

<https://doi.org/10.61308/BDQP9476>

Супресивен ефект на почвата към ризоктонийно кореново гниене, индуциран чрез имитирана монокултура на пшеница

Иво Янашков¹, Ценко Въчев^{1*}, Галина Петкова²

Селскостопанска академия, София - ¹Институт по почвознание, агротехнологии и защита на растенията „Никола Пушкарров”, отдел “Защита на растенията”,

Костинброд, 2230, ул. „Панайот Волов” № 35

Селскостопанска академия - София ²Институт по почвознание, агротехнологии и защита на растенията „Никола Пушкарров”, отдел „Физика, ерозия, почвена биота”,

София, 1331, ул. „Шосе Банкя” № 7,

*E-mail: vatchevtzenko@yahoo.com

Резюме: От литературата е известно, че продължително (5-6 години) монокултурно отглеждане на чувствителен гостоприемник може да доведе до затихване на болестта и индуциране на биологично детерминирана супресивност на почвата при различни патологични системи – растение-патоген. Постигната цел на настоящото изследване е индуциране на супресивен ефект в почвата по отношение на ризоктонийно кореново гниене (*Rhizoctonia solani* AG 4) чрез имитиране на монокултура от обикновена пшеница (*Triticum aestivum* L.). По 24 висококачествени семена от пшеница (сорт Екзотик) бяха посявани във пластмасови вегетационни съдове, всеки с по 1.1 L Алувиално-Ливадна (песъкливо-глинеста) почва. Получените растения бяха отглеждани по варианти за 0-4 последователни, съкратени култивационни цикъла, всеки с продължителност от три месеца. За отчитане на нивото на супресивност на почвата от всеки вариант беше използван биологичен тест, при който експерименталните единици представляваха правоъгълни, пластмасови съдове (26 x 6 x 8 cm), с подложка и отвори за ръчно подаване на поливната вода откъм основата на съда, 7 cm височина на колоната от изследваната почва и двуредов посев от пшеница, сорт Екзотик (2 реда x 12 растения, 2 x 3 cm отстояние между растенията). Проследявано беше разпространението на болестта от фокален (точков) източник на инокулум на патогена – 20 инокулумни зърна от чиста култура, развита върху автоклавиран (30 min на 121 °C) ечемик, инкорпорирани в почвата в началото на двата реда след поникване на растенията. Непосредствено след приключване на биологичния тест за супресивност, числеността на основни групи почвени микроорганизми в ризосферната почва от всеки вариант беше определяна по метода на десетичните разреждания и култивиране върху агаризирани хранителни среди. Отделно бактерии от род *Pseudomonas* бяха изолирани от ризосферната почва върху среда на King. Антагонистичната активност на по 10 изолата *Pseudomonas* spp. от всеки вариант беше изпитвана спрямо *R. solani* AG 4 *in vitro* по метода на двойните култури. Имитираната при контролирани условия монокултура от пшеница доведе до значително ($P<0.05$) ограничаване на разпространението на ризоктонийното кореново гниене от източника на инфекция. При това статистически значими разлики ($P<0.05$) бяха установени и между отделните варианти с предварително култивиране на пшеница: с увеличаване на броя на култивационните цикли от един до четири, значително намаляваше разпространението на болестта – съответно с 19.5%, 31.0%, 40.5% и 54.8% спрямо контролата. Същевременно не беше отчетено съществено изменение в популационната плътност на проследяваните групи микроорганизми в ризосферата на опитните растения, в т.ч. амонифициращи и спорообразуващи бактерии, микроскопични гъби, актиномицети и бактерии, използващи минерален азот. С нарастване на почвената супресивност от първия до петия вегетационен цикъл на културата по варианти бе налице значително нарастване на средната антагонистична активност на изолираните бактерии от род *Pseudomonas* спрямо *R. solani* AG 4. Аргументирана бе тезата, че трошливото вретено на зрелия клас при дивите форми е обуславяло продължителна естествена монокултура, в която са виреели и еволюирали хлебната пшеница и нейните предшественици през предисторическата епоха. Приемаме това за предпоставка, която заедно с липсата

на гени за устойчивост към некротрофни патогени, е довела до възникване на еволюционно закрепен защитен механизъм, базиран на мутуалистични взаимоотношения между растението и естествено обитаващи ризосферата бактерии, проявяващи висока антагонистична (антибиотична) активност спрямо почвообитаващи фитопатогени. Проявление на този механизъм е нарастващият супресивен отговор на почвата и затихването на болестта по време и след продължителна монокултура. Получените резултати са дискутирани в светлината на микробиалната еко-еволюционна динамика в ризосферата на растенията. Прогресивно нарастващата антагонистична активност към патогена сред представители на *Pseudomonas* spp. е разгледано като пример за „бърза микробиална еволюция“, осъществявана чрез вероятен хоризонтален трансфер на гени в рамките на един или повече последователни култивационни цикли на културата.

Ключови думи: агротехнически метод за борба; монокултура; ризоктонийно кореново гниене; пшеница; антагонистична активност; бърза микробиална еволюция

Disease suppressive effect in soil against Rhizoctonia root rot induced by mimicking wheat monoculture

Ivo Yanashkov¹, Tzenko Vatchev^{1*}, Galina Petkova²

Agricultural Academy, Sofia, ¹Institute of Soil Science, Agro-Technology and Plant Protection “Nikola Pushkarov”, Plant Protection Department, 2230 Kostinbrod, 35 Panayot Volov St., Bulgaria

²Institute of Soil Science, Agro-Technology and Plant Protection “Nikola Pushkarov”, Department of Physics, Erosion, Soil Biota, 1331 Sofia, 7 Shosse Bankya St., Bulgaria

*E-mail: vatchevtzenko@yahoo.com

Citation: Yanashkov, I., Vatchev, Tz., & Petkova, G. (2024). Disease suppressive effect in soil against Rhizoctonia root rot induced by mimicking wheat monoculture. *Bulgarian Journal of Crop Science*, 61(1), 93-107 (Bg).

Abstract: Disease decline and induction of soil suppressiveness by continuous (5-6 years) monoculture with susceptible plant-host have been reported for various crop-pathogen systems. The present study achieves the goal of inducing suppressive effect in soil towards Rhizoctonia root rot (*Rhizoctonia solani* AG 4) through monoculture of winter wheat (*Triticum aestivum* L.). Twenty four high-quality wheat (c. Exotic) seeds were planted in plastic containers, each containing 1.1 L Alluvial-Meadow (sandy-clay) soil (Eutric Fluvisols, according to FAO classification). According to the treatment applied, the resulting plants were grown for 0-4 successive short cropping cycles, each lasting three months. Disease suppressiveness was measured in a bioassay in which the experimental units were rectangular, plastic containers (26 x 6 x 8 cm), with drainage holes in the bottom and detachable trays allowing for manual irrigation from the bottom of the container, 7 cm height of the column of tested soil in each container and a two-row crop of wheat (c. Exotic, 2 rows x 12 plants, 2 x 3 cm plant spacing). The spread of the disease was measured from a focus (point) source of inoculum of the pathogen – 20 inoculum grains from a pure culture developed on autoclaved (30 min at 121 °C) barley, introduced into the soil at the beginning of both rows after emergence of the plants. Immediately after termination of the soil suppressiveness test, the abundance of the major groups of soil microorganisms were determined in rhizosphere soil in each treatment by using the method of decimal dilutions and subsequent culturing on agar media. Separately, bacteria of the genus *Pseudomonas* were isolated from the rhizosphere soil on King’s medium. The antagonistic activity of 10 *Pseudomonas* spp. isolates from each treatment was tested against *R. solani* AG 4 *in vitro* by the double culture method. The monoculture of wheat imitated under controlled conditions resulted in a significant ($P<0.05$) reduction of the spread of Rhizoctonia root rot from the source of infection. Furthermore, statistically significant differences ($P<0.05$) were also found between the individual treatments with pre-cultivation of wheat: with the increase in the number of cultivation cycles from one to four, there was a significant reduction in disease spread – by 19.5%, 31.0%, 40.5% and 54.8%, respectively, as compared to the untreated control. Simultaneously, no

substantial alterations were observed in the population densities of the monitored groups of microorganisms in the rhizosphere of the experimental plants, including ammonifying and spore-forming bacteria, microscopic fungi, Actinomycetes and bacteria, utilizing mineral N. With the increase in soil suppressiveness from the first to the fifth growing cycle of the crop, a significant increase in the average antagonistic activity of the isolated *Pseudomonas* spp. against *R. solani* AG 4 was observed. The thesis is argued that shattering rachis of the ripe ear in wild forms conditioned a continuous “natural” monoculture in which bread wheat and its predecessors grew and evolve during the prehistoric era. We speculate that this condition, along with the lack of genes for resistance to necrotrophic pathogens, have given rise to evolutionary stable defence mechanism and the latter based on mutualistic relationships between the host-plant and bacteria that naturally inhabit rhizosphere and exhibiting high antagonistic (antibiotic) activity against soil-borne plant pathogens. A manifestation of this mechanism is the increasing suppressive response of the soil and the disease decline during or after continuous wheat monoculture. The results obtained in this study are discussed in the light of the microbial eco-evolutionary dynamics in the plant rhizosphere. The progressively increasing pathogen-antagonistic activity of *Pseudomonas* spp. isolates is discussed as an example of “rapid microbial evolution”, accomplished by possible horizontal gene transfer within one or more successive cultivation cycles of the wheat crop.

Keywords: cultural control; monoculture; rhizoctonia root rot; wheat; antagonistic activity; rapid microbial evolution

ВЪВЕДЕНИЕ

Ризоктонийното кореново гниене с причинител *Rhizoctonia solani* Kühn (телеоморф *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk) е сред почвенопреносимите заболявания с най-голямо стопанско значение по пшеница и други житни култури със слята повърхност в зоните с умерен климат (Clarkson & Cook, 1983; Demirci, 1998; Cook, 2012; Yanashkov et al., 2016). Отглеждането на житните култури върху кисели и песъкливи почви при ниски пролетни температури е основна предпоставка за развитие на ризоктонийно кореново гниене (Weise, 1987). Заболяването се проявява във всички фази от развитието на пшеницата, под формата на ясно очертани, неравномерно разпръснати в посева участъци с видимо болни, загиващи или загинали растения (Weise, 1987; MacNish & Neate, 1996).

Широкият набор от растения-гостоприемници на причинителя не позволява провеждане на ефективен контрол над болестта чрез прилагане на екстензивни сеитбообращения (Roger, 1995). Най-често борбата със заболяването се осъществява чрез третиране на семената с фунгициди или пръскане по време на вегетацията след поява на болестта. Сред разреше-

ните за употреба или установени като ефективни активни вещества са тебуконазол, флуотриафол, ципроконазол, диниконазол (Cotterill, 1991), ипродион, флудиоксонил (Hamada et al., 2011), седаксан (Zeun et al., 2013), ипконазол, N-метил-2-пирилодон (Almasudy et al., 2015), дифеноконазол (Barnett et al., 2019) и др. Химичният метод обаче предлага често недостатъчна ефективност за опазване на растенията предвид ограничения период на действие на приложения предсеитбено продукт или слабото предвижване на активното вещество след пръскане по време на вегетацията от листната маса към мястото на инфекция – корените и основата на стъблата на растенията.

Алтернативна и устойчива, биологично базирана стратегия за контрол над почвенопреносимите заболявания е превръщането на почвите от кондусивни, благоприятни за развитие на болестта, в супресивни (Hall, 1996). Успешни агрономически практики за повишаване на естествената почвена супресивност към ризоктонийното кореново гниене включват инкорпориране в почвата на компостиран животински тор (Smiley et al., 1996; Sneh et al., 1996; Vatchev et al., 2017; Yanlong et al., 2020), компостирани биоорганични материали (Pane et al., 2011; Al-Sharmani et al.,

2019), зелена растителна маса – зелено торе-не (Parmeter et al., 1970; Handiseni et al., 2013; Matin & Faruq, 2013) или пшеничена слама след стърнище (Vatchev & Yanashkov, 2023). Проблемът за борбата с болестта по житните култури обаче остава все още неразрешен в световен мащаб. Устойчивото решение предполага разработване и въвеждане в практиката предимно на биологични подходи за контрол, базирани на подходящо манипулиране на почвения микробиом, насочено към индуциране на високо супресивна среда в почвата и ризосферата на растенията.

В научната литература са отбелязани случаи на индуциране на почвена супресивност към болести, причинявани от фитопатогенни гъби след продължително (5-6 години) монокултурно отглеждане на чувствителен гостоприемник в една и съща почва или на една и съща площ (Baker & Cook, 1974; Henis et al., 1978, 1979; Liu & Baker, 1980; Lucas et al., 1993). Произтичащото от това явление е познато като „монокултурно затихване” на болестта (Gerlagh, 1968; Henis et al., 1979; Chet, 1987).

След отглеждане на пшеница на едно и също място за период от няколко години е констатирано монокултурно затихване по отношение на черно кореново гниене (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* Walker, Gerlagh, 1968; Homma et al., 1979; Keel et al., 1992; Cook et al., 1995) и гниене в основата на стъблото и паразитно полягане (*Tapesia yallundae* Wallwork & Spooner syn. *Pseudocercospora herpotrichoides* (Fron) Deighton, Colbach & Huet, 1995). За трайно затихване на проявите на кореново гниене по пшеница с причинител анастомозна група 8 (AG 8) на *R. solani* при полеви условия след 5 до 7 години на монокултура съобщават MacNish (1988), Lucas et al. (1993), Roget (1995), Wiseman et al. (1996).

Затихването на заболяването след продължителна монокултура следва общ модел при всички патологични системи (гостоприемник-патоген-условия на култивиране), за които това явление е установено. В рамките на няколко последователни години на непре-

късната монокултура, заболяването нараства като честота на срещане (разпространение) в съответната площ и степен на нападение по отглежданите растения. След достигане на някакъв максимум в определена стопанска година, размерът на болестта рязко спада през следващите години на монокултурно отглеждане и обикновено остава пренебрежимо нисък дори след прекратяване на монокултурата (Baker & Cook, 1974; Shipton, 1977; Colbach & Huet, 1995). Като резултат добивите се възстановяват и остават стабилни и след въвеждане на сеитбооборот с алтернативни култури (Jensen, 1975; Cook, 2014). И, докато по редица известни причини, монокултурата често е обявявана почти за табу особено при отглежданите едногодишни култури, то при редица многогодишни видове – предимно дървета и храсти – монокултурното затихване на заболявания, свързани с почвата изглежда широко разпространен и закономерен процес (Cook, 2007).

Счита се, че монокултурното затихване при пшеница и ечемик носи микробиален характер и вероятно следва естествените компенсаторни механизми в природата (Hornby, 1998; Weller et al., 2002; Kwak & Weller, 2013). Обикновено се свързва с нарастване на популациите на видове микроорганизми – специфични антагонисти, в т. ч. бактерии от род *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Bacillus* и др. (Rawat et al., 2011; Pérez-Montaño et al., 2014), естествено обитаващи почвата и ризосферата на житните култури. Установени са редица представители на тези родове, които чрез свои екстрацелуларни метаболити, главно антибиотични вещества (Raaijmakers et al., 1997; Weller, 2007; Sanguin et al., 2009), ограничават значително развитието на почвените фитопатогени и/или проявите на заболяване по корените и базите на растенията (Maheshwari, 2011; Keen & Montforts, 2012; Mendes et al., 2013). До сега обаче не е констатиран случай на монокултурно затихване на заболяване, свързано с кореново гниене по пшеница или друга житна култура с причинител анастомозна група 4 (AG 4) на *Rhizoctonia solani*, ос-

новно свързана с Ризоктониозата по житните култури в България (Yanashkov et al., 2017).

Целта на настоящото изследване бе да се проследи възможността за индуциране на супресивен ефект в почвата по отношение на ризоктонийно кореново гниене с причинител *R. solani* AG 4 чрез имитиране на монокултура – неколкократно, последователно отглеждане на обикновена пшеница (*Triticum aestivum* L.) при контролирани условия.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Почва и индуциране на супресивен ефект чрез имитиране на монокултурно отглеждане на пшеница.

В опитите беше използвана Алувиално-Ливаден тип почва от района на отдел „Защита на растенията” на ИПАЗР „Никола Пушкаров” край гр. Костинброд, песъкливо-глинеста по механичен състав (30.0% пясък, 17.5% прах, 52.0% глина, рН (KCl) 6.56 и 4.03% хумус). От избран необработваем терен бяха събирани индивидуални почвени проби – монолити, на дълбочина до 20 cm с петметрово отстояние между точките на пробовземане. Събраните индивидуални проби бяха смесвани и напълно хомогенизирани чрез размесване, след което почвата беше пресявана през сито с размер на отворите 3 x 3 cm.

За индуциране на супресивност в почвата чрез имитиране на продължително монокултурно отглеждане на пшеница беше прилаган експериментален модел, заимстван от предходни, аналогични изследвания с последователно отглеждане на репички (Henis et al., 1978, 1979), репички, краставици, пшеница, захарно цвекло или люцерна (Liu and Baker, 1980), и пшеница (*R. solani* AG 8) (Lucas et al., 1993). По 1.1 L от изследваната почва беше насипвана в правоъгълни, пластмасови съдове с размери 26 x 6 x 8 cm. Във всеки съд бяха посявани по двадесет и четири висококачествени семена от пшеница (сорт Екзотик) в два реда с по 12 семена във всеки ред и отстояние 2 x 3 cm едно от друго. Всички експериментални

единици бяха разполагани върху лабораторни маси в четири напълно рандомизирани блока.

Постановката на опита включваше последователно отглеждане на пшеничени растения по описания по-горе начин в съкратени култивационни периоди/цикли от по три месеца всеки. Растенията бяха отглеждани в лабораторни условия при температура между 17 и 23 °C и естествена дневна светлина. В края на всеки тримесечен култивационен период, отглежданите растения бяха изваждани от почвата и отстранявани. В зависимост от варианта на третиране на тяхно място бяха посявани нови семена от пшеница. Така в продължение на една календарна година бяха подготвяни четири варианта на третиране на опитната почва с последователно култивиране на пшеница и включена нетретирана контрола: съответно, културата беше отглеждана последователно един, два, три и четири пъти за вариантите с третиране или нито веднъж за нетретираната контрола.

Биологичен тест за супресивност.

В настоящото изследване за установяване на нивото на супресивност спрямо ризоктонийно кореново гниене на нетретирана и третирана по описания начин почви беше прилаган метод, който 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). Методът е оптимизирана версия на биологичен тест, използван в предходни наши изследвания (Vatchev & Dijst, 2010; Vatchev et al., 2017; Vatchev & Yanashkov, 2023).

По варианти, почвата от четирите повторения беше събирана, размесвана механично до пълно хомогенизиране и отново насипвана в същите съдове (по 1.1 L почва във всеки съд). По аналогичен на гореописания начин, във всяка опитна единица (съд) бяха засявани по два реда от по 12 (24 във всеки съд) висококачествени семена пшеница, сорт Екзотик 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 °С. Инокулум на *R. solani* AG 4, (ИПАЗР), получен от корени на пшеница беше развиван предварително в чисти култури в Петриеви блюда върху автоклавирани (30 min на 121 °С) ечемичени зърна в продължение на 14 дни при 26 °С. 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 отрицателен воден потенциал, еквивалентен на около $-6.5 \text{ cmH}_2\text{O}$ воден стълб (h). 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.

Опитите бяха отчитани на всеки седем дни в продължение на 35 дни след инокулиране. Състояние на всяко пшеничено растение беше оценявано визуално като „здрavo“, „болно“, „загинало“ или „липсващо“. Резултатите бяха нанасяни върху схематични карти, отразяващи точното местоположение на всяко опитно растение. 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 на болестта служеше за основен параметър, характеризиращ нивото на супресивност на почвата по отношение на заболяването във всяко повторение и вариант.

Численост и структура на ризосферната микрофлора.

Непосредствено след приключване на биологичния тест за супресивност, ризосферна почва от всеки вариант беше събирана в Петриеви блюда и подлагана на микробиологични анализи. Определяна бе числеността на основни групи почвени микроорганизми по метода на десетичните разреждания и култивиране върху агаризирани хранителни среди (Grudeva et al., 2007). Броят на амонифициращите бактерии бе определян на месопептонен агар (МПА) след тридневна инкубация; на споровите бактерии – на МПА след пастъризация на почвените суспензии при 80 °С за 10 min и тридневна инкубация, на микроскопичните гъби – на среда на Чапек след петдневна инкубация, на актиномицетите и бактериите, използващи минерален азот – на скорбялно-амонячен агар след седемдневна инкубация. Данните са представени като брой колонии-образуващи единици, съдържащи се в 1 g суха почва (КОЕ g^{-1}).

Антагонистична активност на индивидуални почвени бактерии.

Допълнително бяха направени посежки по метода на десетичните разреждания върху селективната за род *Pseudomonas* среда на King, предвид тяхното широко разпространение и биологична активност като продуценти на вещества, потискащи развитието на редица почвени фитопатогени. По 10 изолата от всеки вариант бяха изпитани за инхибиращ ефект спрямо *R. solani* AG 4 в лабораторни условия. Използван беше модифициран от нас *in vitro* метод, описан от Nameeda et al. (2006). Чисти култури на изолираните бактерии бяха култивирани върху картофено-декстрозен агар (КДА) в термостат за 96 часа при 26 °С. Втечен до 42 °С КДА беше разливан в 90 mm в диаметър стерилни Петриеви блюда (x 20 ml агарова среда във всяко блюдо) и оставян на стайна температура в продължение на 24 часа. Върху хранителната среда в права линия, диаметрално на всяко блюдо беше нанасяна водна суспензия от изпитван щам с помощта на

стерилно Йозе. Инокулираните Петриеви блюда бяха инкубирани в продължение на 72 часа на тъмно при 26 °С. По едно агарово блокче (6 mm в диаметър), изрязано 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 (бактериален щам х гъбен патоген) беше залаган в четири повторения (Петриеви блюда). За контроли служеха идентично подготвени експериментални единици – гъбни посевки в блюда с разлят КДА, без предварително развита бактериална култура. Инокулираните с патоген блюда бяха инкубирани при 26 °С на тъмно. Диаметърът на формираните гъбни колонии (без размера на агаровите блокчета) беше измерван на трети, пети, седми и десети ден след посевката. 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):

$$GI\% = 100 - (D \times 100 / C), \text{ където:}$$

GI% – Инхибиране на растежа на мицела;

D – Диаметър на гъбната колония (mm) във вариант с предварително развит потенциален антагонист;

C – Диаметър на гъбната колония (mm) в контролата без развита линейна колония на бактерия.

Статистически анализи.

Получените експериментални 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 $P \leq 0.05$ (Gardiner, 1997). Експерименталните данни от отделните повторения на всеки вариант бяха анализирани поотделно за установяване на хомогенност на резултатите, след което резултатите от два последователно проведени опита бяха обединени и представени съвместно.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Биологичен тест за супресивност.

На таблица 1 са представени данни от разпространение на ризоктонийно кореново гниене (*R. solani* AG 4) от единичен източник на инфекция в двуреден посев от пшеничени растения, отглеждани във вегетационни съдове – през първи (в нетретираната контрола) до

Таблица 1. Ефект на имитирано монокултурно отглеждане на пшеница върху разпространението на ризоктонийно кореново гниене в посев от пшеница от точков източник на инфекция

Table 1. Effect of imitated wheat monoculture on spread of rhizoctonia root rot within stands of wheat plants from a single point of inoculation

№	Вариант/Treatment	Разпространение на болестта/Disease spread (cm) ^a	Инхибиране на болестта/Inhibition of disease progress (%) ^c
1	Нетретирана контрола/Untreated control	10.5a ^b	Контрола
2	Еднократно култивиране/One cultivation cycle	8.5b	19.5
3	Двукратно култивиране/Two cultivation cycles	7.25bc	31.0
4	Трикратно култивиране/Three cultivation cycles	6.25c	40.5
5	Четирикратно култивиране/Four cultivation cycles	4.75d	54.8

$$LSD_{0.05} = 1.267.$$

^a Отчетено на 35-тия ден след инокулиране. /Scored on day 35th after inoculation.

^b Стойности в колоната, обозначени с различен буквен символ са статистически различни при $P \leq 0.05$, съгласно метода за разпределение на Duncan. /Means within the column followed by different letter are significantly different according to Duncan's range test.

^c Изчислено по формулата на Abbott (Abbott, 1925). /Calculated according to the Abbott's formula (Abbott, 1925).

пети последователен цикъл на отглеждане на културата в една и съща почва. От резултатите е видно, че предварително имитираната при контролирани условия монокултура води до значително ($P<0.05$) ограничаване на разпространението на болестта в посева във всички варианти – с еднократно до четирикратно последователно култивиране на пшеница. Докато в контролния вариант без предварително отглеждане на пшеница заболяването достигна 10.5 cm разпространение от източника на инокулум, то с увеличаване на броя на предварително отглежданите култури в отделните варианти от една до четири, разпространението на болестта намаляваше значително ($P<0.05$), съответно с 19.5%, 31.0%, 40.5% и 54.8%. Най-значителен инхибиращ ефект върху болестта беше отчетен във варианта с предварително четирикратно отглеждане на пшеница.

Численост и структура на ризосферната микрофлора.

Микробиологични анализи.

От представените на таблица 2 резултати се вижда, че бактериите – амонифициращи и

използващи минерален азот, са доминиращи в структурата на микробиалните съобщества от ризосферната зона на пшеницата. Между отделните варианти числеността на бактериите варира в относително тесни граници. Така например за амонифициращи бактерии са отчетени стойности от 99.14 до 136.93x10⁶ КОЕ g⁻¹ почва. Високата численост на амонифициращите бактерии показва, че протичат активно процеси на разграждане на отделните коренови ексудати, които са основно лесно усвоими въглерод- и азотосъдържащи съединения (захари, органични киселини, аминокиселини, мастни киселини, фенолни съединения и др.). Споровите бактерии, които участват в разграждането на по-трудно разградимите въглеродни източници, са с по-ниска численост - от 1.31 до 1.45x10⁶ КОЕ g⁻¹. По отношение на микроскопичните гъби е установена висока и статистически доказана спрямо контролата численост за вариант 2 (еднократно култивиране) и вариант 3 (двукратно монокултура), която намалява при вариант 4 (трикратно монокултура) и вариант 5 (четирикратно монокултура). Възмож-

Таблица 2. Ефект на монокултурно отглеждане на пшеница върху числеността на основни групи микроорганизми в ризосферата на пшеничени растения

Table 2. Effect of monoculture wheat crop on the number of the major groups of rhizosphere microorganisms

№	Вариант/Treatment	Брой колони и образуващи единици (КОЕ g ⁻¹ ризосферна почва) x10 ⁶ / Number of colony forming units (CFU g ⁻¹ rhizosphere soil) x10 ⁶				
		Амонифициращи бактерии/ Ammonifying bacteria	Спорови бактерии/ Spore-forming bacteria	Бактерии, използващи минерален N/ Bacteria, utilizing mineral N	Микроскопични гъби/ Microscopic fungi	Актиномицети/ Actinomycetes
1	Нетретирана контрола/ Untreated control	121.05ab ^a	1.31a	66.56b	2.63a	8.03a
2	Еднократно култивиране/ One cultivation cycle	99.14a	1.36a	68.30b	9.87b	7.14a
3	Двукратно култивиране/ Two cultivation cycles	123.68ab	1.23a	71.50b	8.83b	11.67c
4	Трикратно култивиране/ Three cultivation cycles	123.11ab	1.45a	49.34a	1.42a	8.36ab
5	Четирикратно култивиране/ Four cultivation cycles	136.93b	1.39a	72.52b	1.42a	9.95bc
LSD _{0.05%} =		28.04	0.24	10.73	1.73	1.86

^a Стойности в колоната, обозначени с различен буквен символ са статистически различни при $P\leq 0.05$, съгласно метода за разпределение на Duncan. /Means within the column followed by different letter are significantly different according to Duncan's range test.

но е тази динамика в числеността на микро-скопичните гъби да се дължи на активното размножаване на патогена при варианти 2 и 3, а при варианти 4 и 5 развитието му да се потиска от микроорганизми, чиято численост и активност нараства с последователното отглеждане на културата. Известно е, че много микроорганизми – бактерии от родовете *Agrobacterium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Bacillus*, *Serratia*, *Azotobacter*, *Pseudomonas* и др. (Narula et al., 2008), както и актиномицети от родовете *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Actinoplanes*, *Rhodococcus* и др. (Ebrahimi-Zarandi et al., 2022) оказват супресивен ефект

спрямо различни почвени фитопатогени. От представените на таблица 2 резултати обаче е видно, че в условията на проведените опити при контролирани условия, след четирикратно отглеждане на пшеница не са настъпили съществени промени в структурата на микробиялните съобщества и общата численост на основните групи почвени микроорганизми от ризосферната зона на опитните растения.

На таблица 3 са представени осреднени резултати, отразяващи антагонистичната активност на по 10 случайно подбрани изолата от род *Pseudomonas*, изолирани от ризосферата на опитните растения в края на биоло-

Таблица 3. Средна антагонистична активност на 10 изолата ризосферни бактерии от род *Pseudomonas*, получени от всеки отделен вариант върху растежа на мицела на *Rhizoctonia solani* (AG 4)
Table 3. Average antagonistic activity of 10 *Pseudomonas* isolates obtained from the rhizosphere of wheat plants in each individual treatment.

№	Вариант/ Treatment	Диаметър на гъбните колонии (mm) и инхибиране на растежа на <i>R. solani</i> (%) спрямо самостоятелна чиста култура на гъбата след различна продължителност на инкубиране (3-10 дни)/ Diameter of the fungal colonies (mm) and inhibition of the growth of <i>R. solani</i> (%) compared to a single pure culture of the fungus after different periods of incubation (3-10 days)							
		3 дни/ 3 days		5 дни/ 5 days		7 дни/ 7 days		10 дни/ 10 days	
		mm	%	mm	%	mm	%	mm	%
1	Чиста култура на <i>R. solani</i> / A pure culture of <i>R. Solani</i>	14.45a ^b	Контрола/ Control	19.4a	Контрола/ Control	26.3a	Контрола/ Control	29.2a	Контрола/ Control
2	Първа култура пшеница ^a / First crop wheat ^a	12.25b	15.2	18.1b	6.7	22.9b	12.9	25.6b	12.3
3	Втора култура пшеница/ Second crop wheat	11.35c	21.5	16.6c	14.4	21.45c	18.4	23.9c	18.2
4	Трета култура пшеница/ Third crop wheat	10.15d	29.8	14.15d	27.1	18.6d	29.3	21.25d	27.2
5	Четвърта култура пшеница/ Fourth crop wheat	9.6d	33.6	11.5e	40.7	17.65d	32.9	19.95e	31.7
6	Пета култура пшеница/ Fifth crop wheat	7.6e	47.4	9.15f	52.8	12.48e	52.5	16.05f	45.0
	F =	115.75	-	154.67	-	171.47	-	235.22	-
	LSD _{0.05} =	0.6137	-	0.8927	-	1.035	-	0.8410	-

^a Вариант №2 съответства на контролния, нетретиран вариант на опита (без предварително отглеждане на пшеничени растения). /Treatment №2 corresponds to the untreated control of the experiment (without preliminary cultivation of wheat plants).

^b Стойности в колоната, обозначени с различен буквен символ са статистически различни при $P \leq 0.05$, съгласно метода за разпределение на Duncan. /Means within the column followed by different letter are significantly different according to Duncan's range test.

гичния тест за супресивност от всеки един от вариантите на проведените опити. Представените осреднени стойности показаха значително ($P < 0.05$) редуциране на размера на гъбните колонии на *R. solani* AG 4 в Петриевите блюда с двойни култури при съвместно култивирани на патогена с предварително развита колония на ризосферен бактериен изолат, в сравнение с размера на колонииите от чисти култури на *R. solani* AG 4, култивирани самостоятелно в Петриеве блюда (в отсъствие на тест-бактерия). За отбелязване е, че всички изследвани бактериенни изолати – потенциални антагонисти, вкл. изолираните от ризосферата на растения в нетретирания контрола, в която пшеничени растения бяха отглеждани за първи път, демонстрираха статистически доказан инхибиращ ефект върху растежа на мицела на гъбата. При това при всички провеждани отчитания с нарастване на броя на последователно отглежданите култури от пшеница (от един до четири култивационни цикъла) в отделните варианти (от № 2 до № 5 на таблица 3) беше отбелязано значително ($P < 0.05$) нарастване на осреднения инхибиращ ефект на изолираните по варианти ризосферните бактерии. Най-съществен инхибиращ ефект върху растежа на патогена демонстрираха ризосферните изолати, получени от последния вариант с най-продължителна монокултура на пшеница – между 45% и 52.8%.

Очаквано, получените резултати от тестовете за антагонистична активност на представители от ризосферния микробиом на опитните растения бяха изцяло в съответствие с резултатите от биологичните тестове за супресивност на почвата по отношение на ризоктонийното кореново гниене по пшеницата. И при двата метода на изследване беше отбелязано от една страна нарастване на нивото на почвената супресивност с увеличаване на броя на последователно отглежданите култури от пшеница в почвата и, паралелно с това – значително нарастване на антагонистичната активност на представители от род *Pseudomonas*, обитаващи ризосферата на

прицелната за изследването култура. Резултатите от настоящото изследване доказват възможността за индуциране на относително висок супресивен ефект спрямо заболяването с причинител *R. solani* AG 4 чрез имитиране на монокултурно отглеждане на пшеница. Установената натрупваща се с удължаване на периода на монокултура антагонистична активност за част от ризосферната микрофлора по отношение на патогена дава логично обяснение и е част от механизма на супресивност на почвата спрямо причиняването от гъбата заболяване.

При сходни условия на култивиране Liu & Baker (1980) след имитиране на продължителна монокултура на пшеница, захарно цвекло или люцерна не установяват повишаване на нивото на супресивност на почвата спрямо същия патоген, AG 4 на *R. solani*. Резултатите от нашето изследване обаче са аналогични на резултати от опити с други патологични системи при идентични условия на многократно, последователно култивиране на растенията. При имитирана непрекъсната монокултура чрез съкратени, последователни цикли на отглеждане на различни култури е постигано индуциране на почвена супресивност към Ризоктониоза по репички – четири до шест цикли на култивиране всеки от които с продължителност седем дни (AG на *R. solani* не е упомената) (Henis et al., 1978), шест до девет седемдневни цикли на монокултурно отглеждане на репички или краставици (*R. solani* AG 4) (Liu & Baker, 1980), три до пет 33- до 39-дневни периоди на монокултура на пшеница спрямо *R. solani* AG 8 (Lucas et al., 1993). В част от тези изследвания, супресивност по отношение на *R. solani*, индуцирана в отговор на монокултурно отглеждане се асоциира с нарастване на популационната плътност в ризосферата на гъби-антагонисти от род *Trichoderma* (Henis et al., 1979; Liu & Baker, 1980).

Добре проучен супресивен отговор спрямо заболявания по пшеница с причинители *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* и *Pseudocercospora herpotrichoides* се инду-

цира след около три- до петгодишно монокултурно отглеждане на чувствителен гостопримник и се губи с последващо, една до двегодишно отглеждане на нечувствителна култура (Weller, 1983; Thomashow & Weller, 1990a; Thomashow & Weller, 1990b; Thomashow et al., 1990; Cook et al., 1995; Colbach & Huet, 1995; Raaijmakers et al., 1999). Явлението е известно в литературата като „монокултурно затихване на болестта”. Констатирано е първоначално в стопански стари почви, използвани продължително за култивиране на пшеница и други житни култури със слята повърхност (Gerlagh, 1968; Weller et al., 2002); а се обяснява с натрупване в почвата и ризосферата на растенията на бактерии от род *Pseudomonas*, антагонисти по отношение на патогенната за растенията, почвена микофлора (Raaijmakers et al., 1997; Raaijmakers & Weller, 1998, 2001; Weller, 2007). Биологичният контрол, осъществяван от тази група бактерии се отдава на способността им да продуцират широкоспектърни антибиотични вещества, предимно 2,4-Диацетилфлороглуцинол (2,4-DAPG), а така също други флороглуциноли, феназини, пиолотиорин, пиролнитрин, циклични липопептиди и др. (Cook et al., 1995; Thomashow & Weller, 1988; Kwak & Weller, 2013). В света са известни не по-малко от 22 генотипа на флуоресцентни *Pseudomonas* spp., обитаващи ризосферата и колонизиращи корените на пшеница, носещи ген *phlD*, отговорен за антибиотичен синтез на 2,4-DAPG (Kwak & Weller, 2013; Müller et al., 2018). Продуцираният от *Pseudomonas* spp. 2,4-DAPG е сред най-добре проучените антибиотици, подтискащи развитието на редица фитопатогени в почвата, в т.ч. на гъби от род *Rhizoctonia* (Velazhahan et al., 1999; Weller et al., 2002; Mazzola, 2010). Наличието на бактерии-продуценти на този и други метаболити, токсични за гъби, обитаващи ризосферата на растенията е най-вероятният механизъм, стоящ зад констатираната в настоящото изследване повишена почвена супресивност към ризоктонийно кореново гниене след монокултурно отглеждане на пшеница. При култивиране на пше-

ница са установени и други ризосферни бактерии, с близка генетична идентичност до *Pseudomonas* spp., които стимулират растежа на корените на растенията (Fischer et al., 2007; Egamberdieva et al., 2008).

Обяснявайки феномена „монокултурно затихване”, Cook & Weller (2004) изказват предположението, че два фактора: липсата на гени за устойчивост към коренови фитопатогени в съчетание с продължителното съществуване на предшествениците на съвременната обикновена (мека, зимна) пшеница във фактическа монокултура са довели до поява на механизъм на естествена биологична борба спрямо черното кореново гниене (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*), осъществявана от ризобактерии, проявяващи висока, генетично обусловена антибиотична активност към патогена. Явно е, че в предисторическата епоха преди откриване на земеделието, хлебната пшеница (*T. aestivum*), нейните предшественици (тетраплоидният *Triticum turgidum* L. и диплоидният *Aegilops tauschii* Coss.), както и други житни треви – различни видове пшеница и ечемик, обект по-късно на окултуряване (одомашняване), виреят в естествена „монокултура”, резултат от наличието на трошливо вретено на класа (Fuller & Allaby, 2009). Класът – при дивите форми – се разпада след узряване на отделни сегменти, което от своя страна предполага многогодишно повтарящ се процес – опадване на семената, самозасяване, поникване и развитие на нови растения на едно и също място. Приемаме, че именно през този продължителен предисторически период е възникнал и е закрепен еволюционно биологичен механизъм за защита на корените на житните растения от широк кръг почвообитаващи патогени, чието крайно проявление е затихването на болестта след продължителна монокултура. Доказано, този защитен механизъм е изграден на базата на мутуалистични, (вероятно, в т.ч. и протокооперативни) взаимоотношения между растението и естествено обитаващи ризосферата микроорганизми, главно бактерии, проявяващи висока антагонистична активност. С

удължаване на периода на монокултура се констатира значително повишаване на популационната плътност на ризобактерии, антагонисти по отношение на коренови фитопатогени, чрез която се реализира нарастващият супресивен отговор на почвената екосистема по отношение на фитопатогените, в т.ч. *R. solani*. Същият механизъм вероятно стои в основата на значително по-слабото общо проявление на отделни заболявания, като черно кореново гниене в стопански стари почви, където с различна продължителност и интензивност са отглеждани житни – монокултурното и в ротационни схеми, включващи нечувствителни полски или други култури (Въчев, лични наблюдения). В такива случаи заболяването, ако въобще бъде открито, остава локализирано, със спорадично проявление или не е документирано досега.

В настоящото изследване, интересен за отбелязване е фактът, че при продължаващата монокултура липсва отбелязаното от други автори (цитирани по-горе) акумулиране на съпътстващи, мутуалистични или симбионтни микроорганизми, естествено обитаващи ризосферата на пшеницата. За разлика от това, и с нарастване на почвената супресивност по варианти (Таблица 1), е налице акумулиране на съществена, обща антагонистична активност (Таблица 3) спрямо патогена, нарастваща значително от първия до петия вегетационен цикъл на културата, отчетено в края на биологичния тест. Същевременно нарастването на супресивния ефект спрямо заболяването в почвата и антагонистичната активност спрямо патогена в ризосферата не кореспондират с повишаване на популационната плътност на която и да е от проследяваните групи почвени микроорганизми (Таблица 2). Така получените от нас резултати са в съответствие с концепцията за еко-еволюционна динамика в ризосферата на растенията (Hairston et al., 2005 Cordovez et al., 2019). Те са пример за „бърза микробиална еволюция“ (англ. rapid microbial evolution) сред ризобактериите от род *Pseudomonas*, а вероятно и сред други сродни по генотип бактерии

от почвения микробиом, резултат от хоризонтален трансфер на гени (Cordovez et al., 2019; Fields & Friman, 2022). Съгласно Fields & Friman (2022) „бързата еволюция“ е факт сред ризосферните микроорганизми и се осъществява в рамките на един или повече последователни цикли на култивиране на растенията. На базата на резултатите от настоящото изследване, сравнени с данни, публикувани от други автори може да предположи, че пшеницата, отглеждана в монокултура създава условия за вътревидов отбор сред мутуалистични ризобактерии, което води до акумулиране на специфични гени, кодиращи антагонистична (антибиотична) активност спрямо *R. solani* и други почвообитаващи фитопатогени, атакуващи корените и основата на стъблата на растенията.

В цитирани по-горе литературни източници, се съобщава за монокултурно затихване, съчетано с предполагаема повишена, биологично базирана супресивност по отношение на ризоктониоза с причинител AG 8 на *R. solani*. В настоящото изследване съобщаваме за индуцирана супресивност при имитирано монокултурно отглеждане на пшеница спрямо идентично заболяване, но с различен причинител – AG 4 на същия вид. Тъй като двете анастомозни групи се отличават по морфологични особености и са генетично изолирани поради невъзможността да анастомозират помежду си, те се разглеждат като различни патогени в рамките на един и същ сборен вид.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящото изследване представя доказателства за повишаване на почвената супресивност в резултат на монокултура по отношение на още една патологична система, включваща пшеница и почвено-преносим патоген – AG 4 на *R. solani*, причинител на ризоктонийно кореново гниене. Независимо от получените резултати и натрупано познание зад механизмите на монокултурното затихване, все още предстои да бъде разработено

на успешна и адекватна стратегия базирана на индуцирана, биологически детерминирана почвена супресивност и/или затихване на болестта след продължително, монокултурно отглеждане на пшеница или други житни култури.

ЛИТЕРАТУРА

- Abbott, W. S.** (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18: 265-267.
- Almasudy, A. M., You, M. P. & Barbetti, M. J.** (2015). Influence of fungicidal seed treatments and soil type on severity of root disease caused by *Rhizoctonia solani* AG-8 on wheat. *Crop Protection*, 75: 40-45.
- Al-Sharmani, H. R., Al-Kalabi, H. H. & Al-Abedy, A. N.** (2019). Efficacy of rice husks compost and *Trichoderma harzianum* on *Rhizoctonia solani* and its effect on seeds germination and seedling health. IOP Conference Series: *Earth and Environmental Science*, 388(1): 1-12.
- Baker, K. F. & Cook, R. J.** (1974). Biological control of plant pathogens. W.H. Freeman and Company, 433 p.
- Barnett, S. J., Ross, A. B. & Franco, C. M. M.** (2019). Field assessment of microbial inoculants to control *Rhizoctonia* root rot on wheat. *Biological Control*, 132: 152-160.
- Chet, I.** (1987). Innovative approaches to plant disease control. John Wiley and Sons, Inc., New York, 372 p.
- Clarkson, J. D. S. & Cook, R. J.** (1983). Effect of sharp eyespot (*Rhizoctonia cerealis*) on yield loss in winter wheat. *Plant Pathology*, 32: 421-428.
- Colbach, N. & Huet, P.** (1995). Modelling the frequency and severity of root and foot diseases in winter wheat monocultures. *European Journal of Agronomy*, 4: 217-227.
- Cotterill, P. J.** (1991). Evaluation of in-furrow fungicide treatments to control *Rhizoctonia* root rot of wheat. *Crop Protection*, 10(6): 73-478.
- Cook, R. J.** (2007). Take-all decline: model system in the science of bio-logical control and clue to the success of intensive cropping. In: Vincent, C., Goettel, M.S. & Lazarovits, G. (Eds.) *Biological control: a global perspective*. Wallingford: CAB International, pp. 399-414.
- Cook, R. J.** (2014). Plant Health Management: Pathogen Suppressive Soils. *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*, 441-455. doi:10.1016/b978-0-444-52512-3.00182-0
- Cook, R., Thomashow, L. S., Weller, D. M., Fujimoto, D., Mazzola, M., Bangera, G. & Kim, D.** (1995). Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. *National Academy of Sciences*, 92: 4197-4201.
- Cook, R. J. & Weller, D. M.** (2004). In defence of crop monoculture. In: *New directions for a diverse planet*. International Crop Science Congress Proceedings, Brisbane, Australia, Crop Science Society. <https://www.ars.usda.gov/research/publications/publication/?seqNo115=175825>
- Cordovez, V., Dini-Andreote, F., Carrión, V.J. & Raaijmakers, J. M.** (2019). Ecology and evolution of plant microbiomes. *Annual Review of Microbiology*, 73: 69-88.
- Demirci, E.** (1998). *Rhizoctonia* species and anastomosis groups isolated from barley and wheat in Erzurum, Turkey. *Plant Pathology*, 47: 10-15.
- Ebrahimi-Zarandi, M., Riseh, R., & Tarkka, M.** (2022). Actinobacteria as effective biocontrol agents plant pathogens, an overview on their role in eliciting plant defense. *Microorganisms*, 10(9): 1739, <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091739>.
- Egamberdieva, D., Kamilova, F., Validov, S., Gafurova, L., Kucharova, Z. & Lugtenberg, B.** (2008). High incidence of plant growth-stimulating bacteria associated with the rhizosphere of wheat grown on salinated soil in Uzbekistan. *Environmental Microbiology*, 10: 1-9.
- Fields, B., & Friman, V.P.** (2022). Microbial eco-evolutionary dynamics in the plant rhizosphere. *Current Opinion in Microbiology*, 68: 102153. doi: 10.1016/j.mib.2022.102153
- Fischer, S. E., Fischer, S. I., Magris, S. & Mori, G. B.** (2007). Isolation and characterization of bacteria from the rhizosphere of wheat. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23, pp. 895-903.
- Fuller, D. Q. & Allaby, R.** (2009). Seed Dispersal and Crop Domestications: Shattering, Germination and Seasonality in Evolution under Cultivation". *Annual Plant Reviews*, 38: 238-295.
- Gardiner, W. P.** (1997). *Statistics for the biosciences: data analysis using minitab software*. Prentice Hall. London, New York, Toronto, Sydney, Tokyo, Singapore, Madrid, Mexico City, Munich, Paris, p. 416.
- Gerlagh, M.** (1968). Introduction of *Ophiobolus graminis* into new polders and its decline. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 74: 1-97.
- Grudeva, V., Moncheva, P., Nedeva, S., Gocheva, B., Antonova-Nedeva, S. & Naumova, S.** (2007). *Handbook of microbiology*. University edition SU "St. Kliment Ohridski", p. 355 (Bg).
- Hameeda, B., Rupela, O. P. & Reddy, G.** (2006). Antagonistic activity of bacteria inhabiting composts against soil-borne plant pathogenic fungi. *Indian Journal of Microbiology*, 46 (4): 389-396.
- Hairston, N. G., Ellner, S. P., Geber, M. A., Yoshida, T. & Fox, J. A.** (2005). Rapid evolution and the con-

- vergence of ecological and evolutionary time. *Ecology Letters*, 8: 1114-1127.
- Hall, R.** (1996). Theory and practice of innovation in managing soilborne plant pathogens. In: Hall, R. (ed.) Principles and practice of managing soilborne plant pathogens (pp. 311-320), ASP Press, The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, 330 p.
- Hamada, M. S., Yin, Y., & Ma, Z.** (2011). Sensitivity to iprodione, difenoconazole and fludioxonil of *Rhizoctonia cerealis* isolates collected from wheat in China. *Crop Protection*, 30(8): 1028-1033.
- Handiseni, M., Brown, J., Zemetra, R., & Mazzola, M.** (2013). Effect of Brassicaceae seed meals with different glucosinolate profiles on *Rhizoctonia* root rot in wheat. *Crop Protection*, 48: 1-5.
- Henis, Y., Ghaffar, A., & Baker, R.** (1978). Integrated control of *Rhizoctonia solani* damping-off of radish: Effect of successive plantings, PCNB, and *Trichoderma harzianum* on pathogen and disease. *Phytopathology*, 68: 900-907.
- Henis, Y., Ghaffar, A., & Baker, R.** (1979). Factors affecting suppressiveness to *Rhizoctonia solani* in soil. *Phytopathology*, 69(11): 1164-1169.
- Homma, Y., Sitton, J. W., Cook, R. J., & Old, K. M.** (1979). Perforation and destruction of pigmented hyphae of *Gaeumannomyces graminis* by vampyrellid amoebae from Pacific Northwest wheat field soils. *Phytopathology*, 69: 1118-1122.
- Hornby, D.** (1998). Take-All of Cereals: A Regional Perspective. CAB International, Wallingford, UK, 384 p.
- Jensen, A.** (1975). Danish experiences with cereals in monoculture. *EPPO-Bulletin*, 5: 181-191.
- Keen, P. L. & Montforts, M. H. M.** (2012). Antimicrobial Resistance in the Environment. John Wiley and Sons, 602 p.
- Keel, C., Schnider, U., Maurhofer, M., Voisard, C., Laville, J., Burger, U., Wirthner, P., Haas, D., & Défago, G.** (1992). Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 - importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. *Molecular Plant-microbe Interactions*, 5: 4-13.
- Kwak, Y. S., & Weller, D. M.** (2013). Take-all of wheat and natural disease suppression: a review. *Plant Pathology Journal*, 29: 125-135.
- Liu, S., & Baker, R.** (1980). Mechanism of biological control in soil suppressive to *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, 70: 404-412.
- Lucas, P., Smiley, W., & Collins, H.P.** (1993). Decline of *Rhizoctonia* root rot on wheat in soils infested with *Rhizoctonia solani* AG-8. *Phytopathology*, 83: 260-263.
- MacNish, G.C.** (1988). Changes in take-all (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*), *Rhizoctonia* root rot (*Rhizoctonia solani*) and soil pH in continuous wheat with annual applications of nitrogenous fertiliser in Western Australia. *Australian Journal Experimental Agriculture*, 28: 333-41.
- Matin, M., & Faruq, A.** (2013). Prevalence of pathogenic fungi in soils of wheat field. *Journal of Experimental Biosciences*, 4(1): 63-68.
- Mazzola, M.** (2010). Management of resident soil microbial community structure and function to suppress soilborne disease development. pp. 200-218, In: M.P. Reynolds (ed.), *Climate Change and Crop Production*. CABI, Wallingford, UK, 292 p.
- Mendes, R., Garbeva P., & Raaijmakers J. M.** (2013). The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 37: 634-663.
- Maheshwari, D. K.** (2011). *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems*. Springer Science and Business Media, 434 p.
- MacNish, G., & Neate, S.** (1996). *Rhizoctonia* bare patch of cereals. *Plant Disease*, 80: 965-971.
- Müller, T., Ruppel, S., Behrendt, U., Lentzsch, P., & Müller, M. E. H.** (2018). Antagonistic Potential of Fluorescent Pseudomonads colonizing wheat heads against mycotoxin producing *Alternaria* and *Fusaria*. *Frontiers in Microbiology*, 9: 2124.
- Parmeter, J. R.** (1970). *Rhizoctonia solani*, Biology and Pathology. American Phytopathological Society. Symposium of *Rhizoctonia solani* held at the Miami meeting of the Society, 255 p.
- Pane, C., Spaccini, R., Piccolo, A., Scala, F., & Bonanomi, G.** (2011). Compost amendments enhance peat suppressiveness to *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia minor*. *Biological Control*, 56: 115-124.
- Pérez-Montaño, F., Alias-Villegas, C., Bellogín, R. A., delCerro, P., Espuny, M. R., Jiménez-Guerrero, I., López-Baena, F. J., Ollero, F. J. & Cubo, T.** (2014). Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. *Microbiological Research*, 169: 325-336.
- Raaijmakers, J. M., & Weller, D. M.** (1998). Natural plant protection by 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* spp. in take-all decline soils. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11: 144-152.
- Raaijmakers, J. M. & Weller, D. M.** (2001). Exploiting genotypic diversity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* spp: Characterization of superior root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain Q8r1-96. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2545-2554.
- Raaijmakers, J. M., Weller, D. M. & Thomashow, L. S.** (1997). Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 881-887.
- Raaijmakers, J. M., Bonsall, R. E. & Weller, D. M.** (1999). Effect of population density of *Pseudomonas*

- fluorescens* on production of 2,4-diacetylphloroglucinol in the rhizosphere of wheat. *Phytopathology*, 89: 470–475.
- Rawat, S., Izhari, A., & Khan, A.** (2011). Bacterial Diversity in Wheat Rhizosphere and their Characterization. *Advances in Applied Science Research*, 2(2): 351-356.
- Roget, D. K.** (1995). Decline in root rot (*Rhizoctonia solani* AG-8) in wheat in a tillage and rotation experiment at Avon, South Australia. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 35(7), 1009. doi:10.1071/ea9951009.
- Sanguin, H., Sarniguet, A., Gazengel, K., Moënnelocoz, Y., & Grundmann, G. L.** (2009). Rhizosphere bacterial communities associated with disease suppressiveness stages of take-all decline in wheat monoculture. *New Phytologist*, 184: 694-707.
- Shipton, P. J.** (1977). Monoculture and soil-borne plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 15: 387-407.
- Smiley, W. R., Collins, P. H., & Rasmussen, P. E.** (1996). Diseases of wheat in long-term agronomic experiments at Pendleton, Oregon. *Plant Disease*, 80: 813-820.
- Sneh, B., Jabaji-Hare, S., Neate, S. M. & Dijst, G.** (1996). *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology. Pathology and Disease Control, 578 p.
- Thomashow, L. S. & Weller, D. M.** (1988). Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Journal of Bacteriology*, 170: 3499–3508.
- Thomashow, L. S., & Weller, D. M.** (1990a). Application of fluorescent pseudomonads to control root diseases of wheat and some mechanisms of disease suppression. In: Hornby, D., (ed.), Biological control of soil-borne plant pathogens, pp. 109-122. CAB International, Wallingford, 779 p.
- Thomashow, L. S., & Weller, D. M.** (1990b). Role of antibiotics and siderophores in biocontrol of take-all disease of wheat. *Plant and Soil*, 129: 93–99.
- Thomashow, L. S., Weller, D. M., Bonsall, R. F. & Pierson III, L. S.** (1990). Production of the antibiotic phenazine-1-carboxylic acid by fluorescent *Pseudomonas* species in the rhizosphere of wheat. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 908–912.
- Vatchev, T., & Dijst, G.** (2010). Induced soil suppressiveness against *Rhizoctonia solani* using mycelial amendments. *Journal of Balkan Ecology*, 13: 391-403.
- Vatchev, T., & Yanashkov, I.** (2023). Incorporation of wheat straw to render soil suppressive to *Rhizoctonia* root rot. Proceedings of the scientific forum with international participation “Ecology and agrotechnologies – fundamental science and practical realization”, 4: 66-79.
- Vatchev, T., Yanashkov, I., & Maneva, S.** (2017). Use of composted sheep manure to increase soil suppressiveness towards *Rhizoctonia* root rot of wheat. *Bulgarian Journal of Soil Science, Agrochemistry and Ecology*, 51: 40-52.
- Velazhahan, R., Samiyappan, R., & Vidhyasekaran, P.** (1999). Relationship between antagonistic activities of *Pseudomonas fluorescens* isolates against *Rhizoctonia solani* and their production of lytic enzymes. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 106(3): 244–250.
- Weise, M. V.** (1987). Compendium of wheat diseases, 2nd ed. St Paul, MN, USA, APS Press, American Phytopathological Society, 112 p.
- Weller, D. M.** (1983). Colonization of wheat roots by a fluorescent pseudomonad suppressive to take-all. *Phytopathology*, 73: 1548–1553.
- Weller, D. M.** (2007). *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogen: looking back over 30 years. *Phytopathology*, 97, pp. 250–256.
- Weller, D. M., Raaijmakers, J. M., McSpadden Gardner, B. B. & Thomashow, L. S.** (2002). Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 40, pp. 309-348.
- Weller, D. M., Raaijmakers, J. M., McSpadden Gardner, B. B., & Thomashow, L.S.** (2002). Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 40, pp. 309–348.
- Wiseman, B. M., Neate, S. M., Keller, K. O., & Smith, S. E.** (1996). Suppression of *Rhizoctonia solani* anastomosis group 8 in Australia and its biological nature. *Soil Biology and Biochemistry*, 28(6): 727–732. doi:10.1016/0038-0717(95)00178-6.
- Yanlong, X., Xiaoyu, L., Cong, C., Gailin, G., Yongping, X., Jian, C., Fuqin, H., Hongli, C., & Lili, W.** (2020). Use of resistant *Rhizoctonia cerealis* strains to control wheat sharp eyespot using organically developed pig manure fertilizer. *Science of The Total Environment*, 726. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138568>.
- Yanashkov, I., Gilardi, G., & Vatchev, T.** (2016). Soil-borne fungal diseases of small grain cereal crops. *Bulgarian Journal of Crop Science*, 53: 3-21.
- Yanashkov, I., Avramov, Z., & Vatchev, T.** (2017). Soilborne fungal pathogens of small grain cereal crops in Bulgaria: species composition and distribution. *Bulgarian Journal of Crop Science*, 54: 10-23.
- Zeun, R., Scalliet, G., & Oostendorp, M.** (2013). Biological activity of sedaxane – a novel broad-spectrum fungicide for seed treatment. *Pest Management Science*, 69(4): 527-34.

Received: July 23 2023; Approved: December 05 2023; Published: February 2024