilus* и *P. marginalis* (Фигура 6), където инхибирането варираще между 34.8% и 28.9%. Видът *R. radiobacter* оказваше незначителен инхибиращ ефект (5.4%), *B. casei* демонстрираше слабо стимулиращо действие върху растежа на патогена с 6.9% (Таблица 9).

Таблица 9.

Инхибиращ ефект на почвени и ризосферни бактерии върху растежа на мицела на гъбата *Fusarium sporotrichiella* в *in vitro* опити.

Кандидат биоагент	Диаметър на гъбната колония (mm)[a] след различна продължителност на инкубиране (дни)				Инхибиране на растежа[b] (%)
	3	5	7	10	
Контрола	7.2 a	13.3 a	17.1 b	20.4 b	К
B. subtilis	4.4 c	7.4 c	10.4 d	13.3 d	34.8
R. radiobacter	4.1 c	6.1 c	16.8 c	19.3 b	5.4
B. pumilus	6.3 b	9.0 b	12.0 d	14.5 c	28.9
P. marginalis	4.1 c	7.0 c	8.3 e	12.9 d	36.8
B. casei	4.4 c	9.9 b	19.0 a	21.8 a	-6.9
F=	26.090	35.210	46.98	81.120	
$LSD_{0.05}$=	0.075	0.125	0.18	0.125	

[a] Варианти, обозначени с еднакъв буквен символ се отнасят към един и същ клас на разпределение по Duncan спрямо изследвания признак – размер на колониите при нива на достоверност $P \leq 0.05$.
[b] Представената стойност се отнася за десетия ден на инкубиране.

Бактериите *B. subtilis* (Фигура 6), *B. pumilus* и *P. marginalis* показваха значителен инхибиращ ефект – 35.4%, 29.6% и 32.7%, съответно към мицела на *F. equiseti* (Таблица 10). С

по-слаб, но статистически значим резултат (9.6% инхибиране) се отличаваше видът *B. casei*. *R. radiobacter* показваше незначителен стимулиращ ефект (1.5%) към растежа на мицела на патогенната гъба.

Таблица 10.

Инхибиращ ефект на почвени и ризосферни бактерии върху растежа на мицела на гъбата *Fusarium equiseti* в *in vitro* опити.

Кандидат биоагент	Диаметър на гъбната колония (mm)[a] след различна продължителност на инкубиране (дни)				Инхибиране на растежа[b] (%)
	3	5	7	10	
Контрола	13.2 a	14.5 b	24.1 a	26.0 a	К
B. subtilis	6.8 c	7.8 d	9.9 e	16.8 c	35.4
R. radiobacter	13.8 a	16 a	23.8 b	26.4 a	-1.5
B. pumilus	10.4 b	12.2 c	15.6 d	18.3 c	29.6
P. marginalis	9.3 b	11.7 c	14.5 d	17.5 c	32.7
B. casei	11.0 b	15.4 ab	19.0 c	23.5 b	9.6
F=	12.000	24.000	87.320	50.040	
$LSD_{0.05}$=	0.215	0.191	0.262	0.179	

[a] Варианти, обозначени с еднакъв буквен символ се отнасят към един и същ клас на разпределение по Duncan спрямо изследвания признак – размер на колониите при нива на достоверност $P \leq 0.05$.
[b] Представената стойност се отнася за десетия ден на инкубиране.

От данните представени на таблица 11 е видно, че растежът на *D. sorokiniana* беше потиснат значително в резултат от съвместното култивиране на гъбата с *B. subtilis* (Фигура 6) и *B. pumilus*, 41.6% и 26.6%, съответно. Незначителен стимулиращ ефект върху растежа на гъбния мицел беше наблюдаван във варианта с *R. radiobacter* – 0.4%.

Таблица 11.

Инхибиращ ефект на почвени и ризосферни бактерии върху растежа на мицела на гъбата *Drechslera sorokiniana* в *in vitro* опити.

Кандидат биоагент	Диаметър на гъбната колония (mm)[a] след различна продължителност на инкубиране (дни)				Инхибиране на растежа[b] (%)
	3	5	7	10	
Контрола	7.9 a	12.3 b	15.8 a	23.3 a	К
B. subtilitis	5.3 b	6.3 d	9.5 c	13.6 c	41.6
R. radiobacter	7.3 a	16.1 a	17.3 a	23.4 a	-0.4
B. pumilus	6.1 a	8.0 c	13.6 b	17.1 b	26.6
F=	3.77	47.36	33.47	47.68	
$LSD_{0.05}$=	0.172	0.185	0.173	0.116	

[a] Варианти, обозначени с еднакъв буквен символ се отнасят към един и същ клас на разпределение по Duncan спрямо изследвания признак – размер на колониите при нива на достоверност $P \leq 0.05$.
[b] Представената стойност се отнася за десетия ден на инкубиране.

Значителен инхибиращ ефект върху растежа на мицела на гъбоподобния патоген *P. ultimum* (43.6%) беше констатиран при тестиране на бактерията *P. marginalis* (Фигура 6). Резултатите са представени на таблица 12.

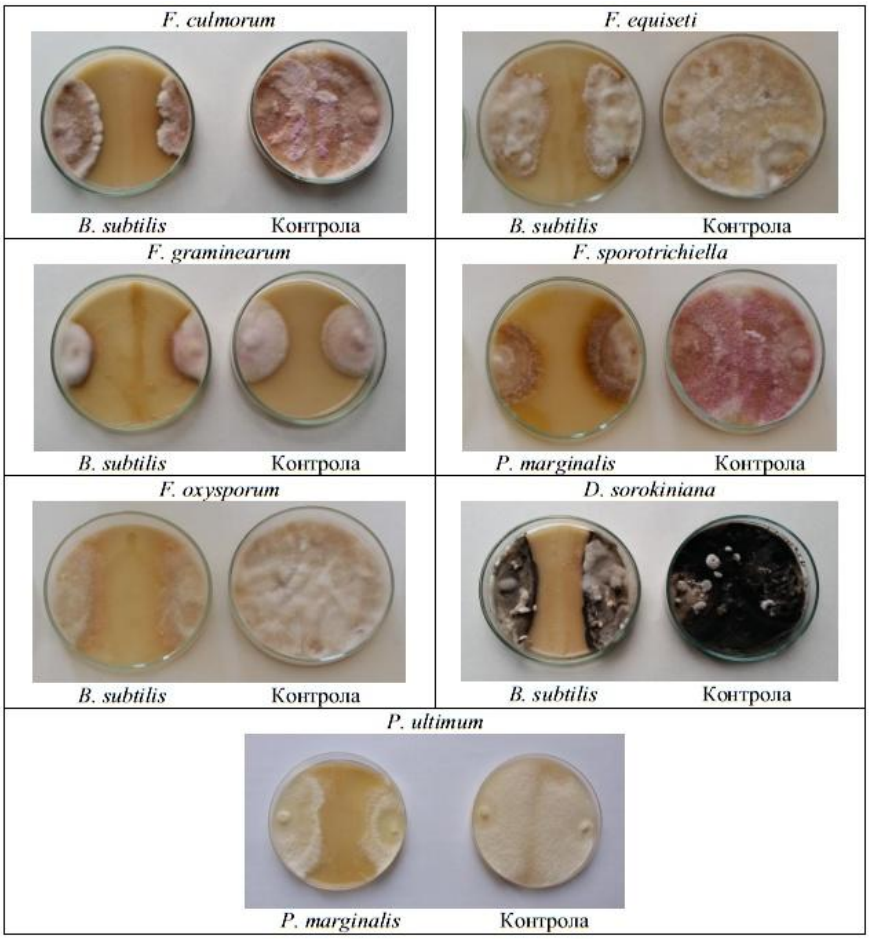
Таблица 12.

Инхибиращ ефект на почвени и ризосферни бактерии върху растежа на мицела на гъбата *Pythium ultimum* в *in vitro* опити.

Кандидат биоагент	Диаметър на гъбната колония (mm)[a] след различна продължителност на инкубиране (дни)				Инхибиране на растежа[b] (%)
	3	5	7	10	
Контрола	20.1 a	31.8 a	39.0 a	39.0 a	К
P. marginalis	15.3 b	19.8 b	21.0 b	22.0 a	43.6
F=	103.36	50.89	45.00	40.46	
$LSD_{0.05}$=	0.114	0.12	0.63	0.63	

[a] Варианти, обозначени с еднакъв буквен символ се отнасят към един и същ клас на разпределение по Duncan спрямо изследвания признак – размер на колониите при нива на достоверност $P \leq 0.05$.

[b] Представената стойност се отнася за десетия ден на инкубиране.



Фигура 6. Антагонистична активност на ризосферни и почвени бактерии – кандидат биоагенти, спрямо фитопатогенни гъби в опити *in vitro*.

Резултатите, получени в настоящото изследване показват, че изпитваните почвени и ризосферни бактерии са в състояние да подтискат растежа на мицела на широк кръг патогени по корените и базите на житни култури със слята повърхност. С най-широка антагонистична активност се отличават изолатите на видовете *B. subtilitis* и *P. marginalis*, инхибиращи растежа на мицела на по шест отделни патогена, в т.ч. *F. culmorum, F. graminearum, F. oxysporum, F. sporotrichiella* и *F. equiseti*. *B. subtilitis* се проявява като антагонист към *D. sorokiniana*, а *P. marginalis* – към *P. ultimum*. Видовете *B. pumilus* и *B. subtilis* показват антагонистични качества по отношение на еднакви гъбни видове, но *B. pumilus* демонстрира сравнително слаб инхибиращ ефект (5.9%) към мицела на *F. culmorum*. С антагонистични свойства по отношение на патогените свойства се отличава видът *B. casei*, инхибиращ мицела на четири вида гъби – *F. culmorum, F. graminearum, F. oxysporum, F. equiseti*, но с известен стимулиращ ефект (6.9%) върху *F. sporotrichiella*. Сред тестираните кандидат-биоагенти *R. radiobacter* е с най-тясна и сравнително слаба антагонистична активност към *F. culmorum* (4.3%) и *F. sporotrichiella* (5.4%). Бактерията се отличава със слаб стимулиращ ефект към *F. graminearum* (2.6%), *F. oxysporum* (2.9%), *F. equiseti* (1.5%) и *D. sorokiniana* (0.4%).

Резултатите от настоящото изследване показват, че съществуват ефективни и потенциални биоагенти в борбата с причиняваните заболявания в посевите. Предвид ежегодните загуби, свързани с прореждане на посевите, повреди по корените и основата на стъблата на растенията в производството, налице е необходимост от прилагане на ефикасни биоагенти за контрол над целия комплекс от патогенни организми и за повишаване на добивите и качеството на зърното. За тази цел е необходимо провеждане на допълнителни, по-нататъшни изследвания.

2.3.3.3. Изводи

1) Наред с фитопатогенни гъби и гъбоподобни оомицети, корените и базите на житни култури със слята повърхност в България се обитават от непатогенни за растенията представители на различни родове бактерии, в т.ч. *Pesudomonas, Rhizobium, Bacillus* и *Brevibacterium*. Сред тях са идентифицирани видовете *Pesudomonas marginalis, Rhizobium radiobacter, Brevibacterium casei, Bacillus subtilis* и *Bacillus pumilus*.

2) В опити *in vitro*, проведени при лабораторни условия наши изолати на бактерийните, почвени и ризосферни видове *B. subtilitis* и *P. marginalis* демонстрират висока антагонистична активност спрямо фитопатогенни за житните култури гъби *F. culmorum, F. graminearum, F. oxysporum, F. sporotrichiella* и *F. equiseti*.

3) Изпитваният изолат на *B. subtilitis* проявява силен антагонизъм още към *D. sorokiniana*, а изолатът на *P. marginalis* към *P. ultimum*.

4) Изолатът на *B. pumilus* антагонизира същите патогенни видове, като *B. subtilis*, но, като цяло, в по-слаба степен.

5) *Brevibacterium casei* демонстрира антагонистична активност към четири гъбни патогена – *F. culmorum, F. graminearum, F. oxysporum, F. equiseti*, а проявява известен стимулиращ ефект върху растежа на мицела на *F. sporotrichiella*.

6) Сред тестираните кандидат-биоагенти *R. radiobacter* проявява относително слаба антагонистична активност към отделни гъби от род *Fusarium*.

Заключение

В настоящата дисертационна работа са отразени извършените за периода 2014-2017 г. проучвания върху видовия състав, разпространението и методи и средства за контрол над почвенопреносими гъбни и гъбоподобни патогени по житни култури със слята повърхност в България. В резултат на проведените наблюдения на посеви с житни култури със слята повърхност в цялата страна са установени масово разпространени прояви на загиване на пониците и прореждане на посевите в началото на вегетационния период, кореново и базично гниене и некротични напетнявания в основата на стъблото, предимно в по-късни фази от развитие на растениията. Като причинители на споменатите патологични явления са установени различни почвенопреносими гъбни и гъбоподобни фитопатогени, отнасящи се към пет различни рода: *Fusarium, Drechslera, Rhizoctonia, Alternaria* и *Pythium*. Резултатите от проведените изследвания показват, че сред най-широко разпространените почвени патогени по житните култури у нас са гъбите от род *Fusarium*. Сред установените от нас видове са *F. oxysporum*, *F. graminearum* и *F. culmorum,* съставляващи съответно 32%, 22% и 17% от общия брой патогенни изолати, получени при микробиологичен анализ на корените и основата на стъблата на вегетиращи житни растения. Други видове от род *Fusarium,* като *F. sporotrichiella* и *F. equiseti* се срещат спорадично в отделни посеви с житни култури. Почвообитаващи патогени, свързани с некротични повреди по корените и базите на житни култури са също *Drechslera sorokiniana* и *Rhizoctonia solani*. Двата вида съставляват съответно 11% и 8% от общия брой изолирани фитопатогенни гъби. Гъбоподобни организми от род *Pythium*, по-специално видът *P. ultimum* и отделни неидентифицирани изолати *Pythium* sp., заемат 10% от изолираните патогени. Представителите на този род са сред най-разпространените видове, атакуващи кореновата система на житните растения, култивирани в преовлажнени и студени почви. Установените причинители на заболявания инфектират растенията самостоятелно или в комплекси от два, и повече патогена във всички фази от развитието, като причиниват гниене на семена и кълнове в началото на вегетазионния период, кореново и базично гниене в по-късни фенофази. По корените и основата на стъблата на част от анализираните житни растения са констатирани смесени инфекции с участие на представители от род *Fusarium, Pythium* и *Rhizoctonia*. Отделни гъбни изолати от род *Alternaria, Penicillium, Mucor* и *Aspergillus*, получени от тъкани на болни житни растения са установени като непатогенни за съответната култури. Предвид масовото разпространение на различни видове почвени патогенни гъби и гъбоподобни организми, констатираниата висока честота на загиване на растенията в ранни фенофази и прореждане на посевите, проявите на кореново и базично гниене считаме, че изследваните в настоящия дисертационен труд патологични явления по житните култури със слята повърйност са от особено икономическо значение за зърнопроизводството в нашата страна. Икономическото значение на наблюдаваните прояви на заболяване е обект на отделно изследване, като в настоящия труд изказваме предположението, че конкретните загуби в отделните зърнопроизводителни райони варират по години, в зависимост от вида на гостоприемника, почвено-климатичните и агрономически условия на отглеждане.

В търсене на подходящи средства за химична борба с прицелните за изследването заболявания е проследено действието на нови и утвърдени в практиката фунгицидни формулации върху растежа на мицела на три основни причинителя – *Fusarium culmorum, Drechslera sorokiniana* и *Pythium ultimum*. Сред тестираните в *in vitro* условия фунгицидни средства BAS 591 01 F (прохлораз 60 g/L + тритиконазол 20 g/L), BAS 9242 4 F (тирам 200 g/L + карбоксин 200 g/L),

Витавакс 2000 (тирам 200 g/L + карбоксин 200 g/L) и Ранкона И-микс (ипконазол 20 g/L + имазилил 50 g/L) показват 100% инхибиращ ефект върху растежа и фунгицидно действие върху трите изпитвани патогена, съответно при 37.5, 75.0, 10.0 и 25.0 ml на един литър от агарова среда. BAS 700 05 F (флуксапироксад 333 g/L) и BAS 595 01 F (прохлораз 60 g/L + тритиконазол 20 g/L) проявява фунгицидни свойства към вида *D. sorokiniana* и фунгистатичен (задържащ растежа на мицела) ефект спрямо *F. culmorum* и *P. ultimum* при 18.75 и 37.5 ml на литър агар. Ефективността на продуктите, показали фунгицидно действие срещу трите патогенни вида е изпитвана по отношение на загиване на кълновете и пониците на пшеница (сорт Мадара), причинявано от всеки един от патогените. Опитите са провеждани във вегетационни съдове със сеитба на третирани и нетретирани семена, изкуствено инокулирани с отделните видове. По отношение на заболяването, причинено от *F. culmorum*, с най-силен потискащ ефект (75.8%) се откроява Витавакс 2000, приложен в препоръчителната доза за продукта 200 ml за 100 kg семена, следван от Ранкона И-микс в доза 100 ml/100 kg и BAS 9242 4 F в доза 300 ml/100 kg, с постигнати нива на контрол, съответно 69.4% и 63.3%. Пълен контрол (96.1%) над болестта с причинител *D. sorokiniana* показва BAS 9242 4 F. Значителен, макар и по-слаб инхибиращ ефект дава предсеитбеното третиране на инфектирани с патогена семена с Ранкона И-микс и Витавакс 2000 – 77.3% и 67.8%, съответно. Високи нива на ефективност срещу загиването на кълновете и пониците, причинено от *P. ultimum* – между 92.2% и 81.9%, са постигнати чрез използване и на трите фунгицида – Витавакс 2000, BAS 9242 4 F, и Ранкона И-микс в препоръчителните дози.

Предвид многокомпонентния характер на етиологията и ежегодните загуби, свързани с прореждане на посевите в производството, налице е необходимост от разработване на ефикасни, широкоспектърни формулации и/или подходящи резервоарни смеси от фунгициди за контрол над целия комплекс от патогенни организми, и за повишаване на добивите и качеството на зърното.

В настоящия дисертационен труд е проследен ефекта на краткотраен, тревен прелог върху нивото на общата супресивност на два типа почви – Излужена Смолница и Алувиално-Ливадна почва, по отношение на фузарийно кореново и базично гниене по пшеницата с причинител *F. culmorum*, *F. graminearum* или *F. oxysporum*. Силно нападение и от трите изпитвани патогена беше констатирано както в Чернозем-Смолницата, така и в Алувиално-Ливадната почва. Незначително редуциране на кореновото и базично гниене – приблизително с 9% до 25%, беше наблюдавано в част от почвените проби, събрани от необработваните терени в сравнение с тези от обработваните. Макар и статистически доказано, установеното ниво на потискане на болестта в двата типа почви в състояние на прелог не може да се разглежда като практически значимо. В допълнително проведени опити с най-агресивния от трите патогена, *F. culmorum*, бяха отчетени статистически по-силни прояви на кореново и базично гниене в термично стерилизирани (240 °C за 2 h) монолити на изследваните почви в сравнение с тези в естествено състояние, нестерилизирани. С тези резултати изследването ясно демонстрира наличие на биологично детерминиран, естествен, супресивен ефект по отношение на фузарийното кореново и базично гниене по пшеницата в Излужена Смолница и Алувиално-Ливадна почва, но, и невъзможността за повишаване на почвената супресивност до практически значими нива на контрол над болестта чрез поддържане на обработваеми площи в състояние на краткотраен, тревен прелог. Изразено е становището, че използването на естествен, тревен прелог за контрол над болести по растенията, запазващи се в почвата, трябва да се осъществява след предварително проучване на възможните ефекти от въвеждането му като метод върху всяка конкретна патологична система.

В настоящия дисертационен труд е демонстрирана възможност за повишаване на супресивността на Алувиално-Ливадна почва към ризоктонийно кореново гниене по пшеница с причинител *Rhizoctonia solani* AG 4 чрез инкорпориране на добре разложен овчи тор в почвата.

Получените резултати показват, че инкорпорирането в термично стерилизирана (140 °C за 6 h) и нестерилизирана, естествена почва на 60 или 100 ml/L^{-1} овчи тор (съответстващи на дози на торене от 15 и 25 m^3/daa^{-1} обработваема площ при 25 cm дълбочина на орния слой) води до значително скъсяване на дистанцията на разпространение на ризоктонийното кореново гниене в посева от опитни растения от източника на инокулум, както и до по-голям брой видимо здрави растения до 35-я ден след инокулирането. Постигнатите с тези количества подобрител в почвата нива на контрол над заболяването, изразени като процент редуциране на заболяването на база площ под кривата на болестта, са съответно 37.5% и 46.8%, и 31.0% и 55.4%, спрямо нетретираните контроли, съответно в стерилизираната, и нестерилизирана почва. Основен извод от изследването е, че компостираният овчи тор може да бъде прилаган успешно за устойчива борба с ризоктонийното кореново гниене по пшеницата – самостоятелно, върху участъци от полето с история на заболяване или като основен компонент на интегрирана система за опазване на културата.

Наред с почвените фитопатогенни гъби и гъбоподобни оомицети в ризосферата на житните рестения е установена симбионтна микрофлора, в т.ч. бактерии от род *Pesudomonas, Rhizobium, Bacillus,* и *Brevibacterium*. В настоящата дисертационна работа е установена антагонистичната активност на наши изолати от видовете *Pesudomonas marginalis, Rhizobium radiobacter, Brevibacterium casei, Bacillus subtilis* и *Bacillus pumilus* върху растежа на мицела на седем основни патогена по корените и базите на житни култури – *Fusarium culmorum, F. graminearum, F. oxysporum, F. sporotrichiella, F. equiseti, Drechslera sorokiniana,* и *Pythium ultimum*. Получените резултати от опити *in vitro* показват, че с най-широка антагонистична активност се отличават изпитваните изолати на видовете *B. subtilitis* и *P. marginalis*. Тези две бактерии инхибират растежа на мицела на шест отделни патогена, както следва: *F. culmorum* – с 22.6% и 16.7%, *F. graminearum* – с 33.3% и 24.3%, *F. oxysporum* – с 30.7% и 29.0%, *F. sporotrichiella* – с 34.8% и 36.8%, и *F. equiseti* – с 35.4% и 32.7%, съответно. Изпитваният изолат на *B. subtilitis* проявява антагонизъм още към *D. sorokiniana*, а този на *P. marginalis* към *P. ultimum*, подтискайки разтежа на мицела на двата патогена с 41.6%. Изолатът на *B. pumilus* антагонизира същите патогени като *B. subtilis*, но като цяло в по-слаба степен. *B. casei* демонстрира антагонистична активност спрямо четири гъбни патогена – *F. culmorum* (11.8%), *F. graminearum* (22.8%), *F. oxysporum* (29.5%), *F. equiseti* (9.6%), но проявява известен стимулиращ ефект (6.9%) спрямо *F. sporotrichiella*. Сред тестираните кандидат-биоагенти *R. radiobacter* проявява относително слаба антагонистична активност по отношение на отделни гъби от род *Fusarium*.

От представените резултати става ясно, че проблемът с опазване на житните култури от почвенопреносими гъбни и гъбоподобни патогени продължава да е актуален. Налице е необходимост от разработване на ефективни, интегрирани стратегии за борба срещу проявите на некрози и гниене по житните култури със слята повърхност. Резултатите от настоящия дисертационен труд ще послужат за основа на по-нататъшни изследвания за постигане на устойчив контрол над вредата, за повишаване на добивите и качеството на зърното.

SOILBORNE FUNGAL PATHOGENS OF SMALL GRAIN CEREAL CROPS IN BULGARIA: SPECIES COMPOSITION AND DISTRIBUTION, METHODS AND MEANS OF CONTROL

Ivo Todorov Yanashkov

An author's abstract to the

disertation for conferring the

scientific degree

"Phylosophy doctor"

SUMMARY

The disertation work summarizes the results of the author's studies of period 2014-2017.

Small grain cereal crops including wheat, barley, rye, oats, triticale, einkorn etc. are subject to attacks of various soil inhabiting plant pathogenic fungi and fungus-like organisms. All growth stages of cereal crops are susceptible to infections. Attacks lead to pre-emergence decay of seeds, post-emergence damping-off of cereal seedlings, root and lower stem rot in later growth stages of the infected cereals. In individual cases, infection proceeds without obvious symptoms until favourable conditions arise or disease remains latent to the end of growing season and harvesting. Results of the present study show that fungi of genus *Fusarium* are the most frequent soilborne pathogens isolated from cereal crops in the country. Predominating species include *F. oxysporum*, *F. graminearum* and *F. culmorum*, constituting respectively 32%, 22% and 12% of the total number of pathogenic isolates obtained from the roots and lower stems of cereal plants. Other *Fusarium* species, such as *F. sporotrichiella* and *F. equiseti*, occur sporadically in a few fields grown with cereals. Other soil inhabiting pathogens, associated with root rot and stem base necrotic lesions on cereal crops are *Drechslera sorokiniana* and *Rhizoctonia solani*, constituting respectively 11% and 8% of the total number of isolated fungi. Fungus-like isolates of genus *Pythium*, *P. ultimum* in particular, and some currently unidentified *Pythium* spp., represent 10% of isolated fungi. The representatives of this genus are among the most prevalent pathogens, attacking root system of cereal plants, cultivated in waterlogged and cool soils. These species can infect cereal plants either individually or in combinations of two and more pathogens. Mixed infections with *Fusarium* spp., *Pythium* spp. and *Rhizoctonia solani* occur in some of the surveyed cereal fields in the country. Economic losses caused by soilborne diseases of cereal crops in various grain-producing areas vary over the years and depend on the host species, soil, climatic, and agronomical conditions of cultivation.

The disertation work evaluated the effect of new and existing on the market fungicide formulations on mycelial growth of three major pathogens – *Fusarium culmorum*, *Drechslera sorokiniana* and *Pythium ultimum*, causing root and lower stem rot of wheat. Out of the fungicides tested *in vitro*, BAS 591 01 F (prochloraz 60 g/L + triticonazole 20 g/L), BAS 9242 4 F (thiram 200 g/L + carboxin 200 g/L), Vitavax 2000 (thiram 200 g/L + carboxin 200 g/L) and Rankona I-mix showed 100% inhibition of the mycelial growth and proved to be fungicidal on the three pathogenic fungi at 37.5, 75, 10 and 25 ml per liter of

agar, respectively. BAS 700 05 F (fluoxapyroxide 333 g/L) and BAS 595 01 F (prochloraz 60 g/L + triticonazole 20 g/L) exhibited fungicidal properties against *D. sorokiniana* and completely inhibited the mycelial growth of *F. culmorum* and *P. ultimum* at 18.75 and 37.5 ml per liter of agar. The products that showed fungicidal action against the three pathogenic species were evaluated for their effectiveness in controlling damping-off of wheat (cultivar Madara) seedlings incited by each pathogenic species. Growth chamber pot experiments were conducted with treated and untreated seeds artificially inoculated with individual pathogen. Vitavax 2000 applied at the recommended dose of 200 ml per 100 kg of seeds proved to be the most effective in controlling damping-off in wheat seedlings caused by *F. culmorum* – 75.8% reduction of disease intensity, followed by Rankona I-mix at rate of 100 ml per 100 kg and BAS 9242 4 F at 300 ml per 100 kg with 69.4% and 63.3% levels of control, respectively. BAS 9242 4 F provided full control (96.1%) of the damping-off in wheat plants caused by *D. sorokiniana*. Significant but lesser disease reduction was achieved after treating the artificially infested seeds with Rankona I-mix and Vitavax 2000 – 77.3% and 67.8%, respectively. All the three fungicides showed high levels of efficiency – between 92.2% и 81.9%, against damping-off caused by *P. ultimum*.

The disertation work investigated the effect of short-term grass fallow on general disease suppressiveness of two soil types – Luvic Vertisol and Eutric Fluvisols, against Fusarium root and crown rot of wheat. For this purpose, average soil samples were collected from agricultural fields, either cultivated uninterruptedly for over the last 25 years or uncultivated for four and seven years, respectively for both soil types and divided into portions corresponding to the number of treatments. The individual soil portions were either left un inoculated or were separately inoculated with pure cultures of three pathogenic fungi that cause the disease – *Fusarium culmorum, F. graminearum* or *F. oxysporum*, developed on autoclaved (30 min at 121 °C) barley grains. The level of disease suppression of each soil was estimated on the basis of root and crown rot disease index on wheat plants, cultivar Lasca 5 in greenhouse pot experiments. High disease incidence and severity were recorded in both pathogen-inoculated luvic Luvic Vertisol and Eutric Fluvisols. Slight reduction – between 9% and 25%, in disease intensity was observed in soil samples collected from currently uncultivated areas as compared to those collected from cultivated lands. Although statistically proven, these levels of disease suppression in both soil types under grass fallow were not to be considered practically significant. In additional experiments conducted with the most aggressive species among the three pathogens, *F. culmorum*, significantly more severe root and crown rot was recorded in thermally sterilized (240 °C for 2 h) soil portions in comparison to the natural, unsterilized soils. These results clearly demonstrate the biological nature of disease suppression towards Fusarium root and crown rot of wheat in Luvic Vertisol and Eutric Fluvisols, but as well as that short-term grass fallow does not increase the natural soil suppression against the disease to useful levels from practical point of view. It was concluded that future application of natural grass fallow as a method to control soil borne diseases of agricultural crops should be preceded by assessment of the potential impact on each individual pathosystem.

The disertation work demonstrates the possibility to increase disease suppressiveness of Eutric Fluvisols towards Rhizoctonia root rot of wheat caused by *Rhizoctonia solani* AG 4 using well composted sheep manure. Experiments were conducted with dry-sterilized (140 °C for 6 h) and unsterilized, natural soil in which the organic amendment was preliminary incorporated at a rate of 0, 20, 60, or 100 ml L^{-1} and then incubated for 90 days. The experimental units used for testing of soils for disease suppressiveness consisted of rectangular plastic planter trays (26 x 6 x 8 cm) with saucers and drain holes allowing manual watering from the bottom of the tray, 7 cm height of the soil column, two-row planting of wheat, cultivar Laska 5 (2 rows x 12 plants, 2 x 3 cm spacing between plants and rows). As a focal source of inoculum, 20 autoclaved (121 °C for 30 min) barley grains overgrown with the pathogen were

introduced into the soil at the beginning of the rows after emerging of plants. The incorporation of 60 or 100 ml L^{-1} sheep manure into soils (corresponding to fertilization doses of 150 and 250 m^3, respectively per ha of cultivated land with 25 cm deep soil plough layer) gave a significant ($P \leq 0.001$) reduction in spread of Rhizoctonia root rot from the point of inoculum source within the twin rows of wheat stands along with increased number of disease-free plants until the 35^{th} day after inoculation. Levels of disease control achieved with these amounts of the amendment, calculated as area under the disease response curves, were 37.5% and 46.8%, and 31.0% and 55.4%, as compared to untreated controls with sterilized and unsterilized soil, respectively. In the light of the study, it was concluded that well composted sheep manure can be successfully applied for control of Rhizoctonia root rot of wheat, either individually or as an essential component of an integrated disease control strategy.

In the disertation work *in vitro* laboratory experiments were conducted to evaluate potential antagonistic activity of single rhizosphere isolates belonging to five bacterial species, namely *Pesudomonas marginalis, Rhizobium radiobacter, Bacillus casei, B. subtilis* and *B. pumilus*, against seven major cereal-crops soilborne pathogens. The isolates of *B. subtilis* and *P. marginalis* showed broad antagonistic activity inhibiting mycelial growth of six different plant pathogens, as follows: *Fusarium culmorum* – by 22.6% and 16.7%, *Fusarium graminearum* – by 33.3% and 24.3%, *Fusarium oxysporum* – by 30.7% and 29.0%, *Fusarium sporotrichiella* – by 34.8% and 36.8%, and *Fusarium equiseti* – by 35.4% and 32.7%, respectively. The isolates of *B. subtilis* and *P. marginalis* showed antagonistic activity to *Drechslera sorokiniana* and *Pythium ultiumum*, respectively reducing mycelial growth of both pathogens by 41.6%. The *B. pumilus* isolate antagonized the same pathogen species as *B. subtilis* but generally to a lower extent. *B. casei* demonstrates antagonistic activity against four fungal pathogens including *F. culmorum, F. graminearum, F. oxysporum* and *F. equiseti*, revealing 11.8%, 22.8%, 29.5% and 9.6% inhibition of mycelial growth, respecyively but shows some stimulating effect (6.9%) to *F. sporotrichiella*. Among the tested candidate bioagents *R. radiobacter* exhibited no or weak antagonistic activity against the pathogens.

СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ В ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Представена е актуална информация за видовия състав и разпространението на почвените патогенни гъби по житни култури със слята повърхност в страната. Въз основа на културални и морфологични особености са идентифицирани 9 гъбни и гъбоподобни фитопатогенни вида, отнасящи се към 5 рода: *Fusarium, Drechslera, Rhizoctonia, Alternaria* и *Pythium*. Установено е, че отделните патогени заразяват житните растения, както самостоятено, така и в комплекси от два и повече вида.

2. Констатирано е най-широко разпространение на вида *Fusarium oxysporum*, следван от фитопатогените *F. graminearum, F. culmorum, D. sorokiniana, R. solani, P. ultimum, Pythium* sp.и *A. alternata*. Видовете *F. sporotrichiella* и *F. equiseti* са установени по корените и базите на житни растения в отделни посеви.

3. Видът *Fusarium equiseti* се съобщава за първи път като патоген, причиняващ кореново и базично гниене по пшеница и ръж.

3. Гъбата *Drechslera sorokiniana* е установена по еднозърнест лимец. Културата се съобщава като нов за нашата страна гостоприемник на патогена.

4. Чрез изкуствено заразяване на житни растения е доказан патогенитетът на 94 изолата от 82 (54.3%) от 151 обследвани посева.

5. Описани са симптомите на заболяване, причинявано от отделните патогенни видове, като при това са констатирани, както сходства, така и различия в проявите. Най-често наблюдаваните симптоми са некрози по корените и базите на растенията.

6. Доказана е ефективността на фунгицидите Витавакс 2000, BAS 9242 4 F и Ранкона И-микс, като средства за предсеитбено третиране на семена от пшеница, инфектирани с *Fusarium culmorum*, *Drechslera sorokiniana* и *Pythium ultimum*.

7. Установен е супресивен ефект на почви, тип Чернозем-Смолник и Алувиално-Ливадна (от обработваеми и необработваеми терени) спрямо фузарийно кореново и базично гниене по пшеницата с причинители *F. culmorum, F. graminearum* или *F. oxysporum*. Поддържането на почвите в състояние на краткотраен, затревен прелог не оказва съществено влияние върху нивото на супресивност към заболяването.

8. Нов метод за директна оценка на нивото на почвената супресивност е адаптиран за приложение при ризоктонийно кореново гниене по пшеницата. Чрез метода е доказано, че инкорпорирането на компостиран овчи тор води до значително повишаване на супресивността на почвата към заболяването.

9. В опити *in vitro*, проведени при лабораторни условия е установена висока антагонистична активност на бактерийните, почвени и ризосферни видове *B. subtilitis* и *P. marginalis* спрямо гъбните патогени *F. culmorum, F. graminearum, F. oxysporum, F. sporotrichiella* и *F. equiseti*. Доказана е висока антагонистична активност на *B. subtilitis* още към *D. sorokiniana*, а изолатът на *P. marginalis* към *P. ultimum*.

НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА

1. **Иво Янашков**, Джованна Гиларди и Ценко Въчев, 2016. Почвенопреносими гъбни болести по житните култури със слята повърхност. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 53: 3-21.
2. **Ivo Yanashkov**, Tzenko Vatchev, 2016. First report of root and lower stem rot caused by *Fusarium equiseti*. (Corda) Saccardo on wheat and rye in Bulgaria. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 22: 993-994.
3. **Ivo Yanashkov**, Tzenko Vatchev, 2017. First report of root and lower stem rot caused by *Drechslera sorokiniana* on einkorn in Bulgaria. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 23: 594-595.
4. **Иво Янашков**, Желю Аврамов, Ценко Въчев, 2017. Почвообитаващи гъбни патогени по житни култури със слята повърхност в България: видов състав и разпространение. *Растениевъдни науки*, 54: 10-23.
5. **Иво Янашков**, Светла Манева, Ценко Въчев, 2017. Приложение на фунгицидни средства за борба с основни причинители на кореново и базично гниене по пшеница. *Растениевъдни науки*, 54: 3-14.

6. Ценко Въчев, **Иво Янашков**, 2017. Ефект на естествен тревен прелог върху фузарийното кореново и базично гниене по пшеница. *Растениевъдни науки*, 54: 15-27.
7. Ценко Въчев, **Иво Янашков**, Светла Манева. Приложение на компостиран овчи тор за повишаване на почвената супресивност към ризоктонийно кореново гниене по пшеница. *Почвознание, агрохимия и екология*, 51: 40-52.
8. **Иво Янашков**, Ценко Въчев. Антагонистична активност на ризосферни бактерии по отношение на почвообитаващи гъбни патогени по житни култури със слята повърхност. *Растениевъдни науки (под печат)*.

ПУБЛИКАЦИИ ИЗВЪН ДИСЕРТАЦИЯТА

1. Vatchev, T.D., Bistrichanov, S.M. and **Yanashkov, I.T.**, 2016. First report of root rot caused by *Pythium aphanidermatum* and *Pythium* f-group on hydroponically grown pepper in Bulgaria. *Bulgarian journal of agricultural science*, 22: 794–795.
2. Tsonev, I., Marinova, P., Benova, E., Bozhanova, V., Vatchev, Tz., Atanasova, M. and **Yanashkov, I.**, 2017. Agricultural application of cold microwave atmospheric-pressure plasma torch. Twentieth International Summer School VEIT, 25-29 September 2017, Sozopol, Bulgaria.

УЧАСТИЕ В НАУЧНИ ФОРУМИ

1. **Иво Янашков**, Светла Манева и Ценко Въчев, 2017. Болести по земеделските култури и борбата с тях. (Кореново и базично гниене по житни култури със слята повърхност: причинители и фунгицидни средства за борба.), стр. 96-100 в Георгиев, Б.К., Агроекологичен потенциал на поземлените имоти в землище Ореш и научна база за рационално земеползване, ПублисшСайСет – Еко, 152 с.

УЧАСТИЕ В НАУЧНИ ПРОЕКТИ

1. **Проект ПОЗМ 205 – СА тема:** „Диагностика на причинители на болести в земеделските екосистеми: взаимоотношение растение-гостоприемник – патоген и екологични методи, и средства за борба”

2. **Проект МОН, ФНИ – тема**: „Ефекти и механизми на въздействие на електрически разряди в газове и течности върху модели биологични системи”, Конкурс за финансиране на фундаментални научни изследвания – 2016 г.