

## Антагонистична активност на ризосферни бактерии по отношение на почвообитаващи гъбни патогени по житни култури със слята повърхност

Иво Янашков, Ценко Въчев\*

Институт по почвознание, агротехнологии и защита на растенията „Никола Пушкарров”,  
направление „Защита на растенията”, отдел “Фитопатология”, Костинброд 2230, ул. „Панайот  
Волов” № 35

\*E-mail: [vatchevtzenko@yahoo.com](mailto:vatchevtzenko@yahoo.com)

### Резюме

Сред болестите с най-голямо икономическо значение по житните култури със слята повърхност са гниенето на кълновете и пониците, проявите на кореново и базично гниене в по-късни фази от развитие на растенията. Основни причинители на тези заболявания са почвообитаващи, фитопатогенни гъби и гъбоподобни оомицети. Наред с тях в ризосферата на житните растения се развива симбионтна микрофлора, в т. ч. бактерии от род *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Bacillus* и др., които чрез своите екстрацелуларни метаболити могат да окажат антагонистично действие спрямо широк набор от почвени фитопатогени. В настоящото изследване е проследено антагонистичното действие на наши изолати от видовете *Pseudomonas marginalis*, *Rhizobium radiobacter*, *Bacillus casei*, *B. subtilis* и *B. pumilus* върху растежа на мицела на седем основни патогена по житни култури – *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. sporotrichiella*, *F. equiseti*, *Drechslera sorokiniana* и *Pythium ultimum*. Опитите бяха проведени при лабораторни условия *in vitro*. Получените резултати показват, че с най-широка антагонистична активност се отличават изпитваните изолати на видовете *B. subtilis* 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%, *F. equiseti* – с 35.4% и 32.7%, съответно. Изпитваният изолат на *B. subtilis* проявява антагонизъм още към *D. sorokiniana*, а този на *P. marginalis* към *P. ultimum*, потиска растежа 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 по отношение на 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 изпитваните кандидат-биоагенти *R. radiobacter* проявява относително слаба антагонистична активност по отношение на отделни гъби от род *Fusarium*.

**Ключови думи:** житни култури със слята повърхност; почвообитаващи гъбни патогени; ризосферни бактерии; биоагенти; антагонистична активност

## Antagonistic activity of rizosphere bacteria against soil inhabiting fungal pathogens of small grain cereal crops

Ivo Yanashkov, Tzenko Vatchev\*

Institute of Soil Science, Agro-Technology and Plant Protection “Nikola Pushkarov”,  
Plant Protection Division, Department of Plant Pathology,  
35 Panayot Volov Str., 2230 Kostinbrod, Bulgaria

\*E-mail: [vatchevtzenko@yahoo.com](mailto:vatchevtzenko@yahoo.com)

### Abstract

Yanashkov, I. & Vatchev, Tz. (2018). Antagonistic activity of rizosphere bacteria against soil inhabiting fungal pathogens of small grain cereal crops. *Rasteniadvadni nauki*, 55(1), 14-27 (Bg)

Root and lower stem disease complex causing seedling blight before or after emergence of the seedlings, root and lower stem rot in older plants is among the most economically important diseases affecting small grain cereal crops. The causal agents include various soil inhabiting, pathogenic fungi and fungal-like oomycetes. Along with detrimental pathogens, various plant-beneficial symbiotic microorganisms are found in rhizosphere of cereal plants including bacteria of genus *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Bacillus* etc. Through their extracellular metabolic activity these can antagonize wide range of soil inhabiting plant pathogens and thus have potential to be effective biological control agents. In the present study *in vitro* laboratory experiments were conducted to evaluate potential antagonistic activity of single rhizosphere isolates belonging to five bacterial species, namely *Pseudomonas 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 ultimum*, 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, respectively, 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.

**Keywords:** small grain cereal crops; soilborne fungal pathogens; rhizobacteria; bioagents; antagonistic activity

## ВЪВЕДЕНИЕ

Житните култури със слята повърхност, в т.ч. пшеница, ечемик, ръж, овес и др., отглеждани в различни региони по света и у нас, са обект на нападение от редица почвообитаващи фитопатогенни гъби и гъбоподобни оомицетни организми (Atanasov et al., 1932; Mladenov, 1974; Todorova and Karzhin, 1972; Karadjova, 1979; Mladenov and Karadjova, 1982; Singleton et al., 1992; Strausbaugh et al., 2003). Редица гъби от род *Fusarium* са широко разпространени причинители на кореново и базично гниене по житните култури. Инфекции по корените, причинявани от видовете *F. culmorum* (Wm.G.Sm.) Sacc., *F. graminearum* Schwabe, *F. oxysporum* Schlecht. emend. Snyder & Hansen (Wm.G.Sm.) и *Fusarium sporotrichiella* Bilai водят до значителни икономически загуби в страните с умерен климат, включително България (Mueller, 1977; Karadjova, 1979; Dimitrov, 1980; Rennie et al., 1983; Bottalico, 1998; Strausbaugh et al., 2003; Yanashkov et al., 2017). Гъбоподобни представители на род *Pythium*, в т.ч. *P. ultimum* Trow, *P. aristosporum* Vanterpool, *P. volutum* Vanterpool & Truscott, *P. heterothallicum* W.A.

Campb. & F.F. Hendrix, *P. irregulare* Buisman, *P. torulosum* Coker & Patterson и др., са сред най-разпространените патогени, атакуващи кореновата система на житни култури в условията на преовлажнена и студена почва (Plaats-Niterink, 1981; Chamswarng and Cook, 1985; Ingram and Cook, 1999; Paulitz and Adams, 2003). Най-често в условия на по-влажен климат по пшеницата и ечемика се наблюдава кореново и базично гниене, причинявано от вида *Drechslera sorokiniana* (Sacc.) Subram. & B. L. Jain (Oswald, 1950; Mathre, 1987; Weise, 1987; Duveiller et al., 1998; Kumar et al., 2002). С прояви на базично гниене и полягане на посева е свързано нападението от гъбата *Rhizoctonia solani* Kühn и други представители на същия род (Pitt, 1964; Parmeter, 1970; Weise, 1987; Roget, 1995; Yin et al., 2013). Споменатите патогени могат да атакуват растенията самостоятелно или в комплекси от два и повече таксона – видове и родове гъби и гъбоподобни оомицети (Sturz and Bernier, 1987; Kuzdraliński et al., 2014; Lamichhane and Venturi, 2015; Yanashkov et al., 2017).

Наред с почвообитаващите патогени, в ризосферата на житните култури се развива симбионтна микрофлора, предимно бактерии

от род *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Bacillus* и др. (Rawat et al., 2011; Pérez-Montaño et al., 2014), които чрез своите екстрацелуларни метаболити могат да окажат антагонистично въздействие върху редица фитопатогенни гъби и да ограничат проявите на заболяване по корените и базите на растенията (Maheshwari, 2011; Keen and Montforts, 2012; Mendes et al., 2013). Бактерии от род *Pseudomonas* са повсеместно разпространени в ризосферната почва (Weller, 2007). Редица техни представители са проучвани в качеството им на антагонисти по отношение на редица гъбни патогени по житните, в т.ч. *F. oxysporum*, *R. solani*, *Gaeumannomyces graminis* (Sacc.) Arx & D.L. Olivier, *Septoria tritici* Desm., *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) J. Schröt. и *Pyrenophora teres* Drechs. (Walsh et al., 2001; Gao et al., 2012; Khan, 2013).

С повишаването на популационната плътност на ризосферните бактерии-антагонисти от род *Pseudomonas* се свързва индуцирането на високо супресивен ефект на почвата спрямо заболявания като черно кореново гниене с причинител *Gaeumannomyces graminis* по пшеницата и други житни култури. Тази форма на почвена супресивност се формира вследствие на пет-шестгодишно непрекъснато, монокултурно отглеждане на чувствителен гостоприемник, а се губи с последващо една до двегодишно отглеждане на нечувствителна на заболяването култура (Weller, 1983; Thomashow and Weller, 1990; Thomashow and Weller, 1991; Thomashow et al., 1990; Cook et al., 1995; Raaijmakers et al., 1999). Явлението е добре документирано в научната литература и е известно като „монокултурно затихване на болестта”. Широко разпространено е в стопански стари почви, използвани продължително за култивиране на житни култури със слята повърхност (Gerlagh, 1968; Weller et al., 2002). Биологичният механизъм на монокултурното затихване включва натрупване в ризосферната почва и по корените на растенията на симбионтни, флуоресцентни бактерии от род *Pseudomonas*, антагонисти по отношение на патогенната за растенията почвена микофлора (Raaijmakers et al., 1997; 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, фенозини, пиолотиорин, пиrolнитрин, циклични липопептиди и др. (Thomashow and Weller, 1988; Cook et al., 1995; Kwak and Weller, 2013). В света са известни не по-малко от 22 генотипа на флуоресцентни *Pseudomonas* spp., обитаващи ризосферата и колонизиращи корените на пшеницата и ечемика, и носещи ген *phlD*, отговорен за антибиотичния синтез на 2,4-DAPG (Kwak and Weller, 2013). Продуцираният от *Pseudomonas* spp. 2,4-DAPG е сред най-добре проучените антибиотици, потискащи развитието на редица фитопатогени, в т.ч. на гъби от род *Fusarium* (Weller et al., 2002; Mazzola, 2010). Предсеитбеното третиране на семената със суспензия от чиста култура на *P. fluorescens* в магнезиев сулфат хептахидрат ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) води също до повишаване на добива от зърно при ечемика (Mercado-Blanco et al., 2016). Видът *P. marginalis* (Brown) Stevens (syn. *P. fluorescens* (Flügge) Migula) е повсеместно разпространен на петте континента и в Нова Зеландия (Muntañola, 1948; Elliott, 1951; Goto, 1956; Bradbury, 1986). Описан е като ефективен биоагент за контрол над проявите на черно и хелминтоспориозно кореново гниене, съответно с причинители *Gaeumannomyces graminis* и *Drechslera sorokiniana* по пшеницата (Gurusiddaiah et al., 1994; Srivastava et al., 1999).

Други почвени и ризосферни бактерии, като повсеместно разпространения вид *Rhizobium* (*Agrobacterium*) *radiobacter* (Beijerinck and van Delden) Young et al. (Smith and Townsend, 1907; Panday et al., 2011; Moussa and Youssef, 2012), стимулират растежа на кореновата система на пшеница, ечемик, ориз, царевица и соя, чрез отделяне на гиберелинова киселина в почвата (Humphry et al., 2006; Mia and Shamsuddin, 2010; Ansari et al., 2014). Видовете от род *Rhizobium* са широко известни със способността си за фиксация на азот в ризосферата като резултат от метаболитната им активност (Khan et al., 2009; Guimaraes et al., 2012).

Бактериите от род *Brevibacterium* са съобщавани като повсеместно разпространени почвени микроорганизми (Stolp, 1988; Pattiram et al., 2014; Fan et al., 2016). Бактерията *Brevibacterium casei* Collins et al. е установявана в ризосферата на ориз при повишена киселинност на почвата (Yadav et al., 2011). Видът влиза в симбиотични взаимоотношения с белия синап (*Sinapis alba*

L.), като подобрява усвояването на тежки метали (Cd, Zn и Cu) от растението и ускорява растежа (Plociniczak et al., 2016).

Според Uradhuay et al. (2009), бактерии от род *Bacillus*, обитаващи ризосферата на пшеницата, подобряват устойчивостта на растенията към почвено засоляване. *B. subtilis* (Ehrenberg) Cohn потиска развитието на редица гъбни патогени, в т.ч. *F. oxysporum* (Cao et al., 2011), *R. solani* (Asaka and Shoda, 1996; Huang et al., 2012), *Aspergillus* spp. и *Penicillium* spp. (Munimbazi and Bullerman, 1998). *B. subtilis* проявява антагонистично действие спрямо редица патогенни гъби – *F. graminearum* по класовете на пшеница и ечемик (Abdulkareem et al., 2014; Zhao et al., 2014), *R. solani* по корените и базите на пшеница, ечемик и овес (Merriman et al., 1974), *F. oxysporum* по корените на памук и соя (Youssef and El-Sayed, 1964; Li and Ma, 2012), *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg по корените на царевица (Cavaglieri et al., 2005) и много други. Отделни щамове на *B. subtilis* проявяват антагонистична активност към видовете *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* и *F. moniliforme* (Huyen et al., 2004). Освен в почвата, *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn се среща в оборския тор (Swain and Ray, 2009), морската вода (Ivanova et al., 1999; Nisha & Divakaran, 2014) и др. Разпространението на вида е установено в Европа (Cazorla et al., 2007), Азия (Yilmaz et al., 2006; Borah et al., 2012; Mathur et al., 2014; Amin et al., 2015; Murab et al., 2016), Америка (Roberts et al., 1996; Ruiz et al., 2014) и Африка (Marei, 2013; Oyedele et al., 2014; Wafula et al., 2014). Бактерията участва във ферментационните процеси при разлагането на органични торове и съгласно Chen (2006) може успешно да се използва като средство за постигане на по-високи добиви от културните растения.

Друг вид от същия род, *Bacillus pumilus* Meyer and Gottheil, се среща в почвата (Amin et al., 2015) и морската вода (Parvathi et al., 2009). Разпространен е в Европа (Shagimardanova et al., 2014), Азия (Amin et al., 2015), Африка (Bathily et al., 2010) и Южна Америка (Elsas and Penido, 1981). Видът е открит в ризосферата на ечемика (Nielsen and Sorensen, 1996). При *in vitro* опити *B. pumilus* потиска развитието на гъби от род *Fusarium*, *Penicillium* и *Aspergillus* (Munimbazi and Bullerman, 1998). Бактерията проявява изразени антагонистични свойства по отношение на

гъбните видове *F. oxysporum* и *R. solani* (Asaka and Shoda, 1996; Huang et al., 2012; Agarwal et al., 2017).

Целта на проведеното изследване бе да се проследи в условия *in vitro* антагонистичната активност на отделни щамове от различни видове бактерии, изолирани от ризосферата на пшеница и овес върху набор от почвообитаващи гъбни и гъбоподобни патогени по корените и базите на житни култури със слята повърхност.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

### *Прицелни патогенни видове*

За целите на настоящото изследване бяха използвани наши 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 симптоматични 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 фазии от развитието на житни култури със слята повърхност в България (Yanashkov et al., 2017).

### *Изолиране и идентифициране на 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 потискат растежа на мицела на различни почвообитаващи гъбни патогени по житните култури (Yanashkov et al., 2017). 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. За целта беше използвана автоматизирана система Biolog™. Изолираните бактериални щамове бяха идентифицирани до вид от проф. Богацевска (ИПАЗР „Н. Пушкиarov“) с фенотипен анализ



Biolog™ (GN, GP-микроплаки), базиращ се на метаболитната активност на Грам положителни и Грам отрицателни бактерии към 95 въглеродни източника. Получените резултати бяха анализирани с програмен продукт MicroLog 1, Version MicroLog™ 4.20.05 (Biolog™, CA, USA).

### **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 and Dhingra (1995) и Nameeda et al. (2006).

Втечен (42°C) картофено-декстрозен агар (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 по диагонала на всяко блюдо беше нанасяна чиста култура от отделен бактериален щам 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 x бактериен щам) 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°C 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):  $GI_{\%} = 100 - (D * 100 / C)$ , 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.

### **Статистически анализ**

Всеки опит *in vitro* беше проведен двукратно. Експерименталните данни от два последователно проведени опита бяха анализирани поотделно за установяване на хомогенност на резултатите, след което бяха обединени и анализирани съвместно. Получените данни бяха анализирани след статистическа обработка 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  $P \leq 0.001$  (Gardiner, 1997). Всички анализи бяха извършвани с програмен продукт IBM SPSS Statistics 19.

## **РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ**

### **Ризосферни бактерии, потенциални антагонисти**

В настоящото изследване бяха идентифицирани общо пет вида бактерии, различаващи се по метаболитен профил – *Pseudomonas marginalis* от кореновата система на пшеница сорт Алтиго (гр. Ямбол, с. Дряново) със сходство 95%, сумарен индекс (SIM) 0.581 и дистанционен индекс (DIST) 6.08 (Krejzar et al., 2008; Kudela et al., 2010; Beiki et al., 2016); *Rhizobium radiobacter* от кореновата система на пшеница сорт Енола (гр. Костинброд) със сходство 100%, сумарен индекс 0.615 и дистанционен индекс 5.96 (Moussa and Youssef, 2012); *Bacillus casei* от корени на овес, сорт Дунав (гр. Карнобат) със сходство 100%, сумарен индекс 0.662 и дистанционен индекс 5.16 (Kotan et al., 2006); *B. subtilis* от корени на обикновен щир със сходство 93%, сумарен индекс 0.580 и дистанционен индекс 5.86 GP-ROD SB (Jeong et al., 2010; Ahmad et al., 2017); *B. pumilus* от кореновата система на овес, сорт Дунав (гр. Карнобат) със сходство 100%, сумарен индекс 0.833 и дистанционен индекс 2,51 GP-ROD SB (Bathily et al., 2010; Narayanasamy, 2013).

**Антагонистична активност на изпитваните бактерии**

Резултатите за антагонистичната активност на изпитвания набор от ризосферни бактерии върху вида *F. culmorum* са представени на Таблица 1. Статистически значимо ( $P \leq 0.05$ ) потискане на растежа на мицела на патогена показва

ха три от изпитваните бактерии – *B. subtilis*, *P. marginalis* и *B. casei*. В сравнение с контролния вариант, растежът 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 значими разлики в размера на

**Таблица 1.** Инхибиращ ефект на ризосферни бактерии върху растежа на мицела на гъбата *Fusarium culmorum* в опити *in vitro*

**Table 1.** *In vitro* inhibitory effect of rhizosphere bacteria on mycelial growth of *Fusarium culmorum*

Кандидат биоагент/ Candidate bioagent	Диаметър на гъбната колония (mm) <sup>a</sup> след различна продължителност на инкубиране (дни)/ Diameter of fungal colony (mm) after different periods of incubation (days)				Инхибиране на растежа <sup>b</sup> / Growth inhibition (%)
	3	5	7	10	
Контрола/ Control	7.8 a	12.7 a	14.9 a	18.6 a	C
<i>B. subtilis</i>	4.1 b	5.5 c	6.8 c	14.4 d	22.6
<i>R. radiobacter</i>	6.1 b	9.1 b	15.4 a	17.8 ab	4.3
<i>B. pumilus</i>	6.6 b	10.9 ab	14.1 a	17.5 ab	5.9
<i>P. marginalis</i>	7.3 a	9.8 b	12.5 b	15.5 c	16.7
<i>B. casei</i>	6.1 b	9.6 c	13.5 ab	16.4 c	11.8
F	11.221	34.500	36.810	18.060	
LSD <sub>0.05</sub>	0.109	0.100	0.149	0.106	

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

<sup>b</sup> Представената стойност се отнася за десетия ден на инкубиране.

**Таблица 2.** Инхибиращ ефект на ризосферни бактерии върху растежа на мицела на гъбата *Fusarium graminearum* в опити *in vitro*

**Table 2.** *In vitro* inhibitory effect of rhizosphere bacteria on mycelial growth of *Fusarium graminearum*

Кандидат биоагент/ Candidate bioagent	Диаметър на гъбната колония (mm) <sup>a</sup> след различна продължителност на инкубиране (дни)/ Diameter of fungal colony (mm) after different periods of incubation (days)				Инхибиране на растежа <sup>b</sup> / Growth inhibition (%)
	3	5	7	10	
Контрола/ Control	7.3 a	11.7 a	16.3 a	18.9 a	C
<i>B. subtilis</i>	3.5 c	4.5 d	6.5 d	12.6 d	33.3
<i>R. radiobacter</i>	6.0 b	12.9 a	17.1 a	19.4 a	-2.6
<i>B. pumilus</i>	7.0 ab	9.6 b	12.6 b	16.1 b	14.8
<i>P. marginalis</i>	5.5 b	8.8 b,c	11.3 c	14.3 c	24.3
<i>B. casei</i>	4.6 c	8.4 c	12.1 b	14.6 c	22.8
F	166.290	48.430	85.200	40.020	
LSD <sub>0.05</sub>	0.103	0.121	0.119	0.122	

<sup>a</sup> Варианти, обозначени с еднакъв буквен символ се отнасят към един и същ клас на разпределение по Duncan спрямо изследвания признак – размер на колонииите.

<sup>b</sup> Представената стойност се отнася за десетия ден на инкубиране.

колониите между тези два варианта и нетретия контрола.

По отношение на *F. graminearum*, от изпитваните бактерии *B. subtilis* демонстрираше най-силен инхибиращ ефект (33.3% спрямо контролата), следвана от *P. marginalis* (24.3%), *B. casei* (22.8%) и *B. pumilus* (14.8%) (Таблица 2). Видът *R. radiobacter* оказваше незначително стимулиращо действие на растежа на мицела на изпитвания патоген до края на периода на експериментиране.

Аналогични резултати бяха получени в опитите с *F. oxysporum*. Бактериите *B. subtilis*, *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 3). И тук видът *R. radiobacter* демонстрираше незначителен стимулиращ ефект в проведените опити (2.9%) върху растежа на мицела на гъбата.

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 4). До края на експериментите размерът на колониите на патогенната гъба в сравнение с контролата се запази значително по-малък във вариантите с *B. subtilis*, *B. pumilus* и *P. marginalis*, където инхибирането варираше между 34.8% и

28.9%. Видът *R. radiobacter* оказваше незначителен инхибиращ ефект (5.4%), *B. casei* демонстрираше слабо стимулиращо действие по отношение на растежа на патогена (Таблица 4).

Бактериите *B. subtilis*, *B. pumilus* и *P. marginalis* показваха значителен инхибиращ ефект – 35.4%, 29.6% и 32.7%, съответно, към мицела на *F. equiseti* (Таблица 5). 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.

От данните представени на Таблица 6 е видно, че растежът на *D. sorokiniana* беше потиснат значително в резултат на съвместното култивиране на гъбата с *B. subtilis* 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%.

Значителен инхибиращ ефект върху растежа на мицела на гъбоподобния патоген *P. ultimum* (43.6%) беше констатиран при тестиране на бактерията *P. marginalis*. Резултатите са представени на Таблица 7.

Резултатите, получени в настоящото изследване показват, че изпитваните ризосферни бактерии са в състояние да потискат растежа на

**Таблица 3.** Инхибиращ ефект на ризосферни бактерии върху растежа на мицела на гъбата *Fusarium oxysporum* в опити *in vitro*

**Table 3.** *In vitro* inhibitory effect of rhizosphere bacteria on mycelial growth of *Fusarium oxysporum*

Кандидат биоагент/ Candidate bioagent	Диаметър на гъбната колония (mm) <sup>a</sup> след различна продължителност на инкубиране (дни)/ Diameter of fungal colony (mm) after different periods of incubation (days)				Инхибиране на растежа <sup>b</sup> / Growth inhibition (%)
	3	5	7	10	
Контрола/ Control	12.1 b	14.5 b	24.1 a	24.1 a	C
<i>B. subtilis</i>	5.9 d	6.9 e	8.9 c	16.7 c	30.7
<i>R. radiobacter</i>	15.8 a	20.0 a	22.9 a	24.8 a	-2.9
<i>B. pumilus</i>	11.0 b,c	12.3 c	15.0 b	18.9 b	21.6
<i>P. marginalis</i>	10.1 c	22.4 c	13.9 b	17.1 c	29.0
<i>B. casei</i>	4.8 d	8.9 d	14.4 b	17.0 c	29.5
F	87.710	122.670	71.920	27.120	
LSD <sub>0.05</sub>	0.124	0.119	0.128	0.169	

<sup>a</sup> 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  $P \leq 0.05$ .

<sup>b</sup> Представената стойност се отнася за десетия ден на инкубиране.

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. subtilis* 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. subtilis* 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

**Таблица 4.** Инхибиращ ефект на ризосферни бактерии върху растежа на мицела на гъбата *Fusarium sporotrichiella* в *in vitro* опити

**Table 4.** *In vitro* inhibitory effect of rhizosphere bacteria on mycelial growth of *Fusarium sporotrichiella*

Кандидат биоагент/ Candidate bioagent	Диаметър на гъбната колония (mm) <sup>a</sup> след различна продължителност на инкубиране (дни)/ Diameter of fungal colony (mm) after different periods of incubation (days)				Инхибиране на растежа <sup>b</sup> / Growth inhibition (%)
	3	5	7	10	
Контрола/ Control	7.2 a	13.3 a	17.1 b	20.4 b	C
<i>B. subtilis</i>	4.4 c	7.4 c	10.4 d	13.3 d	34.8
<i>R. radiobacter</i>	4.1 c	6.1 c	16.8 c	19.3 b	5.4
<i>B. pumilus</i>	6.3 b	9.0 b	12.0 d	14.5 c	28.9
<i>P. marginalis</i>	4.1 c	7.0 c	8.3 e	12.9 d	36.8
<i>B. casei</i>	4.4 c	9.9 b	19.0 a	21.8 a	-6.9
F	26.090	35.210	46.98	81.120	
LSD <sub>0.05</sub>	0.075	0.125	0.18	0.125	

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

<sup>b</sup> Представената стойност се отнася за десетия ден на инкубиране.

**Таблица 5.** Инхибиращ ефект на ризосферни бактерии върху растежа на мицела на гъбата *Fusarium equiseti* в *in vitro* опити

**Table 5.** *In vitro* inhibitory effect of rhizosphere bacteria on mycelial growth of *Fusarium equiseti*

Кандидат биоагент/ Candidate bioagent	Диаметър на гъбната колония (mm) <sup>a</sup> след различна продължителност на инкубиране (дни)/ Diameter of fungal colony (mm) after different periods of incubation (days)				Инхибиране на растежа <sup>b</sup> / Growth inhibition (%)
	3	5	7	10	
Контрола/ Control	13.2 a	14.5 b	24.1 a	26.0 a	C
<i>B. subtilis</i>	6.8 c	7.8 d	9.9 e	16.8 c	35.4
<i>R. radiobacter</i>	13.8 a	16 a	23.8 b	26.4 a	-1.5
<i>B. pumilus</i>	10.4 b	12.2 c	15.6 d	18.3 c	29.6
<i>P. marginalis</i>	9.3 b	11.7 c	14.5 d	17.5 c	32.7
<i>B. casei</i>	11.0 b	15.4 ab	19.0 c	23.5 b	9.6
F	12.000	24.000	87.320	50.040	
LSD <sub>0.05</sub>	0.215	0.191	0.262	0.179	

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

<sup>b</sup> Представената стойност се отнася за десетия ден на инкубиране.



**Таблица 6.** Инхибиращ ефект на ризосферни бактерии върху растежа на мицела на гъбата *Drechslera sorokiniana* в *in vitro* опити.

**Table 6.** *In vitro* inhibitory effect of rhizosphere bacteria on mycelial growth of *Drechslera sorokiniana*

Кандидат биоагент/ Candidate bioagent	Диаметър на гъбната колония (mm) <sup>a</sup> след различна продължителност на инкубиране (дни)/ Diameter of fungal colony (mm) after different periods of incubation (days)				Инхибиране на растежа <sup>b</sup> / Growth inhibition (%)
	3	5	7	10	
Контрола/ Control	7.9 a	12.3 b	15.8 a	23.3 a	C
<i>B. subtilis</i>	5.3 b	6.3 d	9.5 c	13.6 c	41.6
<i>R. radiobacter</i>	7.3 a	16.1 a	17.3 a	23.4 a	-0.4
<i>B. pumilus</i>	6.1 a	8.0 c	13.6 b	17.1 b	26.6
F	3.77	47.36	33.47	47.68	
LSD0.05	0.172	0.185	0.173	0.116	

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

<sup>b</sup> Представената стойност се отнася за десетия ден на инкубиране.

**Таблица 7.** Инхибиращ ефект на ризосферни бактерии върху растежа на мицела на гъбата *Pythium ultimum* в *in vitro* опити

**Table 7.** *In vitro* inhibitory effect of rhizosphere bacteria on mycelial growth of *Pythium ultimum*

Кандидат биоагент/ Candidate bioagent	Диаметър на гъбната колония (mm) <sup>a</sup> след различна продължителност на инкубиране (дни)/ Diameter of fungal colony (mm) after different periods of incubation (days)				Инхибиране на растежа <sup>b</sup> / Growth inhibition (%)
	3	5	7	10	
Контрола/ Control	20.1 a	31.8 a	39.0 a	39.0 a	C
<i>P. marginalis</i>	15.3 b	19.8 b	21.0 b	22.0 a	43.6
F	103.36	50.89	45.00	40.46	
LSD0.05	0.114	0.12	0.63	0.63	

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

<sup>b</sup> Представената стойност се отнася за десетия ден на инкубиране.

по отношение на патогените свойства се отличава видът *B. casei*, инхибиращ растежа на мицела на четири вида гъби – *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. equiseti*, но с известен стимулиращ ефект (6.9%) по отношение на *F. sporotrichiella*. Друг вид сред тестираните кандидат-биоагенти е *R. radiobacter* 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 по отношение на *F. graminearum* (2.6%), *F. oxysporum* (2.9%), *F. equiseti* (1.5%) и *D. sorokiniana* (0.4%).

Наличието на бактерии в ризосферата на пшеница, ечемик, овес, царевица, ориз, соя, памук и др. е установено от редица автори (Merriman et al., 1974; Gurusiddaiah et al., 1994; Nielsen and Sorensen, 1996; Srivastava et al., 1999; Cavaglieri et al., 2005; Upadhyay et al., 2009; Mia et al., 2010; Yadav et al., 2011; Li and Ma, 2012; Ansari et al., 2014). Антагонистични свойства спрямо патогенни за житните култури гъби и гъбоподобни организми са демонстрирани в изследванията на Nielsen and Sorensen (1997), Huyen et al. (2004), Hameeda et al. (2006), Li and Ma (2012), Ruiz et al. (2014), Fan et al., (2016) и Ahmad et al. (2017).

Натрупването в ризосферата на житните култури на тези и други антагонистични организми има потенциал за редуциране на инокулума на почвообитаващите патогени в инфектирани земеделски почви. От друга страна, бактерии от род *Pseudomonas* и *Bacillus* въздействат като ризомедиатори, фитостимулатори и регулатори на устойчивостта към неблагоприятни фактори при отглежданите култури (Lugtenberg and Kamilova, 2009). *Rhizobium* spp. се характеризира със симбионтно присъствие в ризосферата, което се свързва с подобряване на усвояването на азот от корените на растенията (Marella, 2014). Счита се, че повечето ендифитни бактерии (*Pseudomonas* spp. и *Bacillus* spp.) произхождат от ризосферата и след преминаване в тъканите на растението част от тях встъпват в симбиотични взаимоотношения с гостоприемника (Ryan et al., 2008). Mavrodi et al. (2012) описват многокомпонентното положително въздействие на *P. fluorescens* и *P. marginalis* при култивиране на пшеница. Ефектът се изразява в подобряване на растежа и същевременно потискане на проявите на кореново гниене, причинявано от *Pythium* spp. и *Rhizoctonia* spp. Следователно ризосферната микробиологична активност се оказва стопански значим фактор, влияещ върху фитопатологичните процеси и получаваните добиви.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В литературата се посочват редица бактерии (*Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp.) с антагонистични качества към фитопатогенни гъби, основни причинители на кореново и базично гниене по житни култури със слята повърхност (Merriman et al., 1974; Munimbazi and Bullerman, 1998; Walsh et al., 2001; Gao et al., 2012; Khan, 2013; Abdulkareem et al., 2014; Zhao et al., 2014). Представените от тези автори данни, както и 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 изследвания.

## ЛИТЕРАТУРА

- Abdulkareem, M., Aboud, H. M., Saood, H. M., & Shibly, M. K.** (2014). Antagonistic activity of some plant growth rhizobacteria to *Fusarium graminearum*. *International Journal of Phytopathology*, 3(1), 49-54.
- Agarwal, M., Dheeman, S., Dubey, R. C., Kumar, P., Maheshwari, D. K., & Bajpai, V. K.** (2017). Differential antagonistic responses of *Bacillus pumilus* MSUA3 against *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* causing fungal diseases in *Fagopyrum esculentum* Moench. *Microbiological Research*, 205, 40-47.
- Ahmad, Z., Wu, J., Chen, L., & Dong, W.** (2017). Isolated *Bacillus subtilis* strain 330-2 and its antagonistic genes identified by the removing PCR. *Scientific Reports*, 7(1), 1777.
- Amin, M., Rakhisi, Z., & Ahmady, A. Z.** (2015). Isolation and identification of *Bacillus* species from soil and evaluation of their antibacterial properties. *Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection*, 2(1) e23233.
- Ansari, P. G., Rao, D. L. N., & Pal, K. K.** (2014). Diversity and phylogeny of soybean rhizobia in central India. *Annals of microbiology*, 64(4), 1553-1565.
- Asaka, O., & Shoda, M.** (1996). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *Applied and environmental microbiology*, 62(11), 4081-4085.
- Atanasov, D., Dodov, D., Martinov, S., Trifonova, V., Hristov, A.** (1932). *New parasitic fungi for Bulgaria*. In: Sofia University Yearbook, Faculty of Agronomy, 10, 341-366 (Bg).
- Bathily, H., Babana, A. H., & Samaké, F.** (2010). *Bacillus pumilus*, a new pathogen on potato tubers in storage in Mali. *African Journal of Microbiology Research*, 4(20), 2067-2071.
- Beiki, F., Busquets, A., Gomila, M., Rahimian, H., Lalucat, J., & García-Valdés, E.** (2016). New *Pseudomonas* spp. are pathogenic to citrus. *PLoS one*, 11(2), e0148796.
- Borah, D., Yadav, R. N. S., Sangra, A., Shahin, L. & Chaubey, A. K.** (2012). Production, purification and characterization of nattokinase from *Bacillus Subtilis*, isolated from tea garden soil samples of Dibrugarh, Assam. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 5(3), 124-125.
- Bottalico, A.** (1998). *Fusarium* diseases of cereals: species complex and related mycotoxin profiles in Europe. *Journal of Plant Pathology*, 80(2), 85-103.
- Bradbury, J. F.** (1986). *Guide to the Plant Pathogenic Bacteria*. CAB International Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 332 p.

- Cao, Y., Zhang, Z., Ling, N., Yuan, Y., Zheng, X., Shen, B., & Shen, Q. (2011). *Bacillus subtilis* SQR 9 can control *Fusarium* wilt in cucumber by colonizing plant roots. *Biology and Fertility of Soils*, 47(5), 495-506.
- Cavaliere, L., Orlando, J. R. M. I., Rodriguez, M. I., Chulze, S., & Etcheverry, M. (2005). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level. *Research in Microbiology*, 156(5-6), 748-754.
- Cazorla, F. M., Romero, D., Pérez-García, A., Lugtenberg, B. J. J., Vicente, A. D., & Bloemberg, G. (2007). Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizosphere displaying biocontrol activity. *Journal of applied microbiology*, 103(5), 1950-1959.
- Chamswarng, C., & Cook, R. J. (1985). Identification and comparative pathogenicity of *Pythium* species from wheat roots and wheat-field soils in the Pacific Northwest. *Phytopathology*, 75(7), 821-827.
- Chen, J. H. (2006). The combined use of chemical and organic fertilizers and/or biofertilizer for crop growth and soil fertility. In *International workshop on sustained management of the soil-rhizosphere system for efficient crop production and fertilizer use* (Vol. 16, p. 20). Land Development Department Bangkok, Thailand.
- Cook, R. J., Thomashow, L. S., Weller, D. M., Fujimoto, D., Mazzola, M., Bangera, G., & Kim, D. S. (1995). Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(10), 4197-4201.
- Dimitrov, M. (1980). Mycology review of cereals crops - wheat, corn and beans in Bulgaria. Dissertation for awarding of DMN degree, Sofia (Bg).
- Duveiller, E., Ginkel, M. van & Dubin, H. (1998). Helminthosporium Blights of Wheat: Spot Blotch and Tan Spot. In: *Proceedings of an International Workshop Held at CIMMYT, El Batan, Mexico, 9-14 February 1997*. CIMMYT, El Batan, Mexico, 1-5.
- Elliott, C. (1951). *Manual of bacterial plant pathogens*. Chronica Botanica Co., Waltham, Mass., USA.
- Elsas, J. D. van, & Penido, E. G. (1981). Isolation and characterization of *Bacillus pumilus* phages from Brazilian soil. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Zweite Naturwissenschaftliche Abteilung: Mikrobiologie der Landwirtschaft, der Technologie und des Umweltschutzes*, 136(7), 581-589.
- Fan, Z. Y., Miao, C. P., Qiao, X. G., Zheng, Y. K., Chen, H. H., Chen, Y. W., Xu, L.-H., Zhao, L. X. & Guan, H. L. (2016). Diversity, distribution, and antagonistic activities of rhizobacteria of *Panax notoginseng*. *Journal of Ginseng Research*, 40(2), 97-104.
- Gardiner, W. P. (1997). *Statistics for the biosciences: data analysis using minitab software*. Prentice Hall, 416 pp.
- Gao, G., Yin, D., Chen, S., Xia, F., Yang, J., Li, Q., & Wang, W. (2012). Effect of biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* 2P24 on soil fungal community in cucumber rhizosphere using T-RFLP and DGGE. *PLoS One*, 7(2), e31806.
- Gerlagh, M. (1968). Introduction of *Ophiobolus graminis* into new polders and its decline. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 74(2), 1-97.
- Goto, M. (1956). A rot disease of cabbage due to *Pseudomonas marginalis*. *Agriculture and Horticulture* (Tokyo), 31(11), 1547-1548.
- Guimarães, A. A., Jaramillo, P. M. D., Nóbrega, R. S. A., Florentino, L. A., Silva, K. B., & de Souza Moreira, F. M. (2012). Genetic and symbiotic diversity of nitrogen-fixing bacteria isolated from agricultural soils in the western Amazon by using cowpea as the trap plant. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(18), 6726-6733.
- Gurusiddaiah, S., Gealy, D. R., Kennedy, A. C., & Ogg, A. G. (1994). Isolation and characterization of metabolites from *Pseudomonas fluorescens*-D7 for control of downy brome (*Bromus tectorum*). *Weed science*, 42(3), 492-501.
- Hameeda, B., Rupela, O. P., & Reddy, G. (2006). Antagonistic activity on bacteria inhabiting composts against soil-borne plant pathogenic fungi. *Indian Journal of Microbiology*, 46(4), 389-396.
- Huang, X., Zhang, N., Yong, X., Yang, X., & Shen, Q. (2012). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off disease in cucumber with *Bacillus pumilus* SQR-N43. *Microbiological Research*, 167(3), 135-143.
- Humphry, D. R., Andrews, M., Santos, S. R., James, E. K., Vinogradova, L. V., Perin, L., Reis, V. M. & Cummings, S. P. (2007). Phylogenetic assignment and mechanism of action of a crop growth promoting *Rhizobium radiobacter* strain used as a biofertiliser on graminaceous crops in Russia. *Antonie van Leeuwenhoek*, 91(2), 105-113.
- Huyen, N. N., Ha, N. H., & Chau, N. T. (2004). Isolation and screening and study on *Bacillus subtilis* antagonistic production technology to prevent mold in cereals. *Science and Technology Journal of Agriculture and Rural Development*. <http://ring.ciard.net/>
- Ivanova, E. P., Vysotskii, M. V., Svetashev, V. I., Nerdashkovskaya, O. I., Gorshkova, N. M., Mikhailov, V.V., Yumoto, N., Shigeri, Y., Taguchi, T. & Yoshikawa, S. (1999). Characterization of *Bacillus* strains of marine origin. *International Microbiology*, 2(4), 267-271.
- Ingram, D. M., & Cook, R. J. (1990). Pathogenicity of four *Pythium* species to wheat, barley, peas and lentils. *Plant Pathology*, 39(1), 110-117.
- Jeong, J. H., Jeon, Y. D., Lee, O. M., Kim, J. D., Lee, N. R., Park, G. T., & Son, H. J. (2010). Characterization of a multifunctional feather-degrading *Bacillus subtilis* isolated from forest soil. *Biodegradation*, 21(6), 1029-1040.
- Karadjova, Y. (1979). *Studies on Fusarium species on cereals*. Dissertation, Sofia (Bg).
- Keen, P. L., & Montforts, M. H. (2011). *Antimicrobial resistance in the environment*. John Wiley & Sons.



- Khan, M. S., Zaidi, A., & Musarrat, J.** (Eds.) (2009). *Microbial strategies for crop improvement*. Berlin: Springer.
- Khan, M. R.** (2013). Beneficial bacteria for biological control of fungal pathogens of cereals. In *Bacteria in Agrobiology: Disease Management* (pp. 153-165). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Kotan, R., Sahin, F., & Ala, A.** (2006). Identification and pathogenicity of bacteria isolated from pome fruit trees in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 113(1), 8-13.
- Krejzar, V., Mertelik, J., Pánková, I., Kloudová, K., & Kudela, V.** (2008). *Pseudomonas marginalis* associated with soft rot of *Zantedeschia* spp. *Plant Protection Science*, 44(3), 85-90.
- Kúdela, V., Krejzar, V., & Pánková, I.** (2010). *Pseudomonas corrugata* and *Pseudomonas marginalis* associated with the collapse of tomato plants in rockwool slab hydroponic culture. *Plant Protection Science*, 46(1), 1-11.
- Kumar, J., Schäfer, P., Hüchelhoven, R., Langen, G., Baltruschat, H., Stein, E., Nagarajan, S. & Kogel, K. H.** (2002). *Bipolaris sorokiniana*, a cereal pathogen of global concern: cytological and molecular approaches towards better control. *Molecular Plant Pathology*, 3(4), 185-195.
- Kuzdraliński, A., Szczerba, H., Tofil, K., Filipiak, A., Garbarczyk, E., Dziadko, P., Muszyńska, M. & Solarzka, E.** (2014). Early PCR-based detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides* and *F. poae* on stem bases of winter wheat throughout Poland. *European Journal of Plant Pathology*, 140(3), 491-502.
- Kwak, Y. S., & Weller, D. M.** (2013). Take-all of wheat and natural disease suppression: a review. *The Plant Pathology Journal*, 29(2), 125-135.
- Lamichhane, J. R., & Venturi, V.** (2015). Synergisms between microbial pathogens in plant disease complexes: a growing trend. *Frontiers in Plant Science*, 6, 385.
- Li, Y. G., & Ma, F. M.** (2012). Antagonistic mechanism of *Fusarium oxysporum* of soybean root rot by *Bacillus subtilis*. In *Applied Mechanics and Materials* (Vol. 108, pp. 127-131), Trans Tech Publications.
- Lugtenberg, B., & Kamilova, F.** (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63, 541-556.
- Maheshwari, D. K.** (Ed.). (2011). *Bacteria in agrobiology: crop ecosystems*. Springer Science & Business Media.
- Marei, E. M.** (2013). Isolation and Characterization of *Bacillus subtilis* Phage from Soil Cultivated with Liquorices Root. *International Journal of Microbiological Research*, 4(1), 43-49.
- Marella, S.** (2014). Bacterial endophytes in sustainable crop production: applications, recent developments and challenges ahead. *International Journal of Life Sciences Research*, 2(2), 46-56.
- Mathre, D. E.** (1982). *Compendium of barley diseases*. 2nd Edition. APS Press, 90 p.
- Mathur, A., Kushwaha, A., Singh, A. & Katiyar, A.** (2014). Isolation, purification and characterization of alkaline pectinase from *Bacillus subtilis* isolated from soil. *Der Pharmacia Sinica*, 5, 1-6.
- Mavrodi, O. V., Walter, N., Elateek, S., Taylor, C. G., & Okubara, P. A.** (2012). Suppression of Rhizoctonia and Pythium root rot of wheat by new strains of *Pseudomonas*. *Biological Control*, 62(2), 93-102.
- Mazzola, M.** (2010). Management of resident soil microbial community structure and function to suppress soilborne disease development. *Climate Change and Crop Production*, 1, 200-218.
- 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(5), 634-663.
- Mercado-Blanco, J., Alós, E., Rey, M. D., & Prieto, P.** (2016). *Pseudomonas fluorescens* PICF7 displays an endophytic lifestyle in cultivated cereals and enhances yield in barley. *FEMS microbiology ecology*, 92(8).
- Merriman, P. R., Price, R. D., Kollmorgen, J. F., Piggott, T., & Ridge, E. H.** (1974). Effect of seed inoculation with *Bacillus subtilis* and *Streptomyces griseus* on the growth of cereals and carrots. *Australian Journal of Agricultural Research*, 25(2), 219-226.
- Mia, M. B., & Shamsuddin, Z. H.** (2010). Rhizobium as a crop enhancer and biofertilizer for increased cereal production. *African journal of Biotechnology*, 9(37), 6001-6009.
- Mladenov, M.** (1974). Determination of some origins of genus *Fusarium*, causing wheat fusariosis in Bulgaria. *Rastenievadni nauki*, 11(2), 142-147 (Bg).
- Mladenov, M. & Karadjova, I.** (1982). Survey of the reaction of wheat varieties and lines to four *Fusarium* species causing head fusariosis. Report of 2nd national symposium on plant immunity, Plovdiv, v. 1, 155-161 (Bg).
- Moussa, L. & Youssef, S.** (2012). An endophytic Rhizobium radiobacter strain capable of fixing N<sub>2</sub> in salt-stressed environments. *Egyptian Journal of Agricultural Research*, 90(2), 485-501.
- Müller, E.** (1977). Die systematische stellung des 'Schneeschimmels'. *Revue de Mycologie*, 41, 129-134.
- Munimbazi, C., & Bullerman, L. B.** (1998). Isolation and partial characterization of antifungal metabolites of *Bacillus pumilus*. *Journal of Applied Microbiology*, 84(6), 959-968.
- Muntanola, M.** (1948). Bacteriosis de las Hojas de Lechuga *Pseudomonas marginalis* (Brawn) Stapp. *Review of Applied Mycology*, 27, 404.
- Murab, T., Chandurkar, P., Tripathi, N., Choudhary, A.** (2016). Characterization of proteases production by varying carbon sources from *Bacillus subtilis* isolated from agriculture soil of Lalitpur Dist. (UP). *International Journal of Life Sciences Research*, 2(4), 454-456.



- Narayanasamy, P.** (2013). *Biological management of diseases of crops*. Springer.
- Nielsen, P., & Sørensen, J.** (1997). Multi-target and medium-independent fungal antagonism by hydrolytic enzymes in *Paenibacillus polymyxa* and *Bacillus pumilus* strains from barley rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, 22(3), 183-192.
- Nisha, N. S., & Divakaran, J.** (2014). Optimization of alkaline protease production from *Bacillus subtilis* NS isolated from sea water. *African Journal of Biotechnology*, 13(16), 1707-1713.
- Oswald, J. W.** (1950). Etiology of cereal root rots in California. *Hilgardia*, 19(15), 447-462.
- Oyedele, A. O., & Ogunbanwo, T. S.** (2014). Antifungal activities of *Bacillus subtilis* isolated from some condiments and soil. *African Journal of Microbiology Research*, 8(18), 1841-1849.
- Panday, D., Schumann, P., & Das, S. K.** (2011). *Rhizobium pusense* sp. nov., isolated from the rhizosphere of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(11), 2632-2639.
- Parmeter, J. R.** (Ed.). (1970). *Rhizoctonia solani, biology and pathology*. Univ. of California Press.
- Parvathi, A., Krishna, K., Jose, J., Joseph, N., & Nair, S.** (2009). Biochemical and molecular characterization of *Bacillus pumilus* isolated from coastal environment in Cochin, India. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(2), 269-275.
- Pattiram, P. D., Gunasekaran, B. & Nawawi, N. B. M.** (2014). Identification of bacteria from soil of Cameron Highlands. *Asian Journal of Plant Biology*, 2(2), 39-47.
- Paulitz, T. C., & Adams, K.** (2003). Composition and distribution of *Pythium* communities in wheat fields in eastern Washington State. *Phytopathology*, 93(7), 867-873.
- Pérez-Montaño, F., Alías-Villegas, C., Bellogín, R. A., Del Cerro, 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(5-6), 325-336.
- Pitt, D.** (1964). Studies on sharp eyespot disease of cereals. II. Viability of sclerotia: persistence of the causal fungus, *Rhizoctonia solani* Kühn. *Annals of Applied Biology*, 54(2), 231-240.
- Plaats-Niterink, A. J. van der** (1981). Monograph of the genus *Pythium*. *Studies in Mycology*, Vol. 21, 242 p., Baarn: Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Plociniczak, T., Sinkkonen, A., Romantschuk, M., Sulowicz, S., & Piotrowska-Seget, Z.** (2016). Rhizospheric bacterial strain *Brevibacterium casei* MH8a colonizes plant tissues and enhances Cd, Zn, Cu phytoextraction by white mustard. *Frontiers in plant science*, 7, 101.
- Raaijmakers, J. M., Bonsall, R. F., & Weller, D. M.** (1999). Effect of population density of *Pseudomonas fluorescens* on production of 2, 4-diacetylphloroglucinol in the rhizosphere of wheat. *Phytopathology*, 89(6), 470-475.
- Raaijmakers, J. M., Weller, D. M., & Thomashow, L. S.** (1997). Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(3), 881-887.
- Rawat, S., Izhari, A., & Khan, A.** (2011). Bacterial diversity in wheat rhizosphere and their characterization. *Adv Appl Sci Res*, 2, 351-356.
- Rennie, W. J., Richardson, M. J., & Noble, M.** (1983). Seed-borne pathogens and the production of quality cereal seed in Scotland. *Seed Science and Technology*, 11, 1115-1127.
- Roberts, M. S., Nakamura, L. K., & Cohan, F. M.** (1996). *Bacillus vallismortis* sp. nov., a close relative of *Bacillus subtilis*, isolated from soil in Death Valley, California. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 46(2), 470-475.
- 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), 1009-1013.
- Ruiz, S. E., Cristóbal, A. J., Reyes, R. A., Tun, S. J., García, R. A., & Pacheco, A. J.** (2014). In vitro antagonistic activity of *Bacillus subtilis* strains isolated from soils of the Yucatan Peninsula against *Macrophomina phaseolina* and *Meloidogyne incognita*. *Phyton International Journal of Experimental Botany*, 84, 45-47.
- Ryan, R. P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D. J., & Dowling, D. N.** (2008). Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiology Letters*, 278(1), 1-9.
- Shagimardanova, E., Toymontseva, A., Balaban, N., Mardanov, A., Danilova, Y, Gusev, O., Kostryukova, E., Karpova, I., Manolov, A., Alexeev, D. & Sharipova, M.** (2014). Draft genome sequence of *Bacillus pumilus* 7P, isolated from the soil of the Tatarstan Republic, Russia. *Genome Announcements*, 2(3), e00599-14.
- Sinclair, J. B., & Dhingra, O. D.** (1995). *Basic plant pathology methods*. CRC press.
- Singleton, L.L., Mihail, J.D. and Rush, C.M.,** (ed.) 1992. *Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi*. APS Press, St. Paul, MN, 266 p.
- Smith, E. F., & Townsend, C. O.** (1907). A plant-tumor of bacterial origin. *Science*, 25(643), 671-673.
- Srivastava, R., Johri, B. N., & Sharma, A.** (1999). Colonization of wheat (*Triticum aestivum* L.) root by fluorescent pseudomonads (GRP3 and PRS9). *Indian Journal of Microbiology*, 39(4), 205-210.
- Stolp, H.** (1988). *Microbial ecology: organisms, habitats, activities*. Cambridge University Press.
- Strausbaugh, C. A., Bradley, C. A., Koehn, A. C., & Forster, R. L.** (2004). Survey of root diseases of wheat and barley in southeastern Idaho. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 26(2), 167-176.
- Sturz, A. V., & Bernier, C. C.** (1987). Survival of cereal root pathogens in the stubble and soil of cereal versus

- noncereal crops. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 9(3), 205-213.
- Swain, M. R., & Ray, R. C.** (2009). Biocontrol and other beneficial activities of *Bacillus subtilis* isolated from cowdung microflora. *Microbiological Research*, 164(2), 121-130.
- 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(8), 3499-3508.
- Thomashow, L. S., & Weller, D. M.** (1990). Application of fluorescent pseudomonads to control root diseases of wheat and some mechanisms of disease suppression. *Biological Control of Soil-Borne Plant Pathogens*. CAB International, Wallingford, 109-122.
- Thomashow, L. S., & Weller, D. M.** (1991). Role of antibiotics and siderophores in biocontrol of take-all disease of wheat. In *The Rhizosphere and Plant Growth* (pp. 245-251). Springer, Dordrecht.
- Thomashow, L. S., Weller, D. M., Bonsall, R. F., & Pierson, 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(4), 908-912.
- Todorova, V. & Karzhin, H.** (1972). *The worldwide experience of applying effective methods for control of root rot of cereal crops*. CNTII, Sofia (Bg).
- Upadhyay, S. K., Singh, D. P., & Saikia, R.** (2009). Genetic diversity of plant growth promoting rhizobacteria isolated from rhizospheric soil of wheat under saline condition. *Current Microbiology*, 59(5), 489-496.
- Wafula, E. N., Kinyua, J., Karuiki, D., Muigai, A., & Mwirichia, R. K.** (2014). Isolation and characterization of bacillus species from soil in Ngere tea catchment area of Murang'a county, Kenya. *International Journal of Life Sciences Research*, 2(3), 27-35.
- Walsh, U. F., Morrissey, J. P., & O'Gara, F.** (2001). *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(3), 289-295.
- Wiese, 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(11), 1548-1553.
- Weller, D. M.** (2007). *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years. *Phytopathology*, 97(2), 250-256.
- Weller, D. M., Raaijmakers, J. M., Gardener, B. B. M., & Thomashow, L. S.** (2002). Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 40(1), 309-348.
- Yadav, S., Kaushik, R., Saxena, A. K., & Arora, D. K.** (2011). Diversity and phylogeny of plant growth-promoting bacilli from moderately acidic soil. *Journal of Basic Microbiology*, 51(1), 98-106.
- Yanashkov, I., Avramov, Zh. & Vatchev, Ts.** (2017). Soilborne fungal pathogens of small grain cereal crops in Bulgaria: species composition and distribution. *Rasteniavadni nauki*, 54(2), 10-23 (Bg).
- Yilmaz, M., Soran, H., & Beyatli, Y.** (2006). Antimicrobial activities of some *Bacillus* spp. strains isolated from the soil. *Microbiological Research*, 161(2), 127-131.
- Yin, C., Hulbert, S. H., Schroeder, K. L., Mavrodi, O., Mavrodi, D., Dhingra, A., Schillinger, W. F. & Paulitz, T. C.** (2013). Role of bacterial communities in the natural suppression of *Rhizoctonia solani* bare patch disease of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Applied and Environmental Microbiology*, 79(23), 7428-7438.
- Youssef, Y. A. G., & El-Sayed, M.** (1964). Investigations of the biological control of *Fusarium* cotton wilt by *Bacillus subtilis* Cohn. *Phytopathologia Mediterranea*, 3(1), 9-13.
- Zhao, Y., Selvaraj, J. N., Xing, F., Zhou, L., Wang, Y., Song, H., Tan, X., Sun, L., Sangare, L., Folly, Y. M., Liu, Y.** (2014). Antagonistic action of *Bacillus subtilis* strain SG6 on *Fusarium graminearum*. *PLoS one*, 9(3), e92486.