СЕЛСКОСТОПАНСКА АКАДЕМИЯ – СОФИЯ

ИНСТИТУТ ПО ЗЕЛЕНЧУКОВИ КУЛТУРИ „МАРИЦА“ -ПЛОВДИВ

НАТАЛИЯ ГЕОРГИЕВА КАРАДЖОВА

БЯЛО ГНИЕНЕ (*SCLEROTINIA SCLEROTIORUM* (LIB.) DE BARY) ПО ПИПЕР (*CAPSICUM ANNUM* L.) В КУЛТИВАЦИОННИ СЪОРЪЖЕНИЯ И ВЪЗМОЖНОСТИ ЗА БИОЛОГИЧЕН КОНТРОЛ



АВТОРЕФЕРАТ

За присъждане на образователна и научна степен „Доктор”

Професионално направление: 6.2 Растителна защита

Научна специалност: Растителна защита

Научен ръководител:

Проф. д-р Петър Николов Чавдаров,

ПЛОВДИВ, 2024

Дисертационният труд се състои от общо 147 страници, в т.ч. 27 таблици и 36 фигури. Библиографската справка включва 330 заглавия, от които 58 на кирилица и 272 на латиница.

Експерименталната работа е извършена през периода 2020-2023 г. в Институт по зеленчукови култури „Марица" – Пловдив.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на заседание на разширен научен съвет на отдел „Технологии в зеленчукопроизводството" към ИЗК „Марица" – Пловдив (Протокол № 3/08.05.2024 г.)

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 20.09.2024 г. в ИЗК „Марица" – Пловдив от 10,00 часа на заседание на Научното жури, изд. със заповед № РД на председателя на Селскостопанска академия – София.

Научен ръководител:
проф. д-р Петър Николов Чавдаров
Рецензенти:
проф. Д.н. Марияна Накова
проф. д-р Христо Бозуков
Становища:
проф. д-р Марияна Иванова
доц. д-р Йорданка Карталска
доц. д-р Винелина Янкова

Благодарности:

Искрено благодаря на моя научен ръководител проф. д-р Петър Чавдаров, че ми даде възможността да бъда негов докторант и да завърша дисертацията си. Неговият оптимизъм и тактически съвети бяха много полезни за моето изследване и бъдещата ми кариера.

Искам също така да изразя най-дълбоката си признателност към моя научен консултант и моя майка, доц. д-р. Олга Георгиева, не само за знанията, които ми даде, но и за напътствията, търпението и насърчението.

Изказвам своята благодарност на цялото ръководство на Институт по зеленчукови култури „Марица" – Пловдив за съдействието, което ми оказват.

УВОД

Енергийната криза от 90-те години доведе до пълна промяна на производството на пипер в оранжерии. Целогодишното производство на пипер в стъклени оранжерии бе заменено със средно-ранно производство с аварийно отопление, а също така и в полиетиленови оранжерии без отопление. На българския пазар се наложиха салатни сортове пипер по форма и оцветяване на плода тип Златен медал и тип Капия. Това са българските сортове Бяла капия, Златен медал, Сиврия, новите хибриди чужда селекция Арлекин F1, Дала F1, Посониум F1, а също така Пирует F1, Кампари F1, Елзем BJ F1, Амарета F1, Корнелия F1 и др.

Основен нерешен досега проблем при производството на оранжериен пипер е загубата на продукция от болести, причинени от почвени патогени: вертицилийно (*Verticillium dahlia*) и фузарийно (*Fusarium solani*) увяхване, кореново гниене (*Phytophthora capsici, Pythium* spp., *Rhizoctonia solani Kuchn*), сиво (*Botrytis cinerea*) и бяло (*Sclerotinia sclerotiorum*) гниене по стъбла и плодове. Борбата с почвените патогени в България се свежда основно до обеззаразяване на почвата с химични препарати и соларизация. Разрешените химични препарати за обеззаразяване и соларизация не винаги дават надеждни резултати когато почвата е заразена с патогени, които образуват склероции – *Verticillium, Rhizoctonia, Botrytis* и *Sclerotinia*.

Гъбата *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary е слабо специализиран фитопатоген, който заразява широк спектър растения, причиняващ стъблено гниене и има широко географско разпространение. Борбата с инфекцията е доста трудна, тъй като гъбата се обновява от склероции, съхранявани върху растителните остатъци и в почвата дълго време. Към момента няма регистрирани ефикасни фунгициди за борба с тази болест по пипера. Наред с разработването на химически и агротехнически мерки за борба важен аспект е търсенето на устойчиви или толерантни форми на растенията. Понастоящем нивото на устойчивост на сортовете пипер към бяло гниене е неизвестно и потенциални източници на резистентност към патогена в *Capsicum annuum* и други *Capsicum* spp. не са идентифицирани. В тази връзка, въпреки значителния брой трудове, посветени на този вид патоген, са необходими допълнителни изследвания на неговата биология, връзката му с растението-гостоприемник и търсенето на надеждни средства за защита срещу бялото гниене чрез използване на антагонисти или хиперпаразити.

1. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел на това изследване е да се проучи биологията на патогена *Sclerotinia sclerotiorum* и възможностите за биологична борба с бяло гниене по пипера в условията на неотопляеми стоманено-стъклени оранжерии.

За постигане на тази цел са поставени следните задачи:

- ✓ Проучване на биологията на патогена *Sclerotinia sclerotiorum*, причиняващ бяло гниене по оранжериен пипер в България.
- ✓ Проучване на имунната реакция на сортове пипер към заразяване със *Sclerotinia sclerotiorum.*
- ✓ Отбор на перспективен щам гъба от род *Trichoderma* с широк спектър на антагонистична активност спрямо *Sclerotinia sclerotiorum* и други почвени патогени, причинители на болести по пипер в култивационни съоръжения.
- ✓ Производство на експериментални партиди биопрепарат на база отбран щам *Trichoderma sp.* в течна хранителна среда (дълбочинно култивиране).
- ✓ Проучване влиянието от приложението на биологични и органични продукти върху имунната реакция на растения към заразяване с бяло гниене, растежните прояви, продуктивността при пипер сорт Пирует F1 и биологичната активност на почвата.

2. МЕТОДИ НА ИЗСЛЕДВАНЕ

2.1. Диагностика на болести по пипер в култивационни съоръжения. Определяне на таксономичната принадлежност на патогените

2.1.1. Фитопатологично обследване на пиперови площи в оранжерии

Обекти на фитопатологичното обследване. През периода 2020-2022 г. са обследвани оранжериите на ИЗК „Марица“, Пловдив; Брестник, Пловдивско; Три водици, Пазарджик; Мало Конаре, Пазарджик; Куртово Конаре, Пазарджик.

2.1.2. Диагностика на болести

Използвани са класически методи за диагностика на болести:

визуален – отбор на растителни проби с характерни симптоми на заболяване;

биологичен – залагане на засегнатите части от растенията в ексикатор (влажна камера) или върху хранителна среда - 2% картофено-декстрозен агар (КДА) с добавка на 1% стрептомицин.

2.1.3. Определяне на таксономичната принадлежност на изолираните гъби

Таксономичната принадлежност на гъбите бе определена чрез *микроскопски анализ* на структурите, образувани върху заразени растителни части и при култивиране в хранителни среди (Ekins, 2005) с използване на определителите на Пидопличко (1977), Христов (1972), Rifai (1969), Билай (1988), Власова (2004).

2.1.4. Доказване на патогенността на изолатите по Кох

Патогенността на изолатите е доказвана чрез изкуствено заразяване на млади растения пипер във фаза 3-4 двойки същински листа с чисти култури на изолираните гъби. Проследявано е увяхването и загниването на корените при третираните растения. След проява на симптомите, се правеше диагностика и реизолация на патогените по методиката на Campbell & Johnson (2013).

2.2. Проучване на биологията на патогена *Sclerotinia sclerotiorum*

Място на провеждане на експериментите

Експерименталната работа е изведена на територията на ИЗК „Марица“ в лабораторията по фитопатология и в стоманено-стъклена оранжерия като съдов и почвен опити с използване на пипер Пирует F1.

2.2.1. Изолация на гъбата в чиста култура

Направени са изолации на гъбата *Sclerotinia sclerotiorum* от болни растения пипер (стъбло) с произход от оранжерията на с. Мало Конаре, Пловдивско. За експериментална работата е използван изолат *Sclerotinia sclerotiorum* (Ss1) от пипер с характерни признаци на бяло гниене – увяхване на растението, гниене по повърхността на стъблото, съпровождащото се с бял стерилен налеп, формиране на черни, различни по големина склероции във вътрешността на стъблото.

2.2.2. Идентификация на патогена

За определяне на видовата принадлежност на изолираният патоген *S. sclerotiorum* е използван сравнително-морфологичен метод. Описани са симптомите на болестта при естествено и изкуствено заразени растения от пипер. Морфологията на гъбата е изучена чрез микроскопиране на временни препарати. Таксономичната принадлежност на гъбата *Sclerotinia sclerotiorum* е определена по следните признаци: морфология на колониите, структура на мицела, наличие на септи, склероции, образуване на апотеции, наличието на асци, брой и форма на аскоспорите. При диагностика на патогена са използвани определителите на Пидопличко (1974) и Sutton (2001).

Морфологично-културалните характеристики на гъбата са проучени върху различни хранителни среди при +25ºС на тъмно. Формата, профилът, периферията и цветът на колониите, образуването на пигмент, склероции и апотеции са определяни визуално; контурите и структурата – при малко увеличение на бинокулярната лупа,

наличието на асци и аскоспори - чрез микроскопиране. Проследена е способността на изолата да образува апотеции върху естествен субстрат и хранителна среда. Измерени са най-малко по 30 склероции. Варирането в размерите на склероциите е представено под формата на: (най-ниска стойност –) средна аритметична стойност ± средна грешка на средната аритметична (– най-висока стойност). Всички стойности за склероциите са уравнени до цяло число. Цветът на колониите е описан по Rayner (1970). За фенотипната характеристика на *Sclerotinia sclerotiorum* е избран изолат (Ss1) от пипер.

2.2.3. Изследване на влиянието на хранителни среди като източници на въглехидрати върху нарастването на мицела, формирането на склероции и натрупването на биомаса на гъбата

А. Влияние на източниците на въглехидрати върху нарастването на мицела

Изследването на влиянието на източниците на въглехидрати върху нарастването на мицела е проведено чрез промяна на съдържанието на декстроза в картофено-декстрозен агар (КДА) – без декстроза, с 1% декстроза и с 2% декстроза при различни режими на инкубация - естествена светлина (стайна температура, +19°C-21°C), без светлина (температура +23°C и +25°C) и редуващи се режими (10 дни - тъмнина, температура +20°C, след това 10 дни на светлина при +19°C – 21°C). 4 варианта х 5 петриеви блюда във всеки вариант. Интензивността на растежа се преценяше по диаметъра на колонията на 3-ия ден, когато гъбата е най-активна.

Допълнително са направени сравнителни опити за проследяване на интензивността на нарастване на мицела и формиране на склероции на гъбата върху три вида агаризирани хранителни субстрати: синтетична среда на Чапек (СЧА), полусинтетична соево-дестрозна среда (СДА) и естествени хранителни субстрати - ечемични зърна (ЕЗ), агаризирана отвара от моркови, ечемични и пшенични зърна (МПЕ) и морковни блокчета (МБ).

В. Образуване на склероции върху хранителни среди

Образуването на склероции и развитието им са проследявани върху хранителни среди: КДА с 1% декстроза; КДА с 2% декстроза; автоклавирани и след това навлажнени ечемични зърна, поставени в блюда Петри със слой приблизително 1 cm; агаризирана отвара от моркови и ечемичени и пшеничени зърна (50 g от всяка съставка на 1L вода); агаризирана полусинтетична соево - декстрозна среда със следния състав: на 1 L вода (g) - KH_2PO_4 -2, $(NH_4)2SO_4$-1, $MgSO_4$-1, декстроза -20, соево брашно-10.

Петриеви блюда с 20 ml среда се инокулират посредством блокче с диаметър 5 mm, изрязано от ръба на колонията от 5-дневна гъбна култура, отглеждана в КДА с 2% декстроза (Moret et al., 2001). Пълната продължителност на инкубацията на петриевите блюда с гъбата е 21 дни от момента на инокулиране на хранителната среда (Merriman,1976). Всеки вариант съдържаше по 6 петриеви блюда с патогена.

С. Оценка на натрупване на биомасата на гъбата върху течни хранителни среди

Оценката на натрупване на биомасата на гъбата е проучена върху различни течни хранителни среди: картофена среда (КС) без съдържание на декстроза; КС със съдържание на 1% декстроза; КС със съдържание на 2% декстроза; стандартна среда на Чапек със съдържание на 3% декстроза (СЧ); течна соево- декстрозна среда (СДС).

Ферментацията се извършваше чрез непрекъснато разклащане върху клатачка - инкубатор Inkubations- Schüttelschrank BS-4 B. Braun (120 rpm) при температура +21°C в течение на 72h в колби с 250 ml течна хранителна среда, в три повторения за всеки вариант (5 хранителни среди). Проследявано е натрупването на биомасата по варианти в g на 100 ml (g/ml). За целта бе използвана програма за центрофугиране със скорост

5000 rpm, температура +3°C и експозиция 10 min, позволяваща отделянето на течната културална среда от биомасата (мицел).

2.2.4. Проучване жизнеността на склероциите на гъбата

Проучването жизнеността на склероциите на гъбата е направено по описаната от Сердюк методика (Сердюк и др., 2019). Склероциите се засяват за покълване върху КДА с 2% декстроза по следната схема: веднага след изсушаване на 1, 2, 3, 4 и 6 месеца съхранение. За целта склероциите бяха разделени на фракции - малка (0,2–0,3 cm), средна (>0,3-0,4 cm) и едра (>0,4-0,6 cm), като всяка фракция се изследваше поотделно.

Склероциите са измивани в течаща вода в продължение на два часа, за да се омекоти обвивката на склероция, стерилизирани са повърхностно за 1 минута с 0,1% разтвор на $AgNO_3$, след това са изплаквани два пъти в стерилна вода, изсушавани със стерилна филтърна хартия и са поставяни върху блокове, изрязани от агаризирана хранителна среда (6 блока на чаша). Склероциевите плаки са инкубирани при стайни условия в продължение на 7 дни. На 8-ия ден е отчитан броят на покълналите склероции.

2.2.5. Съхранение на склероции

За производството на склероции е използван изолат на *Sclerotinia sclerotiorum* (Ss1), изолиран от заразени растения пипер с произход от оранжерия Мало Конаре. За целта изолатът е поддържан върху картофено- декстрозен агар. Дискове (5 mm) от ръба на активно растящи колонии са прехвърляни в петриеви блюда (15 на 100 mm), съдържащи 20 ml КДА. Културата е отглеждана при +20°C, докато мицелът се приближи до ръба на блюдото; след това съдържанието на едно блюдо се нарязва и се разпределя върху единичен непрекъснат слой автоклавирани дискове от моркови. Инокулираните дискове от моркови са покривани със стерилизирано алуминиево фолио и са инкубирани при +20-23°C.

Склероциите се събират 4 седмици след посяването на културите чрез изливане на мицела, склероциите и остатъците от морковена тъкан в почвено сито № 14 (12 меша) и промиване с чешмяна вода за отделяне на склероциите от другите материали. Получените склероции се сушат върху хартиени листове за една нощ при +22°C ± 2°C и се съхраняват в найлонови торбички при +4°C, докато се използват.

2.2.6. Производство на аскоспори

Склероциите, произведени върху автоклавирани дискове от моркови, се стерилизират повърхностно в 95% етанол за 90 s, както е описано от Huang и др. (2007) и се изсушават на открито за 15 min. Двадесет склероция се поставят в стъклени петриеви блюда с диаметър 9 cm, съдържащи 15 ml стерилна дестилирана вода. Чашите се увиват с парафилм и престояват при + 15-20°C на естествена светлина в продължение на 14h, последвано от 10h тъмнина (режим нощ/ден).

2.2.7. Събиране на аскоспори

Аскоспорите са събирани от зрели апотеции директно върху нуклеопорни поликарбонатни филтри (тип GS, 47 μm; Thomas Scientific, Swedesboro, NJ), както е описано от Hunter et al. (1984) и Steadman (1979). Филтрите с аскоспори са съхранявани в стъклени буркани, съдържащи калциев двухлорид ($CaCl_2$) като десикант при +4°C до момента на използване.

2.2.8. Проучване на способността на аскоспорите към заразяване

Способността на аскоспорите към заразяване е проучена по методиката описана от (Sedun et Brown, 1987) Нуклеопорни филтри, съдържащи аскоспори на изолат Ss1 от *Sclerotinia sclerotiorum*, са промивани с дестилирана вода и концентрацията на аскоспори е коригирана до 5×10^4 CFU/ml. Суспензията е използвана за нанасяне върху 24 осемседмични растения от пипер чрез малка ръчна пръскачка. Контролните растения са третирани само с дестилирана вода.

Дванадесет и четири растения от сорт Пирует F1 (8 х 3 повторения), подредени в тарина с диаметър на гнездото Ф 6,5 cm са поставяни в лабораторни условия при поддържане на средна температура на въздуха +15-20°C и естествена светлина. Относителната влажност на въздуха е поддържана до стойности от 95% до 100% чрез редовно поливане и покриване на растенията с полиетилен (влажна камера). Отчитане броя на заразените и загинали растения е правено в продължение на 15 дни, започвайки 4 дни след инокулацията. Честотата на проява на болестта е изчислена като процент от общия брой болни и загинали растения 15 дни след инокулацията. За контрола служеха обработените с чиста вода растения.

2.3. Проучване на имунната реакция на сортове пипер към заразяване с патогена *Sclerotinia sclerotiorum*

Производство на разсад

Семена от *Capsicum annuum,* сортове Пирует F1, Ивайловска капия, Сиврия и Джулюнска шипка са засявани в оранжерия в 28-клетъчни черни пластмасови табли с размер 53/34/7 cm, запълнени с торфо-перлитна смес, приготвена по следната рецепта: 70% торф + 30% перлит.

2.3.1. Проучване имунната реакция на различни сортове пипер към заразяване с патогена *Sclerotinia sclerotiorum* по листен метод

Растителен материал

Използвани са млади растения във фаза 3–4 листа от сортовете Пирует F1, Ивайловска капия, Сиврия и Джулюнска шипка. Приложен е метод, описан от Guimaraes et al.(2022). За изкуствено заразяване са използвани листа от различни нива на пет растения. Тестираните листа са наранявани със стерилна игла чрез убождане. Върху горната повърхност на всеки лист са нанасяни блокчета с чиста 7-дневна култура от *S. sclerotiorum* с диаметър 8 mm, произведена върху стандартна КДА среда. За контрола са използвани растения, върху листата на които са нанасяни стерилни блокчета от КДА. Инокулираните листа са съхранявани във влажна камера при +21°C. Опитът е изведен в три повторения, по 5 листа в едно повторение от всеки сорт: (5x3). Измервани са: инкубационният период (ден на поява на признаците на заразяване), динамиката на развитие на гъбата ежедневно до 10 ден от нанасяне на инокулума (cm). За отчитане на болестта е използвана 0-4 скала на Andrade et al. (2016), където 0 означава листа без симптоми; 1 – начало на образуване на малки кафяви петна на мястото на нараняване; 2 –добре изразени кафяви петна; 3 – петна с диаметър (d) = 2-3 cm; 4 –c (d) > 3 cm. Въз основа на резултата е установена скала за оценка на заболяването (Степен на развитие) от 0 до 4: 0 = липса на симптоми; 1 = симптоми с <10% честота на заболяването; 2 = симптоми с 11–20%; 3 = симптоми с 21 –40%; 4 = симптоми с 41–100 % честота на заболяването. Сортовете със средна скала за оценка на заболяването <1 бяха оценени като устойчиви (У), 1–2 като умерено устойчиви (УУ); 2–3 като възприемчиви (В); и 4 като силно възприемчиви (СВ).

2.3.2. Проучване имунната реакция на различни сортове пипер към *Sclerotinia sclerotiorum* чрез заразяване на зрели откъснати плодове

Откъснати здрави плодове от пипер в технологична и ботаническа зрялост са подготвени чрез повърхностно стерилизиране с 0,05% NaClO и трикратно изплакване със стерилна дестилирана вода, след което са оставени да изсъхнат на въздух за няколко минути. Така подготвените плодове са наранени чрез убождане и инокулирани с агарови дискове (d = 8 mm), съдържащи мицел на изолат Ss1 от пиперово растение. За контрола са използвани стерилни дискове от КДА. Всички плодове са поставени за 14 дни при 95-100% относителна влажност и +21ºC. В експеримента са включени шест сорта *C. annuum*, от които пет български (Сиврия, Ивайловска капия, Бяла капия, Български ратунд, Джулюнска шипка) и Пирует F1 на фирма Syngenta. Опитът е проведен

двукратно в три повторения, всяко от които се състои от три плода. Направена е реизолация на патогена и получените култури са сравнени с изходната.

Измервани са: инкубационен период (ден на поява на признаци на заразяване), динамика на развитие на гъбата ежедневно до 10-я ден от нанасяне на инокулума - диаметър на некроза (cm), начало на образуване на склероции (ден), брой склероции в един плод (n).

2.4. Изолиране и идентифициране на почвени и ризосферни гъби и бактерии, потенциални антагонисти на *Sclerotinia sclerotiorum*

2.4.1. Изолиране на почвени гъби и бактерии

Изолирането на гъби от почвата е извършвано по метода на разреждане на почвата по Звягинцев (Zvyagincev, 1991) и засяване на почвена суспензия от три разреждания (1: 100, 1: 1000, 1: 10000) върху хранителни среди. Приготвените проби се прехвърлят в петриеви блюда със среда на Чапек (гъби) и Сабуро (бактерии). Опитът е изведен в пет повторения. Културите се инкубират в термостат при 25±2°C за 5-14 дни. Порасналите колонии се пресяват в епруветка върху наклонена хранителна среда.

2.4.2. Идентифициране на таксономичната принадлежност на изолатите

Количественият и качественият анализ на микобиотата е извършен чрез визуална диагностика на опитните петриеви блюда (3-14-и ден от инкубацията), последвана от микроскопия и идентификация с помощта на оптичен микроскоп Carl Zeiss Laboval с видеоокуляр DCM 310 SCOPE. Идентифицирането на таксономичната принадлежност на гъбите е направено според културалните и морфологични признаци с помощта на определители и микологични атласи (Христов, 1972; Билай, 1977; Пидопличко, 1977; Sammuel, 1998; Sutton, 2001).

2.4.3. Проучване антагонистичната активност на изолатите в *in vitro* условия

2.4.3.1. Проучване антагонистичната активност на гъбни изолати в *in vitro* условия

Тест-микроорганизми. В настоящото изследване бяха използвани колекционни (колекция ИЗК „Марица“) вирулентни гъбни патогени *Sclerotinia sclerotiorum, Botrytis cinerea, Rhizoctonia solani, Verticillium dahliae, Fusarium capsici, Phytophthora capsici, Pythium debaryanum,* изолирани от болни тъкани на растения от пипер.

Скрининг за антигъбна активност срещу фитопатогени. Антимикробната активност на изолираните щамове гъби е определена по метода на срещуположните колонии по Waterhouse (Чумаков, 1976) чрез измерване на големината на получените стерилни зони в mm. В центъра на петриево блюдо върху КДА на разстояние 2 cm се поставят 7-дневни чисти култури от щама антагонист и щама патоген. Петриевите блюда се поставят в термостат при температура + 23-25^{o} C за 10 дни. Измерва се радиалното нарастване на микроорганизмите в mm и стерилната зона в mm всеки ден до достигане на колонията до ръба на блюдото. Данните от последното измерване са използвани за изчисляване на инхибирането на растежа на гъбния мицел в отделните варианти спрямо контролите по формулата на Abbott (1925):

$$GI = 100 - \frac{D\ x\ 100}{C}\%$$

GI - Инхибиране на растежа на мицела на патогена (%); *D* - Диаметър на гъбната колония на патогена, инокулиран срещу антагонистична гъба (mm); *C* - Диаметър на гъбната колония в контролата (mm).

2.4.3.2. Проучване антагонистичната активност на бактерийни изолати в *in vitro* условия

Тест-микроорганизми. Антагонистичната активност на изпитваните бактерии е проучена спрямо гъбите, избрани като прицелни фитопатогени в раздел 2.4.3.1.

Използвани са бактериите *Bacillus subtillis* (синоними *Bacillus atrophaeus, Bacillus globigii*) с произход от Русия с титър на работният разтвор 1.10^{10} CFU/ml, *Enterobacter*

cloaceae 1.10^{10} CFU/ml от колекцията на бактерии от Националната Банка за микроорганизми (колекция антагонисти от резервите на ИЗК „Марица“) и новоизолирана бактерия (B1) с титър на работният разтвор 1.10^{10} CFU/ml.

Потенциалният инхибиращ ефект на изпитваните бактериални щамове върху растежа на мицела на прицелните гъбни патогени е проследяван в лабораторни условия. Използван е *in vitro* метод, описан от Dhingra и Sinclair (1995), и Hameeda et al. (2006). Втечнен (+42ºC) КДА е разливан в стерилни петриеви блюда с диаметър 90 mm (x 20 ml агарова среда във всяко блюдо) и оставян на стайна температура в продължение на 24h. Върху хранителната среда в права линия по диагонала на всяко блюдо е нанасяна чиста култура от отделен бактериален вид с помощта на стерилно йозе. Инокулираните петриеви блюда са инкубирани в продължение на 72h на тъмно при +26ºC. 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, са 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) е залаган в четири повторения (петриеви блюда). За контроли служеха идентично подготвени експериментални единици гъбни посявки в блюда с разлят КДА, без предварително развита бактерийна култура. Инокулираните с патоген блюда са инкубирани при +26ºC на тъмно. Диаметърът на формираните гъбни колонии (без размера на агаровите блокчета) е измерван на трети, пети, седми и десети ден след посявката. Данните от последното измерване са използвани за изчисляване на инхибирането на растежа на гъбния мицел в отделните варианти спрямо контролите по формулата на Abbott (1925):

$$GI = 100 - \frac{D\ x\ 100}{C}\%$$

GI - Инхибиране на растежа на мицела на патогена (%); *D* - Диаметър на гъбната колония на патогена, инокулиран срещу антагонистична гъба (mm); *C* - Диаметър на гъбната колония в контролата (mm).

За последващата експериментална работа са избрани един изолат *Trichoderma* sp. и три бактерии – една, изолирана от почвената проба (B1), и две (*Enterobacter cloaceae, Bacillus subtillis*) - от колекцията на антагонисти в лабораторията по фитопатология.

2.5. Производство на експериментални партиди биопрепарат на база щам антагонист *Trichoderma viride* в течна хранителна среда (дълбочинно култивиране)

За извеждане на съдовите и почвените опити са произведени експериментални партиди биопрепарат на база отбран щам антагонист в течна хранителна среда (дълбочинно култивиране) по подобрена методика на Коломбет (Коломбет, 2001), описана по-долу:

2.5.1. Щам-продуцент

За провеждане на изследванията е използван щам *Trichoderma*, изолиран от почвените проби, взети от ризосферата на болни от бяло гниене растения пипер и идентифициран като *Trihoderma viride,* щам Trv1.

2.5.2. Посевна и ферментационна хранителни среди за култивиране на изследвания щам-продуцент

Чиста култура от *Trihoderma viride,* щам Trv1 се отглеждаше върху картофено-декстрозен агар в течение на 7 дни при +28ºC до образуване на обилна конидиална покривка. За ферментационна хранителна среда е използвана течна подобрена среда на Чапек с добавка на пшеничени трици (полусинтетична хранителна среда).

Състав на хранителната среда, g/L стерилна вода: захароза, 30.0; $NaNO_3$, 9; KH_2PO_4, 1.0; $MgSO_47H_2O$, 0.5; $FeSO_47H_2O$, 0.01; KCL, 0.5; пшеничени трици, 50.

2.5.3. Производство на посевен материал

Вегетативен посевен материал от *Trihoderma viride* се отглеждаше върху течна полусинтетична хранителна среда, при температура +28ºС в течение на 96h.

2.5.4. Ферментация

Ферментацията се извършваше в клатачка-инкубатор Inkubations- Schüttelschrank BS-4 B.Braun (120 rpm) при температура +28ºС в течение на 96h в колби с течна полусинтетична хранителна среда, съдържаща 2,5 % от посевния материал.

Титърът на фиалоконидиите и хламидоспорите от *Trihoderma viride* се определяше след преключване на ферментацията в камера на Fuchs § Rosenthal.

Проследявано е натрупването на биомасата по варианти в g/24h. За целта бе използвана програма за центрифугиране със скорост 5000 rpm за 10 min, позволяваща отделянето на течната културална среда от биомасата (мицел и спори).

2.6. Проучване влиянието от приложението на антагонисти, биологични и органични продукти върху растежните прояви, добива и продуктивността при пипер

2.6.1. Влияние на предсеитбената обработка на семена с биологични и органични продукти върху кълняемата енергия и процента на покълване при пипер в лабораторни условия

За извеждане на опита са използвани семена от сорт Куртовска капия. Семената са накисвани за 4h във водни разтвори от биологичните препарати „Триходермин“ (*Trichoderma viride)* с титър 1.10^8 CFU/ml, „Екстрасол“ (*Bacillus subtilis)* с титър 1.10^{10} CFU/ml, суспензия от бактерията *Enterobacter cloaceae* с титър 1.10^{10} CFU/ml и „Хумустим“ в следните концентрации: “Триходермин”: 1 ml/1L вода; „Екстрасол“: 1 ml/1L вода; *Enterobacter cloaceae*: 1 ml/1L вода; „Хумустим“: 0,5 ml/1L вода.

Всеки вариант съдържаше по 100 семена (20 семена в петриево блюдо, в 5 повторения). Разходна норма на водните разтвори - по 100 ml на 100 броя семена. След накисване семената са поставяни в чаши Петри при +23ºС без светлина в термостат. Контролните семена са накисвани във вода. Определяна е кълняемата енергия и общият процент на покълване по варианти. Кълняемата енергия и общият процент на покълване са определяни на 15-ти, 18-ти и 23-ти ден от залагане на опита с използване на формулата:

Процент на покълване: $B = \frac{n\ x\ 100}{N}$ (%), където n – покълнали семена, брой; N – общ брой семена във варианта, брой.

Енергия на покълване – масово покълване на семената (над 50%): $E = \frac{n\ x\ 100}{N}$ %, където n – брой покълнали семена в деня на масово покълване (над 50%) в контролния вариант, брой; N – общ брой семена във варианта, брой.

2.6.2. Влияние на биологични и органични продукти върху процента на поникване, биометричните показатели, протичането на фенофазите и продуктивността при пипер в оранжерийни условия

Производство на разсад

Сеитба. Семена от пипер сорт Пирует F1 са накисвани за 4h във водни разтвори от биологичните препарати „Триходермин“ (*Trichoderma viride)*, „Екстрасол“ (*Bacillus subtilis)*, суспензия от бактерията *Enterobacter cloaceae* и „Хумустим“ в следните концентрации: „Екстрасол“: 1 ml/1L вода; *Enterobacter cloaceae*: 1 ml/1L вода; „Хумустим“: 0,5 ml/1L вода; “Триходермин”: 1 ml/1L вода. Брой на експерименталните семена по вариантите: 56 във всеки вариант.

Семената са засявани в 28-клетъчни черни пластмасови табли, запълнени с торфо-перлитна смес, приготвена по следната рецепта: 70% торф + 30% перлит.

Отчетени са кълняема енергия и общ процент на поникване по горе описаната методика (4.6.1). Направени са измервания на биометричните показатели на разсада:

височина на стъблото (cm), диаметър на стъблото (mm), маса на стъблото (g/растение), маса на корена (g/растение), маса на листа (g/растение), обща маса на растение (g/растение).

Разсаждане на постоянно място

Растенията във фаза бутонизация са изнесени на постоянно място в стоманено-стъклена оранжерия по следната схема на разсаждане: 90/60/40 cm.

Варианти на опита

1. Контрола 1 – без внасяне на антагонисти и органични продукти.
2. Контрола 2 – еднократно поливане на растенията с „Топсин М“ при разходна норма на работния разтвор 10 ml/10 L вода за 20 m^2 след разсаждане на растенията на постоянно място.
3. Пръскане с „Оптисил“: 0,5 ml/10 L вода два пъти: след разсаждане на растенията на постоянно място и по време на масов цъфтеж.
4. Третиране на семена* и двукратно поливане с разтвор от „Хумустим“ при разходна норма 5 ml/10 L вода за 20 m^2 – след изнасяне на растенията на постоянно място и по време на масов цъфтеж.
5. Третиране на семена* и внасяне на „Триходермин“ (титър 1.10^8 CFU/ml), при разходна норма на работния разтвор 10 ml/10 L вода за 20 m^2 по време на разсаждане на растенията на постоянно място.
6. Третиране на семена* и двукратно поливане с “Екстрасол” (титър 1.10^{10} CFU/ml) при разходна норма на работния разтвор 10 ml/10 L вода за 20 m^2 – след изнасяне на растенията на постоянно място и по време на масов цъфтеж.
7. Третиране на семена* и двукратно поливане с бактериален препарат на база *Enterobacter cloaceae* (титър 1.10^8 CFU/ml) при разходна норма на работния разтвор: 10 ml/10 L вода за 20 m^2 - след изнасяне на растенията на постоянно място и по време на масов цъфтеж.

Третиране на семена* - за разсаждане е използван разсад от третираните по горе посочената методика семена. Брой растения по варианти – 15 (пет растения в три повторения).

Съдържанието на използваните субстанции е подробно описано в раздел «Материал и методи» от дисертационния труд.

Извършени са всички необходими агротехнически мероприятия по време на вегетацията в съответствие със стандартната технология за отглеждане (подробно описана в дисертационния труд). С цел отчитане на реалните резултати относно ефикасността на приложените биологични и органични продукти спрямо имунната реакция на растенията към заразяване с болести, фунгицидни третирания, с изключение на една от контролите, не са провеждани.

Направени са: измервания на биометричните показатели на вегетиращи растения - височина на стъбло (cm), диаметър на стъбло (mm), маса на стъбло (g/растение), маса на корен (g/растение), маса на листа (g/растение), обща маса на растение (g/растение); фенологични наблюдения – начало на цъфтеж (фаза на разсаждане на постоянно място), плододаване, общ период на беритба на плодове (дни) и отчитания на показатели: продуктивност – брой плодове, средна маса на плода (g); ран добив от първите пет беритби (kg/растение); ефект от приложение на биологични и органични продукти - по Abbott (Abbott, J., 1925). Математическа обработка на резултатите - по Duncan (Димова и Маринков, 1999). Показателят „ран добив“ е изчислен на база продуктивността на едно растение, получена в опита, умножена върху стандартен препоръчителен брой растения на декар (2500 растения на декар).

2.7. Проучване влиянието от приложението на антагонисти, биологични и органични продукти върху имунната реакция на растения и биологичната активност на почвата при пипер

2.7.1. Инокулация на растения по метода на декапитация

Методът осигурява постоянно количество инокулум от *Sclerotinia sclerotiorum* за всяко експериментално растение (описан е от Wenjing Ning et al., 2021). За целта изолатът Ss1 на *Sclerotinia sclerotiorum* е отглеждан върху КДА в продължение на 2 дни при +20°C; след което от колонията на активно растящ мицел на гъбата са изрязвани блокчета с диаметър 1cm за заразяване на растенията. Всяко блокче е нанасяно върху декапитираните стъбла на 8-седмични пиперови растения и те са увивани с влажни памучни парчета и фолио (по 10 растения във вариант). За контрола служеха декапитираните растения, върху които са нанасяни стерилни КДА дискове без патогена. Отчитането на процента на заразените растения започваше 5 дни след инокулацията. Експеримент е изведен в две повторения. Отчитана е дължина на некрозите при декапитираните растения в mm до 10-я ден от зараяването включително. Индексът на агрессивността на изолата е изчислен по формулата:

$$X = \sum \frac{(Ii \cdot Di)}{n}$$

Ii – средна дължина на некроза (mm); *Di* – средна интензивност на мицелообразуване (бал); *n* – количество заразени стъбла (брой) (Лаврова и др., 2003).

2.7.2. Проучване влиянието от приложението на антагонисти, биологични и органични продукти върху биологичната активност на почвата при пипер

Извършван е микробиологичен анализ на почвените проби, взети от всеки вариант в началото, средата и края на вегетационния период (след прибиране на реколтата). Биологичната активност на почвата е определена по общоприетия микробиологичен метод за култивиране на разредени водни почвени разтвори върху твърди хранителни среди (Zvyagincev,1991), таксономичната принадлежност на гъбите – по определителите на Пидопличко (1974). Отбор на почвените проби е направен по следната методика: проби за анализ са взимани от пет места на принципа на „плик“ от дълбочина 0-20 cm (Borovikova, 2003), след което са смесвани до получаване на обща проба. За анализ на числеността на почвените микроорганизми са използвани проби, изсушени до 60% ППВ. Водни разтвори от почвените проби с разреждане 1.10^3 са посявани върху агаризирани хранителни среди – КДА, Чапек, Сабуро в петриеви чаши и са инкубирани при температура + 23°C в течение 10 дни в термостат. Отчитани са брой бактерийни колонии - на трети ден, актиномицети и гъби - от трети до десети ден след посявката, включително. Микробиологичен анализ и диагностика на гъбите са правени по морфологичните признаци след формиране на колониите. Броят микроорганизми (thousand/g почва) бе определен чрез изброяване на колониите от бактерии, актиномицети и гъби върху отделните сектори.

$$X = \frac{A\ x\ D^2\ x\ 20}{d\ x\ 5}$$

X- количество на гъбни колонии в 1 g почва; *A* - брой колонии върху 5 агарови кръгчета; *D*- диаметър на петриево блюдо; *d*- диаметър на агарово кръгче.

Достоверната разлика между вариантите е установявана с помощта на критерия на Стюдънт при t = 3,2 (Ивантер, 2010). Направени са отчитания на обща микробиологична активност на почвата - CFU/g, брой гъбни колонии в 1 g суха почва – процент (%).

3. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

3.1. Диагностика на болести по пипер в култивационни съоръжения. Определяне на таксономичната принадлежност на патогените

3.1.1. Списък на болестите по пипера в култивационни съоръжения през периода на мониторинга

Върху събраната през периода 2020-2022 г. информация относно фитосанитарното състояние на пиперовите посеви в оранжериите на ИЗК „Марица“, Пловдив; Брестник, Пловдивско; Три водици, Пазарджик; Мало Конаре, Пазарджик; Куртово Конаре, Пазарджик е направен списък на болести по пипера, сред които бялото гниене заема значително място.

3.1.2. Таксономична принадлежност на изолираните патогени

В резултат на проведения през периода на мониторинга биологичен анализ на растителните проби, взети от болни растения от оранжериите (поставяне в ексикатор и изолиране в чиста култура) и последващото микроскопиране на биологичния материал са определени следните причинители на болести по пипера: 1. Изолации от млади растения във фаза 3–4 двойки същински листа, които след микроскопиране са идентифицирани като *Pythium debaryanum, Rhizoctonia solani, Fusarium oxysporum.*, 2. Изолации от растения след разсаждане на постоянно място: *Sclerotinia sclerotiorum* (сухо гниене по стъбла), *Botrytis cinerea* (гниене по плодове и некрози по стъбла), *Verticillium dahliae* (увяхване и запушване на проводящата система), *Alternaria capsica* (петна по листа, гниене по плодове и семена).

Установено е, че бялото гниене по пипера редовно се среща в оранжерийни условия в България. По тази причина за основен обект на проучване от изолираните през периода 2020-2022 година фитопатогени е избрана гъбата *Sclerotinia sclerotiorum*, като най-слабо проучена в условията на България при културата пипер, отглеждан в култивационни съоръжения.

3.1.3. Описание на симптомите на заболяването склеротийно стъблено и плодово гниене по пипера *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary

Заболяването се появява основно като стъблено гниене върху цъфтящи растения и гниене по плодовете. Най-честите симптоми са воднисти петна по плодовете, стъблата, листата или дръжките, които обикновено са с неправилна форма. Некрозите се уголемяват и засегнатата област се покрива с памуковиден мицел от гъбата. Инфекцията се разпространява и растението се превръща в мека, лигава водниста маса. Върху мицела се образуват множество склероции, които са диагностична характеристика на гъбата *Sclerotinia sclerotiorum*. Патогенът може да причинява и сухи некрози по стъблата или клоните, с добре видима граница между здрава и болна тъкан. Некрозите са с добре изразена концентричност и след време се уголемяват и обгръщат част от растението, причинявайки пожълтяване, покафеняване и загиване им (Фигура 1A,B). Концентричността на некрозите, причинени от бяло гниене, е симптом, характерен само за културата пипер. Тези симптоми не са описани от други автори. Склероциите се образуват в кухините на стъблото, кухините на плодовете или между тъканите (Фигура 1C,D).



A **B** **C** **D**

Фигура 1A-B: Симптоми на бяло гниене *Sclerotinia sclerotiorum* по млади растения пипер. На снимката се вижда концентричната структура на некрозата **C-D**: Склероции

на *Sclerotinia sclerotiorum* в кухините на стъбло на пипер, мицел и склероции по стъблото на пъпеш (изолация от оранжерия с. Мало Конаре)

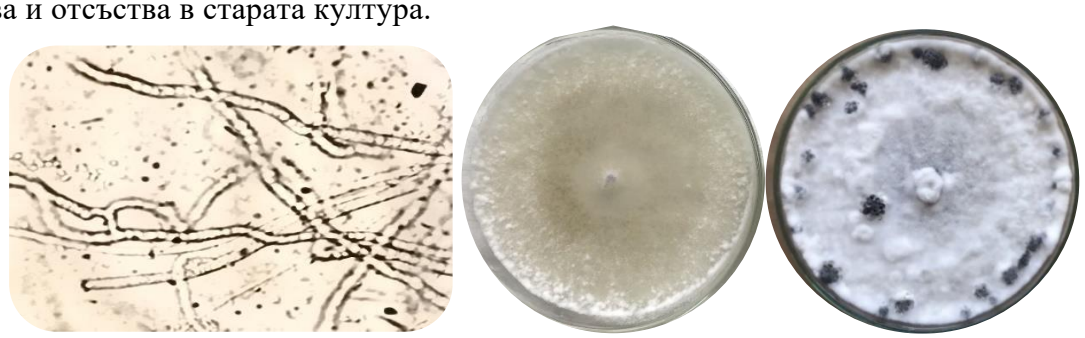
3.1.4. Тест за доказване на патогенността на изолираните щамове

Патогенността на изолатите е доказана чрез изкуствено заразяване на млади растения пипер във фаза 3-4 двойки същински листа с чисти култури на изолираните гъби. Три седмици след заразяване растенията развиват симптоми на болестите, причинени от почвените патогени – увяхване, зажълтяване и окапване на листата. След изкореняване и измиване на растенията добре се вижда, че корените на заразените растения са кафяви на цвят, с признаци на гниене. Биологичният и микроскопски анализи на болните тъкани след престой във влажна камера потвърждават таксономичната принадлежност на изолираните гъби. Патогенността на гъбата *Sclerotinia sclerotiorum* се доказа чрез заразяване на растенията по метода на декапитация, в резултат на който върху централното стъбло на растенията се получават нарастващи с времето лезии с налеп от мицел и склероции.

3.2. Проучване на биологията на патогена *Sclerotinia sclerotiorum*

3.2.1. Културални признаци на изолата *Sclerotinia sclerotiorum* Ss1

В началото на своето развитие мицелът на гъбата е визуално слабо изразен, паяжиновиден. След време започва обилно дихотомично разклоняване на първичната хифа, както е описано от Willets и Wong (1971) и се появява ясно различим, отначало бял плътен, впоследствие сивеещ мицел. Обратната страна на колонията върху КДА е бяла, върху соево - декстрозен агар – тъмно-жълтеникава (Фигура 2). След узряване на склероциите, се появява гнилостна миризма. Върху КДА тя е по-слаба, върху естествени субстрати – по-изразена. След пълното узряване на склероциите, миризмата отслабва и отсъства в старата култура.



A **B** **C**

Фигура 2. A - Зърнеста структура на мицела на *S. sclerotiorum.* **B** - бял плътен, сивеещ мицел, **C** – склероции на патогена върху КДА

3.2.2. Изследване на влиянието на източници на въглехидрати върху нарастването на мицела на *Sclerotinia sclerotiorum* при различни режими на температура и светлина

Установено е, че скоростта на растеж на мицела на Ss1 зависи от състава на хранителната среда, режима на температура и светлина. Диаметърът на колонията на гъбата три дни след инкубиране върху среда с високо съдържание на декстроза е по-голям, в сравнение с другите варианти (Таблица 1). Нарастването на мицела в условия на естествена светлина и температурен режим +19-21^{o}C е 4,6 mm/24h върху среда с 1% съдържание на декстроза и 5,6 mm/24h – с 2% декстроза. В нашия опит повишаването на температурата на инкубация на Ss1 от +23^{o}C до +25^{o}C в условия без светлина не се отразява значително върху скоростта на растежа на мицела. При по-ниски температурни стойности на инкубация, се проследява тенденция към по-бърз растеж на колонията

върху среда с по-голямо съдържание на декстроза – около 6,5 mm върху среда с 1% декстроза и 7,5 mm/24h – с 2%.

Таблица 1. Нарастване на колонията на *S. sclerotiorum* върху КДА с различно съдържание на декстроза при различни режими на температура и светлина

Съдържание на декстроза в КДА, g/L	Нарастване на колония, mm/24h на 3-ти ден		
	Естествена светлина	Без светлина	
	+19 - 21ºC	+23ºC	+25ºC
0	2.85±0.1	4.36±0.1	4.36±0.1
10	4.60±0.2	6.45±0.1	6.66±0.1
20	5.61±0.1	7.17±0.2	7.90±0.2

Установено е, че хранителната среда оказва влияние върху морфологията на колонията, скоростта на нарастване на мицела и формирането на склероции при *S. sclerotiorum*. Скоростта на нарастване на мицела на гъбата е най-висока върху полусинтетични среди, съдържащи естествени компоненти. На трети ден от посявката диаметърът на колонията на Ss1 е 44-46 mm върху СДА и МПЕ агар , 20 mm - върху 1% и 2% КДА и 32,5 mm - върху стерилни ечемични зърна. В тези варианти на петия ден от отчитането мицелът на гъбата заема цялата повърхност на хранителната среда, а във вариантите с 1% и 2% КДА – на 6-ти ден (Таблица 2).

Таблица 2. Нарастване на диаметъра на колонията на *S. sclerotiorum* върху хранителни среди с различен състав и съдържание на декстроза в термостат без светлина при температура +23ºC

Среда/съдържание на декстроза, g/L	Диаметър на колонията (mm) на 3, 5 и 6-ти ден			Нарастване на колонията, mm/24h
	3-ти	5-ти	6-ти ден	на 3-ти ден
КДА – 0	13,68	41,67	56,67	4,36
КДА – 10	19,58	80,41	90,00	6,45
КДА – 20	21,50	82,50	90,00	7,17
СДА – 20	43,75	90,00	90,00	14,58
МПЕ -без декстроза	46,25	90,00	90,00	15,42
Ечемичени зърна - без декстроза	32,50	90,00	90,00	10,83

3.2.3. Динамика на развитие на мицела и формиране на склероции

Морфологията на колониалната покривка на гъбата се променя в динамика по дни и има свои особености върху различните хранителни среди.

На трети ден от посявката върху ечемичени зърна мицелът е обилен и плътен, върху КДА 1% и КДА 2% гъбата образува слаб и нежен мицел.

На пети ден върху СДА се формира обилен, плътен мицел с тенденция към сгъстяване и формиране на склероции; върху МПЕ мицелът е нежен и рехав, без зачатъци на склероции. Във варианта с ечемичени зърна мицелът дифузно се разпространява из цялата повърхност на хранителния субстрат, а в средата на петриевото блюдо има добре развит плътен мицел, върху който се образуват едри черни склероции.

На шести ден върху СДА се формират дребни до средни по размер склероции, а върху МПЕ се наблюдава сгъстяване на мицела по периферията на колонията.

На седми ден върху КДА 1% се отчита масово сгъстяване на мицела, а върху КДА 2% започва формиране на първите склероции. Във вариантите СДА и МПЕ започва процес на обилно формиране на склероции от периферията към центъра на колонията. Върху ечемичените зърна гъбата масово образува едри черни склероции. Масово формиране на склероции от различни по размер фракции се наблюдава върху всички хранителни среди на 17-ти ден от инкубиране. В зависимост от хранителната среда, размерът на склероциите силно варира: върху КДА 1% се формира дребна и средна, по-рядко едра фракция склероции; върху хранителните среди КДА 2%, СДА и МПЕ се отчита масово формиране на едри склероции. Върху ечемичените зърна се формират най-едрите склероции, които заемат цялата повърхност и вътрешността на субстрата.

3.2.4. Натрупване на биомаса на гъбата в течна хранителна среда

Един от показателите на зависимост на растежа на гъбата от количеството на въглехидрати е натрупването на биомаса на мицела от тридневно култивиране в течна хранителна среда (Таблица 3).

Таблица 3. Натрупване на биомаса на *S. sclerotiorum* в течни хранителни среди при инкубация в продължение на 72h и +23ºC

№	Течна хранителна среда	Биомаса в 100 ml среда, g
1	КС без декстроза	1,060
2	КДС 1% декстроза	1,161
3	КДС 2% декстроза	1,191
4	Чапек 3% декстроза	1,241
5	Соево-декстрозна среда (СДС)	6,150

Центрофугиране при 5000 (rpm), температура +3ºC, експозиция 10 min

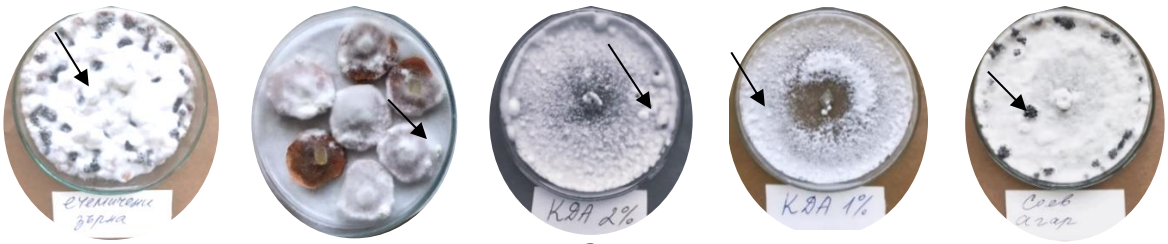
При липса на декстроза в хранителната среда КС масата на мицела е по-малка, в сравнение с КДС с 1% и КДС с 2% съдържание на декстроза. За да се избере хранителна среда, която е най-благоприятна за натрупване на мицелна маса, са тествани среда на Чапек и соево -декстрозна среда СДС. При отглеждане на гъбата в стандартна среда на Чапек е отбелязан слаб растеж на мицела - 1,241 g/100 ml среда, докато при култивиране на гъбата върху СДС натрупването на биомаса е значително - 6,15 g/100 ml среда, което означава, че тази среда е най-благоприятна за развитието на *S. sclerotiorum*.

3.2.5. Образуване на склероции върху различни хранителни среди

Прието е да се смята, че размерът и формата на склероциите варират в зависимост от условията на отглеждане и хранителната среда (Aytkhozhina, Kolokolova, 2001).

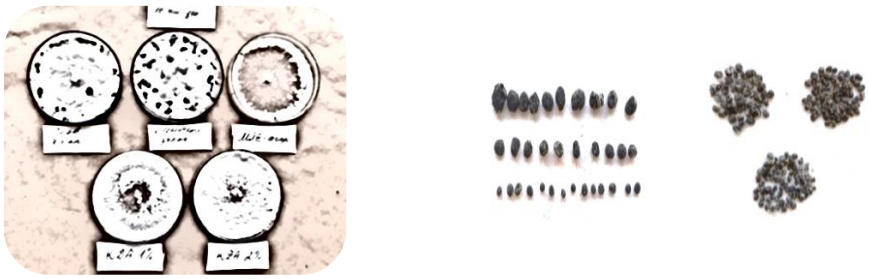
В нашия експеримент образуването на склероции върху твърди хранителни среди е регистрирано в следната последователност: върху ечемичени зърна – на пети, СДА – шести, 2% КДА и МПЕ – седми, 1% КДА- десети ден. По периферията на колонията на 1,0–1,5 cm от ръба на петриевото блюдо се образува пръстеновидна зона от бял мицел, който се сгъстява и върху него започват да се появяват зачатъци на склероции. Зачатъците постепенно се уголемяват, придобиват определена форма и, в зависимост от състава на хранителната среда, на пети - шести ден повърхността на бъдещия склероций се покрива с безцветни капчици влага. На следващия ден от момента на появата на ексудата склероциите започват да стават сиви, след това потъмняват и ексудатът започва постепенно да изчезва. Обвивката на склероция се уплътнява и на 10–14-ти ден от посявката на мицела се образуват склероции. На 14-ти ден от инокулацията склероциите

са с високо съдържание на влага. На 21-ви ден от засяването склероциите напълно узряват, лесно се отстраняват от повърхността на средата, в някои случаи се повдигат над субстрата. (Фигура 3).



Фигура 3. Развитие на склероции на *S. sclerotiorum* върху органични среди – 1) ечемичени зърна, 2) морковени дискове и среди с различно съдържание на декстроза: 3) картофено-декстрозен агар, 4) соево-декстрозен агар

Процесът на узряване на склероциите с малък размер е по-бърз и те узряват вече на осми - девети ден след инокулацията на средата. Описаният по-горе вид растеж и образуване на склероции е характерен за изолат Ss1, когато е инкубиран върху КДА среда. Определената закономерност в подреждането на склероциите при *S. sclerotiorum* се явява характерна особеност в развитието на гъбата (Kumar, 2015). В хода на работата са установени различни видове формиране на склероции: в концентрични кръгове върху СДА; на купчинки (ечемичени зърна, морковени дискове); на голямо разстояние – КДА 1%, МПЕ (Фигура 4А). Върху картофения агар без декстроза се наблюдава бавен растеж на слаб мицел, (приблизително 0,5–0,7 cm), склероциите се образуват по периферията на колонията не по-рано от 10-ти ден от инкубиране.



А **В**

Фигура 4. А. Типове формиране на склероции на *S. sclerotiorum.* В. Различни фракции на склероции на *S. sclerotiorum*

Когато гъбата се инкубира върху хранителната среда СДА, мицелът достига ръба на блюдото на 3-ти ден, след което започва процес на образуване на склероции. Склероциите, сформирани в средата на колонията са по-големи по размер от склероциите по периферията, но са представени в по-малък брой.

Форма на склероциите на *Sclerotinia sclerotiorum*

Склероциите имат разнообразна форма - отгоре-изпъкнала, отдолу- лещовидна или с леко вдлъбната основа; лещовидно-удължена (дължината леко надвишава ширината); удължена или закръглена (Фигура 4В). Склероциите се нареждат поединично или се сливат заедно и придобиват изпъкнала елипсоидна форма. Когато се отглеждат върху твърд субстрат (зърно от ечемик, пшеница), те запълват кухините между зърната, обгръщат зърната, сливат се и често имат неправилна форма.

Установена е ясна зависимост на масата на склероция от количеството въглехидрати. При отглеждане на гъбата върху КДА при всички режими на инкубация, масата на склероция се увеличава с увеличаване на съдържанието на декстроза в средата (Таблица 4).

Таблица 4. Влияние на хранителния субстрат и съдържанието на декстроза върху количеството и масата на склерониите на *S. sclerotiorum* на 21-и ден от залагане на опита

Среда	Съдържание на декстроза, g/L	Брой склерони	Процентно съдържание на склерони по фракции, %			Маса на склерони общо, mg	Маса на 1 склероний mg
			2-3 Mm	3-4 Mm	над 4 mm		
КДА 1%	10	19	10,5	42,1	47,4	424	22,32
КДА 2%	20	16	37,5	62,5	0,0	470	26,23
СДА	20	19	47,4	36,5	16,1	5310	27,66
МПЕ	0	14	100,0	0,0	0,0	80	5,71
Морковени дискове	0	38	31,6	15,8	52,6	1000	26,32
Ечемичени зърна	0	365	53,3	35,0	11,7	10730	29,38

3.2.6. Развитие на гъбата върху органични среди

Влиянието на хранителната среда върху масата на склерониите и техния размер се потвърждава при инкубация на гъбата върху органични среди. Върху морковени дискове склерониите достигат 0,9 cm (0,5-0,9 cm), а масата на 1 склероний – 26,32 mg. Тези показатели достигат още по - големи стойности, когато гъбата се отглежда върху ечемичени зърна-размерът на склероция е до 1 cm (0,5 - 1,0), а средното тегло е 29,38 mg. Общата маса на склерони в петриеви блюда с еднакво количество декстроза в хранителната среда е почти еднаква - около 424 mg при 10 g декстроза и около 470 mg при 20 g декстроза. Съответно, с увеличаване на броя на склерониите, масата им е по-ниска и обратно.

3.2.7. Влияние на температурата върху растежа на мицел и формирането на склерони на *Sclerotinia sclerotiorum*

Инкубирането на гъбата при последователно редуване на режим на тъмнина/светлина, при равни други условия, стимулира образуването на склерони (Таблица 5).

Таблица 5. Влияние на режими на температура и светлина върху формиране на склерони на *S. sclerotiorum* върху КДА с различно съдържание на декстроза

Съдържание на декстроза в КДА, g/L	Брой склерони, на 21-ви ден			
	Естествена светлина	Без светлина		Редуване ден/нощ
	+19ºC	+23ºC	+25ºC	+19ºC
0	12.5±0.41	14.3±0.10	10.6±0.42	23.7±0.66
10	21.9±1.43	22.3±0.42	17.6 ±1.57	31.9±1.31
20	29.8±3.6	24.3±0.26	21.7±0.66	58.3±2.2

Това показва, че процесът на образуване на склерони върху среда с достатъчно количество хранителни вещества може да продължи, докато запасът от хранителни

вещества в средата не бъде изчерпан. Най-голям брой склероции се наблюдават при редуващи се режими на осветление, а максималната маса на един склероций се наблюдава при отглеждане при +25°C в термостат. Масата на склероциите в петриево блюдо се увеличава върху органични среди и върху среди с голямо количество въглехидрати.

3.2.8. Развитие на гъбата върху естествени хранителни субстрати (от различни гостоприемници)

Динамиката на развитие на гъбата върху естествени хранителни среди – парченца от плодове на зеленчукови култури, които се отглеждат в оранжерийни условия, е показател за възприемчивостта им към нападение от патогена. На шести ден от заразяването върху култури от семейство *Solanaceae* - домати, пипер и патладжан и *Cucurbitaceae* - тиква и краставици, гъбата формира обилен мицел и склероции. Едри и обилни склероции се образуват върху заразени части от карфиол, семейство *Cruciferae, род Brassica.* Върху скилидите от чесън *Allium cepa* гъбата причинява дълбоко некротизиране на тъканите и формиране на нежен, бял мицел, без склероции. С най-слаба възприемчивост към *S. sclerotiorum* е целината *Apium graveolens*. На шести ден от заразяването върху инокулираните тъкани не бе констатирано формиране на мицел и склероции на патогена (Фигура 5).



Фигура 5. Развитие на склероции на *S. sclerotiorum* върху естествени хранителни субстрати: A - тиква, B - патладжан, C - домати и D - пипер

3.2.9. Проучване на жизнеността на склероциите. Образуване на апотеции и аскоспори

Жизненост на склероциите в зависимост от срока на съхранение и масата

Известно е, че жизнеспособността на склероциите на *S. sclerotiorum* се запазва няколко месеца (Cook et al., 1975; Пивень, 2001). В проведения експеримент, след пет месеца съхранение, повечето от склероциите остават жизнеспособни (Таблица 6).

Таблица 6. Жизненост на склероциите на *S. sclerotiorum* в зависимост от срока на съхранение и масата

Размер на склероция (cm)	Маса на склероция (mg), средно	Процент (%) на прораснали склероции след съхранение (месеци)						Загуба на жизненост, (%)
		0	1	2	3	4	6	
0.2–0.3* (дребни)	2.4–3.3/ 2.8±0.17	80.8± 5.1	85.0± 4.6	84.0± 5.2	76.0± 6.1	74.0± 6.3	55.5± 4.0	31,31
>0.3-0.4* (средни)	4.5–5.0/ 4.8±0.14	93.0± 2.6	89.0± 3.1	75.0± 4.4	84.0± 3.7	80.2± 3.9		13,76
>0.4-0.6* (едри)	5.2–9.2/ 7.1±0.7	91.7± 2.3	89.2± 2.6	86.7± 3.1	82.3± 3.0	86.7± 3.1	84.6± 3.0	7,74

*Хранителната среда КДА; 0 – стартерна жизненост на склероциите.

Установено е, че жизнеността на склероциите зависи от размера.

Способността за покълване при едрите склероции е по-висока. В края на периода на съхранение жизнеността на едрите склероции намалява приблизително с 8%, при склероциите средна фракция – с 14%, при дребните – с 30%. Това може да се обясни с ограниченото количество хранителни вещества в дребните склероции.

Образуване на апотеции

В резултат на проведените експерименти е установено, че апотециите на *S. sclerotiorum* се образуват върху склероциите четири седмици след инкубиране при +15-20°C, а зрелите апотеции – две седмици след това. Апотециите са светлокафяви, чинийковидни; асците са цилиндрични с удебеляване на върха, съдържат 8 овални или продълговато-овални безцветни аскоспори (Фигура 6).



Фигура 6. Горен ред: Склероции на *S. sclerotiorum*, зимуващи върху растителни остатъци - стъбло на пиперово растение (ноември). Покълващи склероции върху стъбло и почва (март-април). Долен ред: Формиране на чинийковидни апотеции (април-май). Асци и аскоспори (май)

Цикъл на развитие на причинителя на бяло гниене *Sclerotinia sclerotiorum* по пипер

При съхранение на склероции в естествени условия – в почва или растителни остатъци, жизнеспособността им зависи от факторите на околната среда: вид на почвата, дълбочина на залягане, температура, влажност и биологична активност на почвата, температурата на околната среда и влажност на склероциите (Cuk, 1979; Kohl, 2004; Ходенкова, 2017). В нашия екперимент при съхранение на склероциите върху заразени стъбла пипер и почва част от склероциите прорастват с образуване на пълноценни зрели апотеции, част - без да формират чинийковиден апотеций. Прорастването на склероциите е фиксирано през месеците март-април, формирането на зрели апотеции – април – май. Проучването на способността на гъбата *S. sclerotiorum* да заразява разсад пипер чрез аскоспори показа положителен резултат при повечето от инокулираните растения. На 15–21-ви ден от инокулацията в основата на младите растения се образуват хлътнали кафяви петна, растението изсъхва и загива. От 24 тестирани растения е констатирано заразяване в 19 случая (80%). Положителният резултат от експеримента за прорастване на склероции, формиране и узряване на апотеции с асци и аскоспори служи за доказателство, че в условията на България гъбата *S. sclerotiorum* може да заразява растенията чрез аскоспори през месеците април-май, който съвпада с фазата масов цъфтеж при пипера. Аскоспорите заразяват растенията по дифузен път и, по този начин, гъбата минава всички фази от онтогенезата си върху културата.

Обобщавайки получените данни за идентификация на гъбата по симптомите на заболяването, морфологията на изследвания щам на патогена върху хранителни среди, формиране на апотеции и асци с 8 аскоспори е установено, че изследваният щам Ss1 принадлежи към вида *S. sclerotiorum*.

В резултат на проведените изследвания е установено, че скоростта на растеж и масата на мицела на *S. sclerotiorum* се увеличава върху среда с високо съдържание на въглехидрати. Тя е най-висока върху среда, която включва соево брашно СДА. Същата закономерност важи и за образуването на склероции. Върху хранителни среди с високо съдържание на въглехидрати масово се образуват склероции с по-големи размери. Определената закономерност в подреждането на склероциите при *S. sclerotiorum* се явява характерна особеност в развитието на гъбата. По време на формирането склероциите образуват концентрични пръстени по повърхността на средата.

Най - добри показатели за растеж на мицела и образуване на склероции са постоянен режим на инкубация при температура +23-25^{o}C в термостат или при естествена светлина. При тези условия първоначалната култура се характеризира с бърз растеж върху хранителните среди и образува склероции (етап на покой) не в началото на растежа, което се наблюдава при бавно растящи колонии, а само при наличие на механично ограничение на растежа (ръба на петриевото блюдо).

3.3. Проучване на имунната реакция на сортове пипер към заразяване със *Sclerotinia sclerotiorum*

3.3.1. Проучване имунната реакция на различни сортове пипер към заразяване с *Sclerotinia sclerotiorum* по листен метод

Резултатите от експеримента показват, че сред изпитаните сортове пипер няма напълно имуни към патогена *S. sclerotiorum.*

При заразяване на растенията по листния метод е установена разлика в дължината на инкубационния период при различни сортове пипер (Таблица 7).

Таблица 7. Имунна реакция на сортове пипер към заразяване с патогена *S. sclerotiorum* (листен метод по Guimaraes et al., 2022)

Сорт	ИП (дни)	ПП в ден на отчитане (%)			Д (cm)	СРЗ (бал)	Степен на устойчивост на сорта
		4	5	6			
Пирует F1	4	8,88	31,11	31,11	1,46	3	В
Ивайловска капия	4	2,22	17,79	22,22	2,10	3	В
Джулюнска шипка	4	8,88	26,67	31,11	1,64	3	В
Сиврия	5	0,00	8,88	11,11	1,25	2	В

ИП- инкубационен период; ПП - процент на поява на заразяванията; Д - диаметър на некроза, (средно, cm); СРЗ - степен на развитие на заболяването по 0-4 скала (Andrade et al., 2016); Степен на устойчивост на сорта: сортовете със средна скала за оценка на заболяването <1 - устойчиви (У), 1–2 - умерено устойчиви (УУ); 2–3 - възприемчиви (В); и 4 - силно възприемчиви (СВ)

При сортовете Пирует F1, Джулюнска шипка и Ивайловска капия е отчетен инкубационен период четири дни, при сорт Сиврия – пет дни. Това не се отнася до показателя „честота на поява“ (Фигура 7). Процентът на заразените места беше изчислен, за да се оцени тежестта на заболяването шест дни след инокулацията.



Фигура 7. Развитие на некрози по листата на сортове пипер Джулюнска шипка, Пирует F1, Ивайловска капия и Сиврия на шести ден след заразяване с чиста култура от *S. sclerotiorum*

При сортовете Пирует F1 и Джулюнска шипка честота на поява на симптомите (некротични петна) прогресира от 8,88% на четвърти до 31,11% на шести ден от общия брой на заразяванията. При сорта Ивайловска капия този показател нараства от 2,22% до 22,22% на четвърти и шести дни от извършената инокулация. Относително слабо ниво на възприемчивост към заразяване с патогена е отчетено при сорт Сиврия. Инкубационният период на болестта при този сорт е пет дни, честотата на поява на заразяванията е 11,11% на шести ден. Спрямо изследванията на някои автори различията в сортовата реакция на пипера към заразяване с патогена *S. sclerotiorum* могат да се дължат на морфологичните особености на сортовете пипер и съдържанието на хитин в листата. Инфекциозният процес в растенията със завишено съдържание на хитин в листната маса протича по-бавно и има по-слаба проява (Yanar et Miller, 2003, McCaghey, 2017). Патогенът *S. sclerotiorum*, който се отнася към некротрофните гъби, по-бързо разлага клетъчните стени на растението с по-малко съдържание на хитин.

В резултат на проведения експеримент могат да се направят следните изводи:

1. Сортовете Ивайловска капия, Сиврия, Джулюнска шипка и Пирует F1 са възприемчиви към заразяване с причинителя на бяло гниене *S. sclerotiorum.*

2. Намерени са различия в имунната реакция на сортовете пипер към заразяване с *S. sclerotiorum.* С по-слаба имунна реакция са сортовете Пирует F1 и Джулюнска шипка. Инкубационният период на заболяването е четири дни, честотата на заразявания е 31%. С добра имунна реакция към заразяване са сортове Сиврия (инкубационният период на заболяването е 5 дни, честотата на заразявания – 11%) и Ивайловска капия (инкубационният период на заболяването е 4 дни, честотата на заразявания – 22%).

3.3.4. Проучване имунната реакция на различни сортове пипер към *Sclerotinia sclerotiorum* чрез заразяване на откъснати плодове

Резултатите от заразяването на плодовете от различните сортове пипер с патогена *S. sclerotiorum* потвърждават тези, получени от листния метод. Гъбата напада всички сортове пипер. След внедряването на патогена в тъканите на растението-гостоприемник, по повърхността на плода се образуват концентрични, леко хлътнали, след време некротични петна. Гъбата се развива основно във вътрешността на плодовете. По тази причина диаметърът на външната некроза при заразяване на плодовете с патогена *S. sclerotiorum* не може да служи като показател за устойчивост на сорта. При разрез на заразените плодове се открива обилен мицел и многобройни склероции на патогена (Фигура 8).



A **B**

Фигура 8. Заразяване на сортове пипер с патогена *S sclerotiorum*: **A** –некротични петна на 8-ми ден от инокулацията. **B** - образуване на склероции във вътрешността на плодовете

Най-бързо се заразяват лютите пиперки, които имат тънък перикарп и голямо съдържание на въглехидрати. Формирането на склероциите при лютия пипер е отчетено на 8-ми, при останалите сортове – на 10-ти ден от заразяването (Таблица 8).

Предполага се, че количеството на формираните склероции зависи не само от дебелината на перикарпа, но и, преди всичко, от съдържанието на въглехидрати в плода. Богатите на въглехидрати плодове от сортовете Български ратунд и Ивайловска капия са добър хранителен субстрат за развитието на гъбата. В плодовете на тези сортове се образуват голям брой едри склероции. При сорта Бяла капия количеството на формираните склероции е най-малък.

Таблица 8. Реакция на различни сортове пипер към заразяване с *S. sclerotiorum* (метод на откъснатите плодове)

Сорт	Съдържание на въглехидрати (mg/g)	Дебелина на перикарпа (mm)	D (mm)	Формиране на склероции (дни)	Брой склероции в един плод	
					10 ден	13 ден
Български ратунд	9,0	5-7	3,73	10	48	56
Ивайловска капия	11,5	6-8	11,83	10	36	44
Сиврия	4,6	5-6	6,42	10	17	31
Пирует F1	5,6	4-6	3,30	10	5	19
Бяла Капия	6,1	6-8	3,33	10	2	17
Джулюнска шипка	6,9	2-3	6,17	8	12	17

D – диаметър на некроза, mm (средно за сорта); съдържанието на въглехидрати е въз основа на литературни данни (Todorov et al., 2001)

3.4. Изолиране, идентифициране и отбор на щамове - антагонисти на причинителите на кореново и стъблено гниене по пипера

Целта на опитите е изолиране от почвата на микроорганизми с изразена антагонистична активност спрямо *S. sclerotiorum* и основни групи фитопатогени,

причиняващи болести по пипер, отглеждан в оранжерийни условия и проучване на възможностите за приложението им за борба.

3.4.1. Изолиране, идентифициране и отбор на щамове *Trichoderma* spp. - антагонисти на причинителя на бяло гниене по пипер

От почвените проби са изолирани 18 изолата на *Trichoderma* spp., четири изолата *Gliocladium* spp. и една бактерия (B1), които потискаха развитието на микроорганизмите в петриевите блюда. Идентифицирането на изолатите е извършено върху следните макро и микроморфологични признаци:

На 7-ми ден от посявката върху КДА и култивиране при + 23 ºС изолираните гъби *Trichoderma* spp. образуват плътна тъмно-зелена конидиална покривка без оцветяване на субстрата, конидиофорите са равномерно разклонени, фиалидите – бутилковидни, конидиите - сферични, с гладки стени, многобройни, събрани в главички. Изолатите, определени като *Gliocladium* spp. при същите условия на култивиране формират зелена конидиална покривка, която е значително по-рехава и нежна, в сравнение с тази при изолатите на *Trichoderma* spp. Оцветява субстрата в жълто. Конидиите са многобройни, сферични, с гладки стени, събрани във фиалиди.

Макро-морфологичните различия на изолатите *Trichoderma* spp. и *Gliocladium* spp. се проявяват в различната форма на гъбната колония върху хранителната среда КДА (Фигура 9).



А **В**

Фигура 9. Различна форма на колониите на изолатите: **А**. *Trichoderma* spp.; **В.** *Gliocladium* spp. на 7-ми ден от инокулацията върху КДА

Представителите на род *Trichoderma* се характеризират с бърз растеж, ярко зелени конидии и разклонена конидиофорна структура. При култивиране върху твърда хранителна среда КДА се развива силно разклонен субстратен мицел, последвано от въздушен мицел. Субстратният мицел се разпростира радиално - от центъра на колонията към периферията на агара. Въздушният мицел се образува на 30- 48h от посявката и е с белезникав цвят. От 72h до 96h след посявката, мицелът заема цялата повърхност на петриевото блюдо (90 mm). Конидиообразуването настъпва след 72h, като спорите се образуват по цялата повърхност на въздушния мицел, формирайки концентрични кръгове. Вегетативната култура на изолатите *Gliocladium* spp. е с добре развит несептиран, фин разклоняващ се мицел, върху който се формират жълто-зелени спори, които образуват характерни струпвания, придаващи различна форма на гъбната колония.

3.4.2. Влияние на гъби-антагонисти *Trichoderma* spp. върху линейния растеж на *Sclerotinia sclerotiorum* (Ss1) в *in vitro* условия

Направените проучвания на антагонистичната активност на изолатите на *Trichoderma* spp. в *in vitro* условия показват, че повечето от тях притежават добре изразен свръхпаразитизъм по отношение на *S. sclerotiorum* (Таблица 9). Всички 18 изолата *Trichoderma* spp. са с по-високи възможности за завоюване на хранителния субстрат, в сравнение с фитопатогена. Коефициентът на конкурентна способност при изолатите варира в широки граници – от 1,2 до 11. Дванадесет изолата проявяват силна антагонистична активност с коефициент над 2. От тях се откроява изолат с изразена антагонистична активност и, съответно, коефициент на конкурентна способност 10,8. Изолатът е идентифициран по макро и микроморфологични характеристики като *Trichoderma viride.*

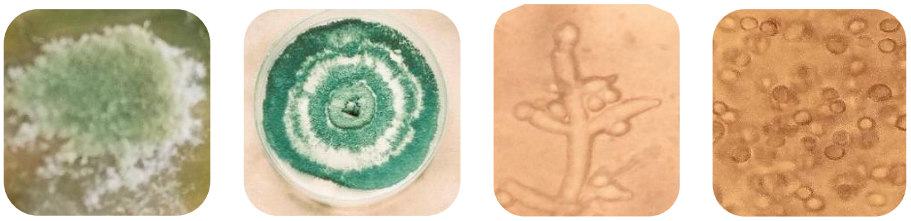
Таблица 9. Антагонистична активност на изолатите *Trichoderma* spp. по отношение на *S. sclerotiorum* в *in vitro* условия. Метод на срещуположните колонии

№	Диаметър на колонията на 7-ми ден от залагане на опита, mm		Коефициент на конкурентно способност	Начин на действие на антагониста
	Sclerotinia sclerotiorum	Антагонист, изолат		
1	8.33	90.00	10,8	*Свръхпаразитизъм
2	41.86	52.33	1,25	**антибиотично
3	33.67	62.59	1,85	антибиотично
4	30.37	80.67	2,66	свръхпаразитизъм
5	27.33	71,66	2,62	свръхпаразитизъм
6	29.25	68,00	2,32	свръхпаразитизъм
7	35,00	70,00	2,00	свръхпаразитизъм
8	41.56	49.00	1,19	антибиотично
9	23.67	55.19	2,33	свръхпаразитизъм
10	33.33	65.67	1,97	антибиотично
11	44.37	85.67	1,93	антибиотично
12	34.33	83,57	2,43	свръхпаразитизъм
13	20.67	79.33	3,34	свръхпаразитизъм
14	20.00	79.00	3,95	свръхпаразитизъм
15	16.67	74.33	4,46	свръхпаразитизъм
16	14,33	80.33	5,61	свръхпаразитизъм
17	23.33	76.67	3,29	свръхпаразитизъм
18	32.27	87.00	2,70	свръхпаразитизъм

*Свръхпаразитизъм – развитие върху колонията на патогена; **антибиотично действие – добре изразена зона на лизиране между колониите на патогена и антагониста.

Описание на щама

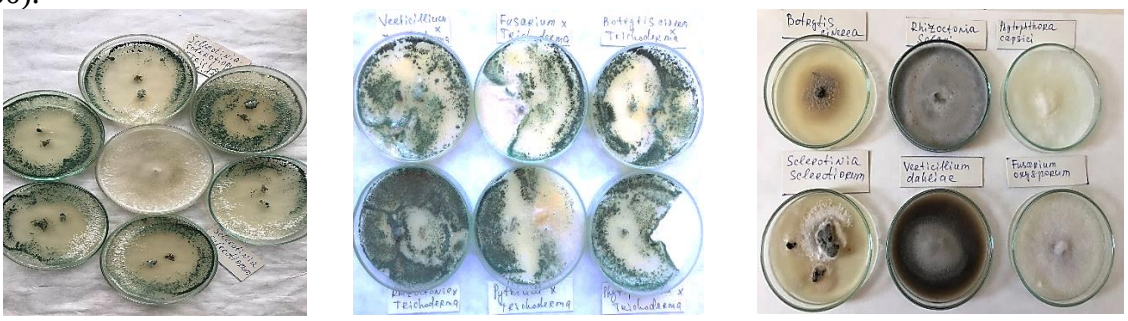
Trichoderma viride (Trv1) (Фигура 10): Мицелът е бял, добре развит, след време потъмнява. Върху КДА гъбата образува плътна тъмно-зелена конидиална покривка. Образува хифи с конидиофори. Конидиофорите са с удължени стеригми, които образуват заедно метличка. Конидиите са елипсовидни, безцветни, след време зелени, с леко грапава повърхност, слепени в сферични или цилиндрични фиалиди. Хламидоспорите са сферични и елипсовидни, зеленикави на цвят. Изолатът *Trichoderma viride* принадлежи към Fungi imperfecti, Moniliales, *Trichoderma*, *Trichoderma viride* по Rifai, M. (Rifai, M., 1966) и е използван за последващи изследвания като *Trichoderma viride* (Trv1).



A **B** **C** **D**

Фигура. 10. Морфология на щам *Trichoderma viride* (Trv1): **A –** характерна зелена колония на гъбата върху воден агар при изолация от почвена проба; **B –** концентрично нарастване на колонията на *T. viride* (Trv1); **C** - разклонена конидиофора; **D –** сферични конидии

В резултат на проучването е установена висока антагонистична активност на изолата Trv1 спрямо *S. sclerotiorum.* На 7-ми ден от залагане на опита Trv1 заема цялата повърхност на хранителната среда в петриевото блюдо и развива обилно спороношение върху колонията на патогена (Фигура 11А). Коефициентът на конкурентна активност на изолата спрямо *S. sclerotiorum* е 10,8. Смята се, че антагонистична активност на изолат над 3 е добър технологичен показател, характеризиращ щама - продуцент при използването му за производство на биологичен препарат за борба с фитопатогени (Elad, 2000).



A **B** **C**

Фигура 11. Метод на срещуположните колонии: **A:** Антагонистичната активност на изолата Trv1 срещу Ss1**.** Изолат Trv1 заема повърхността на хранителната среда, добре се вижда зоната на лизиране. В средата на фигурата – чиста култура на *S. sclerotiorum*. **B:** Развитие на *Trichoderma viride* върху колониите на почвените патогени *Rhizoctonia solani, Pythium debaryanum, Phytophthora capsici, Verticillium dahliae, Fusarium oxysporum, Botrytis cinerea*. **C:** Чисти култури на изолираните патогени

Контролното поставяне на склероций от *S. sclerotiorum* върху хранителна среда КДА с култура от Trv1 потвърди активността на щама-антагонист спрямо патогена. Една седмица след залагане на опита цялата повърхност на склероция бе паразитирана от гъбата -антагонист.

За производство на биопрепарат се избира щам, който да притежава антагонистична активност спрямо няколко патогена, принадлежащи към една екологична група по характера на разпределението им в почвата и субстрата, представляващ източник на хранителни елементи. В този смисъл щамът Trv1, избран за производство на биопрепарат за борба с бяло гниене, трябва да притежава висока антагонистична активност и срещу развитието на други почвени патогени, причиняващи кореново и стъблено гниене по пипера. Това увеличава възможностите за извеждане на биологична борба с болестите по пипера в оранжерийни условия само с един биологичен препарат.

Получените резултати от изследването в лабораторни условия показват, че антагонистичната активност на щама Trv1 е висока по отношение на почвените патогени, които образуват склероции – *S. sclerotiorum, R. solani, V. dahliae* и *B. cinerea,* с

изчислен коефициент на антагонистична активност над 7,4 (Таблица 10; Фигура 11 B, 11 C). Това предполага, че Trv1 може да бъде използван като щам-продуцент за производство на биопрепарат за борба с почвени патогени в оранжерии.

Таблица 10. Антагонистична активност на щама Trv1 по отношение на патогени, изолирани от болни растителни тъкани на пипер. Метод на срещуположните колонии

№	Диаметър на колония на 7-и ден от залагане на опита, mm			Коефициент на конкурентно способност	Начин на действие на антагониста
	Патоген		Антагонист Trv1		
1	*Sclerotinia sclerotiorum*	8,33	90,00	10,8	Добре изразена зона на лизиране; Бърз растеж; Свръхпаразитизъм (развитие върху колонията на патогена).
2	*Botrytis cinerea*	10,83	80	7,40	
3	*Rhizoctonia solani*	10,83	80,00	7,40	
4	*Verticillium dahliae*	5,00	80,00	16,00	
5	*Phythophthora capsici*	23,33	71,66	3,07	
6	*Pythium debaryanum*	60,00	68,00	1,13	
7	*Fusarium oxysporum*	35,00	70,00	2,00	

3.4.3. Влияние на бактерии-антагонисти върху развитието на *Sclerotinia sclerotiorum* (Ss1) в *in vitro* условия

При проучването на антагонистичната активност на изолатите *Enterobacter cloaceae, Bacillus subtillis* и новоизолираната бактерия (B1) в *in vitro* условия се установи, че бактериите оказват инхибиращо действие върху растежа на мицела на фитопатогените *S. sclerotiorum, R. solani, V. dahliae, B. cinerea* и *Ph. capsici.* Зоната на лизиране между колониите на патогените и бактериите е в границите между 10 mm и 30 mm (Таблица 11).

Таблица 11. Антагонистична активност на бактериалните изолати по отношение на патогените, изолирани от болните растителни тъкани на пипер

№	Диаметър на колонията, мм	Зона на лизиране, мм	Степен на въздействие
	Патоген	Антагонист	
1	*Sclerotinia sclerotiorum*	*Enterobacter cloaceae*	+++
	16,25	цялата повърхност	
	Sclerotinia sclerotiorum	*Bacillus subtilis*	+++
	26,25	цялата повърхност	
	Sclerotinia sclerotiorum	бактерия B1	+++
	13,75	цялата повърхност	
2	*Botrytis cinerea*	*Enterobacter cloaceae*	+++
	25,00	30,00	
	Botrytis cinerea	*Bacillus subtilis*	+++

	27,91	24,16	
	Botrytis cinerea	бактерия B1	+++
	27,91	24,16	
3	*Verticillium dahliae*	*Enterobacter cloaceae*	++
	30,83	26,00	
	Verticillium dahliae	*Bacillus subtilis*	++
	35,83	20,00	
	Verticillium dahliae	бактерия B1	+++
	28,33	21,25	
4	*Pythium debaryanum*	*Enterobacter cloaceae*	-
	90,00	0,00	
	Pythium debaryanum	*Bacillus subtilis*	+
	50,83	5,00	
	Pythium debaryanum	бактерия B1	+++
	26,25	30,00	
5	*Phytophthora capsici*	*Enterobacter cloaceae*	++
	38,33	22,50	
	Phytophthora capsici	*Bacillus subtilis*	+++
	37,50	25,00	
	Phytophthora capsici	бактерия B1	++
	37,91	20,00	
6	*Fusarium oxysporum*	*Enterobacter cloaceae*	+
	53,33	9,16	
	Fusarium oxysporum	*Bacillus subtilis*	+
	47,08	10,00	
	Fusarium oxysporum	бактерия B1	+++
	42,15	30,00	

Легенда: (-) – липса на зона на лизиране; (+)- зона на лизиране е 5 -10 mm; (++)- 11-15 mm; (+++) -над 16 mm. Бактерията заема цялата повърхност на петриевото блюдо (90 mm). Силно преобладаване на бактерийната колония по повърхността на блюдото.

При съвместно отглеждане на *E. cloaceae*, *B. subtilis* със *S. sclerotiorum* в хранителната среда, бактериите изпреварват развитието на патогена и на 3-ти ден от посявката заемат цялата повърхност на петриевото блюдо. Новоизолираната бактерия B1 по своята антагонистична активност не отстъпва на *E. cloaceae* и *B. subtilis* и успешно стопира развитието на *S. sclerotiorum* и други патогени, участващи в тестирането (Фигура 12; 13). Резултатите от проучването показват перспективността на местните щамове антагонисти, които имат висока инхибираща активност спрямо патогени, естествено обитаващите почвените биоценози на конкретната географска зона (Thaning, 2001; Kora, 2011; Smolinska & Kowalska, 2018;, Wang, 2018).



Фигура 12. Антагонистична активност на изолираната бактерия по отношение на *S. sclerotiorum.* **А**. Чиста култура на *S. sclerotiorum*; **В.** Развитие на бактерията върху колонията на *S. sclerotiorum*



Фигура 13. Антагонистична активност на изолираната бактерия по отношение на фитопатогените *F. capsici, Ph. capsici, V. dahliae, R. solani, P. debaryanum, B. cinerea* в *in vitro* условия

В резултат от съвместното култивиране на *B. subtilis* и щам *Trichoderma viride* Trv1 в хранителната среда КДА се установи, че бактерията не потиска развитието на гъбата (Фигура 17). Това може да послужи като база за проучването им в качеството на щамове - продуценти, които могат да бъдат използвани като комбинация микроорганизми при създаване на препарати за борба с почвените патогени.

Анализът на получените резултати показва следното: **1**. По културални и морфологични характеристики изолираната гъба е идентифицирана като *Trichoderma viride*, щам Trv1. **2.** Изолираният от почвата щам гъба Trv1 притежава висока антагонистична активност спрямо патогени, причиняващи кореново и стъблено гниене по пипера - *Sclerotinia sclerotiorum, Botrytis cinerea, Verticillium dahliae* и *Rhizoctonia solani* в *in vitro* условия. Коефициентът на антагонистична активност на изолата е над 7,4. Това предполага, че изолатът може да бъде използван като щам-продуцент при производството на биопрепарат за борба с патогените, образуващи склероции. **3.** От почвените проби е изолирана бактерия (В1) с добре изразен антагонизъм по отношение на *S. sclerotiorum* и почвени патогени, образуващи склероции. **4.** Щамът Trv1 и бактерията *Bacillus subtilis* при съвместно отглеждане върху хранителна среда се развиват без взаимно потискане на растежа. Това може да послужи като база за проучването им в качеството на щамове -продуценти, които могат да бъдат използвани като комбинация микроорганизми при създаване на препарати за борба с почвени патогени.

3.5. Производство на експериментални партиди биопрепарат на база отбран щам *Trichoderma* sp. в течна хранителна среда (дълбочинно култивиране).

Проучването на оптималните условия за дълбочинно култивиране на гъби-продуценти е задължителен етап от технологичния процес на ферментация (Алимова, 2006). В резултат от проведеното от нас тестиране на няколко хранителни среди е определена оптималната за развитието на щама Trv1. Установено е, че върху течна полусинтетична хранителна среда, съдържаща нитратна форма на азот $NaNO_3$ и пшеничени трици като източник на въглерод, гъбата преминава през пълен цикъл на онтогенеза и формира максимално количество биомаса - 28 g/L след 96h култивиране (Таблица 12). Получените резултати потвърждават литературните данни относно параметрите за отглеждане на гъби от род *Trihoderma* в комерсиални условия (Коломбет, 2001).

Таблица 12. Натрупване на биомаса на *T. viride* (Trv1) върху течни хранителни среди и различна експозиция на шейкиране

Хранителна среда	Експозиция, (h)	Натрупване на биомаса в l L среда, (g)
КДС	72	20,20±0.3
КДС	96	25,70±1.4
КДС	120	31,30±1.4
Чапек	72	5,40±0.1
Чапек	96	12,19±0.6
Чапек	120	14,37±0.3
Чапек с пшеничени трици	72	22,16±7.0
Чапек с пшеничени трици	96	28,00±1.4
Чапек с пшеничени трици	120	28,00±1.4

Ферментационни хранителни среди: течна картофено-декстрозна среда (КДС), течна среда на Чапек (синтетична хранителна среда), подобрена среда на Чапек с пшеничени трици (полусинтетична хранителна среда).

Условията за култивиране на Trv1 оказват влияние върху процеса на спорообразуване. При дълбочинно отглеждане на Trv1 в хранителна среда, съдържаща нитратна форма на азот $NaNO_3$ и пшеничени трици, гъбата формира относително малко количество фиалоконидии и голямо количество хламидоспори (Таблица 13). Концентрацията на фиалоконидиите в хранителната среда КДС е с 1,5 по-висока, отколкото в средата с трици. Количеството на хламидоспори е по-малко във всички варианти с изключение на варианта с подобрена среда на Чапек с пшеничени трици. Способността на гъбата да образува трайни спори в голяма степен се отразява върху показателя „трайност“ на произвеждания биологичен продукт.

Таблица 13. Натрупване на фиалоконидии и хламидоспори на Trv1 в дълбочинна култура върху различни хранителни среди

Продуктивност	Хранителна среда		
	1	2	3
Титър на фиалоконидии, $1x10^6$ CFU/ml	70,0±1.75	42,5±1.63	4,8±0.96
Титър на хламидоспори, $1x10^6$ CFU/ml	2,0±0.45	4,8±1.22	29,5±1.29

1 - КДС; 2 - Чапек; 3 - подобрена среда на Чапек с пшеничени трици.

Масовото образуване на трайни спори прави препарата по-стабилен по време на съхранение, без да променя антагонистичните свойства на щама-продуцент. Интензитетът на спорообразуване при гъбата *T. viride* зависи от температурата по време на ферментацията (Таблица 14). Активно образуване на спори при *T. viride* се отчита в диапазон от +19ºC до +29ºC, при оптимални стойности между + 24º C и + 27º C.

Таблица 14. Влияние на температурата върху спорообразуването при *Trihoderma viride*

º C /Брой конидии, thousand/ml					
+ 19	+ 21	+ 24	+ 27	+ 29	+ 31
8.3	8.7	11.9	12.5	4.1	0.0

$GD_{0.01}$ = 1.3 mm / 24h

Един от технологичните елементи при производството на течни биопрепарати е количеството стартерен посевен материал.

Установено е, че при използване на 5% посевен материал в хранителната среда натрупването на биомаса е 97–107 mg/ml, а броят на хламидоспорите не по-малък от 1. 10^4 CFU/ ml след преключване на цикъла на култивиране (Таблица 15).

Таблица 15. Влияние на количествата посевен материал върху натрупването на биомаса и спори при междинно култивиране

Количество посевен материал, %	Абсолютно суха биомаса, mg/ml	Титър, UFC/ml	
		Конидиоспори, брой	Хламидоспори, брой
1.0	46±0.07	1.1 x 10^3	0.0
2.5	96±0.01	9.3 x 10^3	0.0
5.0	97±0.03	2.8 x 10^4	+
10.0	99±0.05	4.1 x 10^4	+

Сравняването на динамиката на натрупване на биомаса в процеса на култивиране на гъбата върху хранителни среди с различен състав показа, че полусинтетичната течна среда, съдържаща нитратна форма на азот ($NaNO_3$) и пшеничени трици като източник на въглерод, е най-подходяща при производството на биомаса от *T. viride*. Максимално натрупване на биомаса се отчита при 96 – 120h култивиране върху клатачен апарат при температура +27ºC и начална киселинност на средата pH 6 (Таблица 16).

Таблица 16. Натрупване на биомаса върху полусинтетична хранителна среда при измерена начална киселинност

Време, t/h	pH		Биомаса, g/L	
	КДС	Чапек с пшеничени трици	КДС	Чапек с пшеничени трици
96	6.14±0.19	6.96±0.07	25,70±1.4	28.0±1.4

95.0 % доверителен интервал.

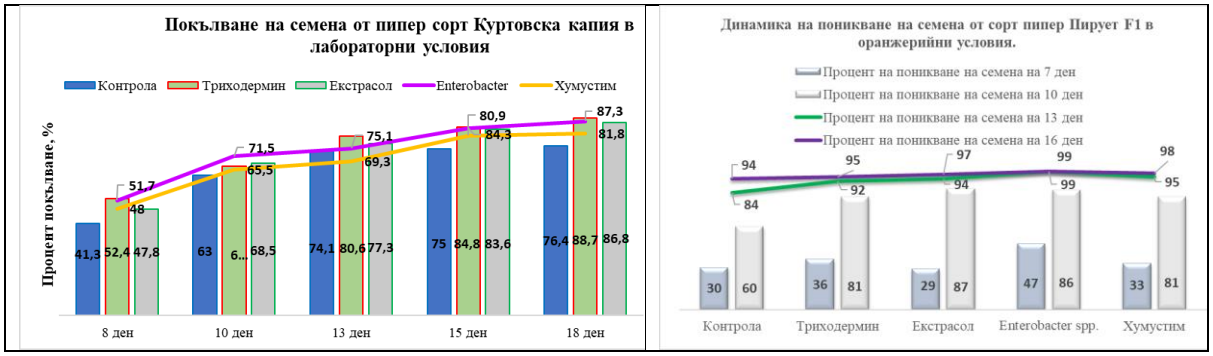
Използвана е полусинтетична хранителна среда на база пшеничени трици (g/L стерилна вода: захароза, 30.0; $NaNO_3$, 9; KH_2PO_4, 1.0; $MgSO_47H_2O$, 0.5; $FeSO_47H_2O$, 0.01; KCl, 0.5, пшеничени трици, 50), която позволява на гъбата *T. viride* да реализира пълен цикъл на онтогенеза в процеса на ферментация.

Култивирането на Trv1 при условия на непрекъснато шейкиране със скорост 120 rpm, температура +28ºC в течение на 96h върху течна полусинтетична хранителна среда с начална киселинност pH 6, осигурява натрупване на биомаса 28 g/L, хламидоспори с титър не по-малко от 1x10^6 CFU/ml и общ брой на спорите не по-малко от 1x10^8 CFU/ml. Високият титър на продукта дава основание средата с пшеничени трици да бъде препоръчвана като субстрат при технологията за производство на течен биологичен препарат.

3.6. Проучване влиянието от приложението на антагонисти, биологични и органични продукти върху растежните прояви, добива и продуктивността при пипер

3.6.1. Покълване на семена от пипер сорт Куртовска капия в лабораторни условия

Енергията на покълване на семената е един от показателите, характеризиращ свойствата на биопродуктите, използвани за предсеитбено третиране на семена, с цел стимулиране протичането на физиологичните процеси в растенията. На 10-ти ден от залагане на опита кълняемата енергия на семената в контролния вариант е 63%. Във вариантите с накисване на семената в суспензии от *Trichoderma viride, Bacillus subtilis* и *Enterobacter cloaceae* кълняемата енергия е съответно 67%-71,5% при 65,5% във варианта с хуминови киселини (Фигура 14А).



Фигура 14. А: Покълване на семена от пипер сорт Куртовска капия в лабораторни условия; В: Динамика на поникване на семена от сорт пипер Пирует F1 в оранжерийни условия

На 18-ти ден от залагане на опита, кълняемостта на обработените с биопродукти семена е с 10%-12% по-висока отколкото в контролния вариант. Най-добър резултат е получен във варианта с накисване на семената в суспензия от "Триходермин" с титър не по-малко от 1.10^8 CFU/ml, получен по технологията за дълбочинно производство върху полусинтетична хранителна среда. Установена е математически доказана разлика с контролата във вариантите с "Триходермин", "Екстрасол" и *Enterobacter cloaceae*.

3.6.2. Влияние на биопрепаратите върху процента на поникване на семената и биометричните показатели на разсада от пипер сорт Пирует F1 в оранжерийни условия.

Масовото поникване на семената, обработени с биологичните препарати, се отчете на 10-ти ден от сеитбата. Поникването на семената в контролния вариант е 60%, във вариантите с обработените семена – от 81% до 87%. Разликата с контролата е 14,5% - 19,4%. На 13-ти ден поникването на семената в контролата достига 84% и 92-99% в другите варианти. Най-съществена разлика с контролата има при семената, обработени със суспензия от бактериите *E. cloaceae, B. subtilis* и биотора „Хумустим" (Фигура 14В).

3.6.3. Влияние на предсеитбената обработка на семена от пипер върху протичането на фенофазите при разсада

Приложението на биопрепарата "Триходермин", произведен на база щам Trv1 в течна полусинтетична хранителна среда, ускорява протичането на фенофазите при пипера и позволява по-ранно изнасяне на разсада на постоянно място с цел получаване на ранен добив. Установено е, че в контролния вариант без обработка на семената разсадът е готов за разсаждане на постоянно място три дни по-късно, в сравнение с този, получен от семената, третирани с биопрепаратите (Таблица 17). Ускорява се, съответно, протичането на фенофазата масов цъфтеж и срока на първите пет беритби, в сравнение с нетретираната контрола (Таблица 18).

Таблица 17. Влияние на предсеитбена обработка на семена от пипер Пирует F1 върху поникването и формирането на същински листа при разсада

Вариант	Фаза на развитие на разсада, дни			
	Масово поникване	2 двойки същински листа	3 двойки същински листа	4 двойки същински листа
Вода	13	27	34	41
“Триходермин”	10	24	31	38
Бактериални препарати	10	24	31	38

Таблица 18. Влияние на предсеитбена обработка на семена пипер сорт Пирует F1 върху протичането на фенофазите на растенията.

Вариант	Фаза на развитие, ден		
	Бутонизация	Масов цъфтеж	Техническа зрялост
Вода	15	25	46
“Триходермин”	12	22	43
Бактериални препарати	12	22	43

Предсеитбената обработка на семената с биологичните продукти на база антагонистичната гъба, изолат Trv1, бактериите *Enerobacter cloaceae* и *Bacillus subtillis* оказва положително влияние върху биометричните показатели на разсада при пипера. Разликата между вариантите е доказана математически (Таблица 19).

Таблица 19. Влияние на предсеитбена обработка на семената от пипер сорт Пирует F1 с биологичните продукти на база *T. viride, E. cloaceae, B. subtilis* и хуминови киселини върху биометричните показатели на разсада.

В	Маса/ растение, g		Корен		Стъбло						Листа, брой	
			Маса, g		Височина, mm		Диаметър, mm		Маса, G			
1	3,94**	bc	0,46*	cde	171,75***	abc	34,75***	bc	1,52**	bc	8,3*	abc
2	4,76***	ab	0,54***	ab	161,25***	bcd	35,00***	b	1,74***	bcd	8,6***	ab
3	5,84***	a	0,77***	a	189,75***	a	44,00***	a	2,26***	a	9,45***	a
4	4,21***	bc	0,49***	bcd	172, 0***	ab	33,50**	bc	1,62***	abc	8,4**	abc
5	5,12***	a	0,66***	ab	180,75***	a	39,00***	ab	1,93***	ab	8,65**	ab
6	5,74***	a	0,65***	ab	196,15***	abc	40,75***	a	2,27***	a	8,9*	ab

a,b,c,d,e– Duncan’s Multiply Range Test, P<0.05 1. Контрола; 2. “Триходермин” (сух препарат); 3. “Триходермин” (течен); 4. “Хумустим”; 5. *Enterobacter cloaceae*; 6. –“ Екстрасол”.

Най-добри резултати са получени във варианта с приложението на течния биопрепарат “Триходермин”, използван за накисване на семената в суспензия с концентрация на работния разтвор 1 ml препарат (с титър 1.10.^{8} CFU/ml) на 1L вода за 4h. Ефектът от третирането се изразява в увеличението на общата маса на младите растения, диаметъра на стъблото, дължината на корена и броя на листата. В този вариант е получен разсад с добре структуриран и по-мощен хабитус Увеличението на масата на растенията е 32,53%; диаметърът на стъблото е 21,02%, маса на корена – 40,26 %, в сравнение с нетретираната контрола.

3.6.4. Влияние от приложението на антагонисти, биологични и органични продукти върху добива и продуктивността при пипера

Резултатите от проучването показват, че инокулацията на растенията с биопродуктите значително подобрява растежа и продуктивността на пипера (Таблица 20).

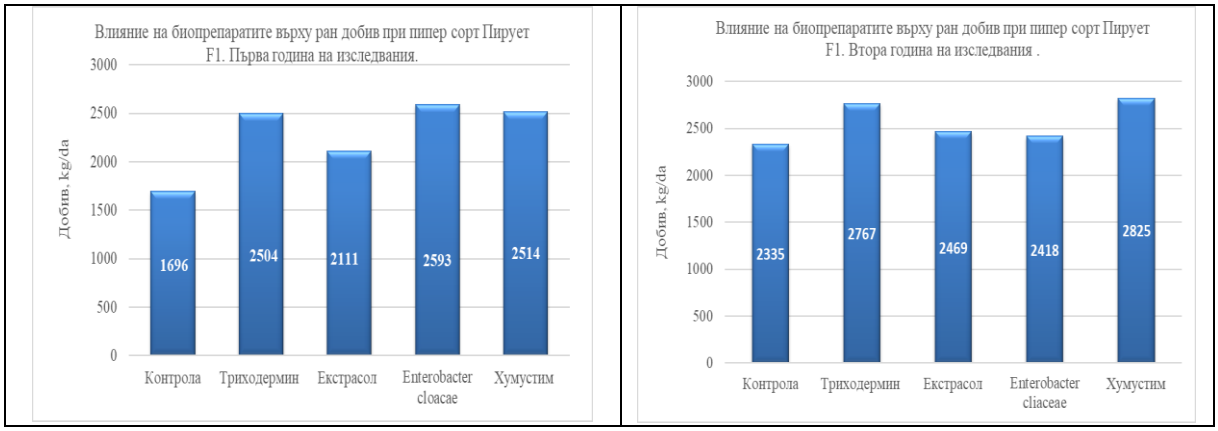
Резултатите, получени във варианта с биопрепарата “Триходермин”, приложен като течен препарат с титър 1.10^8 CFU/ml за накисване на семената и еднократното почвено внасяне при разходна норма на работния разтвор 10 ml/10L вода за 20 m^2 по време на разсаждане на растенията на постоянно място, потвърждават положителното влияние на биопрепарата върху растежните прояви при пипера. При обработените растения се отчете увеличение на маса на растението с 26%, височина на стъблото с 7%, диаметъра – 7%, маса на листата - 36%. Инокулацията на растенията с „Триходермин“ значително подобрява продуктивността на пипера. Увеличението на продуктивността е 28%.

Таблица 20. Биометрични показатели на растенията и продуктивност на пипер Пирует F1 в сравнителен опит с приложение на биологични препарати, хуминови киселини и минерален микро тор със съдържание на SiO_2

Вариант	Стъбло			Корен	Листа	Растение	Продуктивност		
	H,	D,	M,	M,	M,	M,	Плодове/ растение	M/ плод,	M плодове/ растение
	cm	mm	g	g	g	g	брой	g	g
К -без третиране	72,33 ab	12,25 a	148,33 a	18,77 a	73,67 b	240,7	6,58 a	143,33	943,11 b
Оптисил (SiO_2)	69 b	12 a	175,58 a	26,69 a	104,58 a	306,86	7,67 a	145,67	1117,29 ab
Enterobacter cloacae	66,67 c	11,83 a	178,5 a	28,33 a	105,92 a	312,74	8,5 a	144,67	1229,7 ab
Хумустим	76,33 ab	12,08 a	158,08 a	22,86 a	87,33 ab	268,27	7,17 a	146,67	1051,62 ab
Триходермин	77,33 a	13,5 a	180 a	23,71 a	115,25 a	312,96	9,00 a	146	1314 a
Екстрасол	73 ab	12,58 a	154,5 a	27,09 a	97,08 ab	278,67	8,08 a	151,67	1225,49 a
НСР	0,07 a 0,13 b 0,34 c	0,07 a	0,09 a	0,07 a	0,07 a 0,11 b	0,06 a	0,05 a	0,12 a	0,09 a 0,13 b

Внасянето на биопрепарата в почвата обогатява ризосферата на растенията с полезна микрофлора. Конидиите на *T. viride* колонизират повърхността на корените, увеличавайки тяхната абсорбционна повърхност и създавайки биологична бариера за фитопатогените.

Сравнителните опити по проучването влиянието на биологичните и органичните продукти върху добива при пипер сорт Пирует F1 показват ефективността от приложението им в оранжерийни условия (Фигура 15).



Фигура 15. Влияние на биопрепаратите върху ранния добив при пипер сорт Пирует F1 по години. НСР= 156; F e=47; F t=2,64

Най-нисък показател за ран добив - 2300 kg/da е получен в контролния вариант (без обработка на семената и растенията). Във варианта с третиране на семената и почвено внасяне на „Триходермин“ преди разсаждане на растенията на постоянно място ранният добив е най-висок –2800 kg/da. Във вариантите с обработка на семената и внасяне на бактериалните препарати на база *Bacillus subtilis* и *Enterobacter cloaceae* добивът е 2500 kg/da. Във варианта с обработка на семената и растенията с хуминови киселини (препарат „Хумустим“) добивът е сравним с този от третирането с „Триходермин“ и е 2800 kg/da.

Микробиологичният препарат „Триходермин“ оказва многофункционално действие върху растежа и развитието на пипера. Накисването на семената от пипер за 4h в суспензия от „Триходермин“ с титър 1.10^8 CFU/ml, получен по технологията за дълбочинно производство върху полусинтетична хранителна среда, повишава кълняемостта на семената с 19%, ускорява разсаждането на разсада на постоянно място с 3 дни. В обработентите варианти се формира разсад с по-добра структура на растението. Увеличението на масата на растенията е 33%, диаметъра на стъблото с 21%, масата на корена – с 40%, в сравнение с нетретираната контрола.

Накисването на семената и почвеното внасяне на течен биопрепарат „Триходермин“ с титър 1.10^8 CFU/ml при разходна норма на работния разтвор 10 ml/10L вода за 20 m^2 се отразява положително върху биометричните показатели на растенията при пипера. При обработените растения увеличението на показателите: маса на растението е 26%, височина на стъблото - 7%, диаметъра – 7%, маса на листата - 36%. Инокулацията на растенията с „Триходермин“ увеличава продуктивността при пипера с 28%.

3.7. Проучване влиянието от приложението на антагонисти, биологични и органични продукти върху имунната реакция на растения и биологичната активност на почвата при пипер

3.7.1. Влияние от приложението на антагонисти, биологични и органични продукти върху развитието на стъблени некрози в условия на изкуствено заразяване със *Sclerotinia sclerotiorum* (Ss1)

Методът на декапитация на стъблата позволи да бъдат установени различия в имунната реакцията на растенията, третирани с биологични и органични продукти, към заразяване с патогена *S. sclerotiorum* (Фигура 16).



Фигура 16. Дължина на некрозата след заразяване с патогена *Sclerotinia sclerotiorum* по метода на декапитация

Показателят „дължина на некрозата" в опита вариране от 2,00 mm до 20,00 mm, в зависимост от внесените биопродукти. Тестираните растения показват различна степен на възприемчивост към патогена:

Силна възприемчивост - средната дължината на некрозата е между 8,6 mm и 10,5 mm при вариране по вариантите от 2 mm до 22 mm. Тази реакция към заразяване е отчетена във варианта без третиране (контрола) и с еднократно третиране с фунгицида „Топсин М 70 ВДГ" (концентрация на работния разтвор 10 g/10 L вода за 20 m^2). Върху некрозата на заразените растения се образува добре забележим налеп от бял пухкав мицел на патогена.

Средна възприемчивост - средната дължина на некрозата е между 6,6 mm и 8,5 mm. Тази реакция към заразяване е отчетена във вариантите с третиране на растенията с разтвор от „Хумустим" (5 ml/10 L вода за 20 m^2) и суспензия от *Enterobacter cloaceae* (10 ml/10 L вода за 20 m^2).

Възприемчивост - средната дължина на некрозата е между 5,6 mm и 6,5 mm. Тази реакция към заразяване е отчетена във вариантите с обработка на растенията с воден разтвор от препарата "Екстрасол" (10 ml/10 L вода за 20 m^2) .

Слаба възприемчивост - средната дължина на некрозата е между 3,5 mm и 5,5 mm, отчетена във вариантите с почвено внасяне на „Триходермин" и повърхностна обработка на растенията с микротор „Оптисил", съдържащ SiO_2.

Резултатите от изкуственото заразяване на пипера с патогена *S. sclerotiorum* по метода на декапитация показват, че имунната реакция на заразените растения се различава, в зависимост от приложените биологични средства. Най-силно развитие на некрозите се отчете във варианта без приложение на биологични препарати. „Триходермин", приложен за поливане на растенията като течен препарат с концентрация на работния разтвор 1.10^8 CFU/ml, при разходна норма на работния разтвор 10 ml/10L вода, за 20 m^2; притежава свойства на растежен регулатор и засилва имунната реакция на растенията към заразяване с бяло гниене. Нарастването на некрозата в този вариант е двойно по-слабо от средното в опита. Резултатите от експеримента потвърждават резултатите, получени от други изследователи, които предлагат гъби-антагонисти за борба с бяло гниене при зеленчуковите култури (в това

число, пипер) като ефикасен метод с многопосочно действие върху развитието, имунната реакция и добива на растенията (Алимова, 2006; Rocha-Ramirez et al., 2008; Zhao et al., 2018). Ризосферните гъби от род *Trichoderma* могат да осигурят дълготрайна защита дори при еднократно приложение в началото на сезона. Антагонистите остават върху корените, размножават се заедно с нарастващата коренова система и запазват жизнеспособността си по време на целия вегетационен период на културата.

5.7.2. Проучване влиянието от приложението на антагонисти, биологични и органични продукти върху биологичната активност на почвата при пипер

Резултатите от изследванията потвърждават изследванията на други автори (Чулкина В. 1995), че фитосанитарното състояние на почвата зависи от сумарното действие на факторите, свързани с отглеждане на културата. Микробиологичният анализ на почвените проби, взети в началото, средата и края на вегетацията от посева на пипер сорт Пирует F1 показва, че биологичната активност на почвата в опита се променя през целия период на вегетация (Таблица 22).

Таблица 22. Биологична активност на почвата в оранжериен опит с биопродуктите през периода на вегетацията. Сорт Пирует F1, 2022 г.

Вариант/Фаза	Брой микроорганизми в един грам почва			
	Общо, million/g	Гъби, thousands/g	Бактерии, million/g	Актиномицети, million/g
	Преди залагане на опита			
Обща проба	1,770000	50,000	0,240000	1,490000
Първата беритба				
E. cloaceae	3,380000	340,000	0,600000	2,440000
Ефект	**47,63**	85,29	60,00	38, 93
B. subtilis	3,180000	160,000	0,600000	2,420000
Ефект	**44,34**	68,75	60,00	38,43
T. viride	2,010000	370,000	0,480000	1,430000
Ефект	**11,94**	86,49	50,00	0,00
Хумустим	9,680000	300,000	1,970000	7,410000
Ефект	**81,71**	83,33	87,81	79,89
Оптисил	2,470000	280,000	0,340000	1,850000
Ефект	**28,34**	82,14	0,00	0,00
Метил топсин	8,210000	160,000	2,500000	5,550000
Ефект	**78,44**	68,75	90,40	73,15
Контрола ($N_{16}P_{20}K_{22}$)	2,560000	440,000	0,440000	1,680000
Ефект	**30,86**	88,64	45,45	11,31
Контрола ($N_8P_{10}K_{11}$)	1,950000	220,000	0,350000	1,380000
Ефект	10,17	77,27	31,43	0,00
Край на вегетация				
E. cloaceae	2,190000	60,000	0,160000	1,970000
Ефект	**19,18**	16,67	0,00	24,37

B. subtilis	2,280000	50,000	0,290000	1,940000
Ефект	**22,37**	0,00	17,24	23,20
T. viride	6,440000	70,000	1,180000	5,190000
Ефект	**72,52**	28,57	0,00	71,29
Хумустим	4,390000	60,000	1,560000	2,770000
Ефект	**76,54**	0,00	60,26	90,25
Оптисил	2,390000	90,000	0,190000	2,110000
Ефект	**57,0**	0,00	0,00	87,20
Метил топсин	3,820000	60,000	0,270000	3,490000
Ефект	**73,04**	0,00	0,00	92,26
Контрола ($N_{16}P_{20}K_{22}$)	4,670000	70,000	0,190000	4,410000
Ефект	**77,94**	0,00	0,00	93,37
Контрола ($N_8P_{10}K_{11}$)	1,730000	60,000	0,190000	1,480000
Ефект	**0,00**	16,67	0,00	0,00

Общата биогенност на почвата в опита с пипер нараства по време на вегетацията повече от два пъти. Най-високи стойности на общата биологична активност на почвата са получени във вариантите с внасяне на биопродуктите „Екстрасол“, „Триходермин“ и органичен тор „Хумустим“. Динамиката на нарастване на количеството микроорганизми е различна, в зависимост от приложения продукт. Във вариантите с внасяне на бактерията *Enterobacter cloacae* и “Хумустим” максимално нарастване на биологичната активност бе отчетено през периода на масов цъфтеж и първи беритби. Към края на вегетацията биологичната активност е още много висока, но количеството на актиномицетите намалява, в сравнение с активния период на растеж и продуктивност. Подхранването на растенията с органично вещество (хуминови киселини) в периода на масов цъфтеж- начало на беритби, създава благоприятни условия за намножаване на бактерии и актиномицети.

Във вариантите с внасяне на бактерията *Bacillus subtilis* и препарата „Оптисил“ (SiO_2), стойностите на този показател са високи както в средата, така и в края на вегетацията. Във вариантите с третиране на семена и почвено внасяне на „Триходермин“ биологичната активност на почвата нараства с течение на времето и стига своя максимум към края на вегетацията. Увеличението на показателя става за сметка на нарастващото количество на актиномицети и бактерии. Това се обяснява със способността на гъбите от род *Trcihoderma* да колонизират почвената ризосфера и активно да участват в процеса на минерализация, който се съпровожда с увеличаване броя на бактериите и актиномицетите. Увеличението на общата биологична активност на почвата в контролния вариант с минерално торене ($N_{16}P_{20}K_{22}$) през периода на масов цъфтеж и първи беритби е 60%, към края на вегетацията – 78%. Това показва, че при торене на пипера с комплекс минерални торове ($N_{16}P_{20}K_{22}$) процеса на минерализация е най-висок в средата на вегетацията, когато се правят първите беритби.

Към края на вегетацията биогенността на почвата е все още висока, но с по-малки стойности от тези, изчислени в средата на вегетацията. Разпределението на броя микроорганизми по групи показва нарастването на количеството на бактерии и актиномицети в средата на вегетацията с последващо изравняване на този показател към края на периода почти във всички варианти.

Броят на гъбните колонии през периода на първите беритби е най-висок и варира, в зависимост от използваните торове и биопрепарти. Количеството на внесените

минерални торове също оказва влияние върху биологичната активност на почвата. Внасянето на стандартна доза минерални торове ($N_{16}P_{20}K_{22}$) в контролния вариант засилва процеса на биогенност. Количеството гъбни колонии в 1 g почва в средата на вегетацията е най-високо във вариантите с минерално торене - $N_{16}P_{20}K_{22}$. Това предполага, че съществен фактор, регулиращ количеството на микроорганизми в почвата, е съдържанието на азот.

Структурният състав на микромицетите в почвата се свежда до четири функционални групи гъби: сапрофити, патогени, антагонисти и гъби- продуценти на токсини. В хода на експеримента се установи, че гъбите - продуценти на токсини от род *Penicillium, Aspergillus* и *Fusarium* доминират в състава на микромицетите във варианта с минерално хранене (Таблица 23, фигура 23).

Таблица 23. Структурен състав на микромицетите в почвените проби

Вариант	Процент гъбни колонии в петриеви блюда по варианти, %								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
$N_{16}P_{20}K_{22}$	17,65	5,89	0,00	5,89	17,65	43,00	10,00	5,89	0,00
E. cloaceae	3,75	5,25	5,50	8,50	22,25	26,75	0,00	7,25	10,75
B. subtilis	0,00	0,00	6,66	6,66	23,33	30,00	0,00	2,00	12,25
Tr. viride	0,00	0,00	7,25	0,00	12,25	10,00	0,00	0,00	20,50
Хумустим	0,00	3,50	6,50	6,95	23,75	5,00	5,00	7,15	32,15
Контрола	5,50	0,00	5,50	2,25	21,75	6,25	12,75	5,25	10,75

Легенда: 1- *Alternaria*; 2- *Fusarium*; 3- *Trichoderma*;4- *Penicillium*; 5- *Aspergillus*; 6- *Mucor*; 7- *Rhizoctonia*; 8- *Cladosporium*; 9 - *Micellia sterilia*.

Използването на биопродуктите на база *Trihoderma viride, Enerobacter cloacae, Bacillus subtilis* води до оптимизиране на структурния състав на микробиома в почвата и до потискане на патогенната микрофлора. Съдържанието на гъбните колонии в почвата, взета от вариантите с внасяне на биологичните препарати „Триходермин“ и „Екстрасол“ е значително по-слабо, отколкото в контролата, а в състава на микромицетите по-често се срещат гъби от род *Trichoderma*. Въздействието на биопродуктите върху увеличението на общата биологична активност на почвата е със значителни стойности. Внасянето на „Триходермин“ увеличава биогеността на почвата с 12% към средата и с 74% - към края на вегетацията. Проучването на състава на микроорганизмите в почвата показва, че количеството на бактерии в този вариант нараства - от 0,48 mill/g в началото до 1,18 mill/g към края на вегетацията. Съответно, в същия вариант, нарастването на актиномицетите е от 1,43 mill/g до 5,19 mill/g суха почва. Съдържанието на микромицети в почвата е максимално в началото на вегетацията, след което се наблюдава редуциране на гъбните колонии както във варианта с минерално торене, така и във варианта с биопродукта „Триходермин“. Внасянето на биопродукти създава благоприятни условия за развитието на микроорганизми от всички основни групи. Това осигурява стабилност на функционалните връзки между основните еколого-трофични групи микроорганизми.

- Количеството внесени минерални торове оказва влияние върху биологичната активност на почвата. Внасянето на стандартна доза минерални торове ($N_{16}P_{20}K_{22}$) засилва процеса на биологичната активност.
- Използването на биопродукти на база гъби *Trichoderma* spp., бактерии *Bacillus subtilis* и *Enterobacter cloacae* подобрява фитосанитарното състояние на почвата за сметка на по- слабото съдържание на гъбни колонии във вариантите с биопродуктите.
- Инокулирането на почвата с *Trichoderma* spp. регулира структурния състав на почвената микробна общност, засилва биологичната активност на почвата и значително подобрява растежа при пипера. Плътността на *Trichoderma* spp. в почвата е основният регулиращ фактор.

6. ИЗВОДИ

1. Бялото гниене е често срещано заболяване по пипер, отглеждан в култивационни съоръжения без отопление в България.
2. В България етиологията и биологията на патогена *Sclerotinia sclerotiorum* при пипер е слабо проучена.
3. Патогенът *Sclerotinia sclerotiorum* причинява сухи некрози по стъблата или клоните при пипер с ясно изразена концентричност. Концентричността на некрозите, причинени от бяло гниене, е симптом, характерен само за културата пипер.
4. В България гъбата *Sclerotinia sclerotiorum* минава пълен цикъл на развитие при отглеждане на пипер в култивационни съоръжения. Запазва се в растителни остатъци и почвата във вид на склероции и мицел. Заразяването на растенията се осъществява чрез аскоспори и мицел.
5. Формирането на склероции, тяхната маса, срок на съхранение и жизненост, образуването на апотеции с асци и аскоспори при гъбата *Sclerotinia sclerotiorum* зависи от режима на температура и светлина. Най - добри показатели за растеж на мицела са температура + 23–25ºС без светлина, за образуване на склероции - +19 ºС при режим на осветление ден/нощ.
6. Количеството на въглехидрати е основен фактор, оказващ влияние върху нарастването на мицела, формирането на склероции и натрупването на биомаса при *Sclerotinia sclerotiorum*. Скоростта на растеж и масата на мицела, броят и големината на склероциите на гъбата се увеличава върху среда с високо съдържание на въглехидрати.
7. Хранителната среда оказва влияние върху морфологията на колонията, скоростта на нарастване на мицела и формирането на склероции при *Sclerotinia sclerotiorum*. Скоростта на нарастване на мицела на гъбата е най-висока върху полусинтетични среди, съдържащи естествени компоненти (соево-глюкозна среда, отвара от моркови, ечемичени и пшеничени зърна).
8. Подреждането на склероциите при *Sclerotinia sclerotiorum* е характерен таксономичен признак на гъбата. В процеса на своето формиране склероциите образуват концентрични пръстени по повърхността на хранителната среда.
9. Жизнеността на склероциите зависи от размера. Способността за покълване при едрите склероции е по-висока.
10. В условията на България гъбата *Sclerotinia sclerotiorum* може да заразява растенията чрез аскоспори през месеците април-май, периода на масов цъфтеж и начало на плододаване при пипера. Апотеции се образуват върху склероциите 4 седмици след инкубация при +15°С. Аскоспорите заразяват растенията по дифузен път и, по този начин, гъбата минава всички фази от своята онтогенеза върху културата.
11. Изолатът *Sclerotinia sclerotiorum* Ss1 от пипер е патогенен за зеленчуковите култури пипер, домати, патладжан, карфиол, тиква, краставици, чесън и целина, което потвърждата широката специализация на патогена.

12. Сортовете пипер Ивайловска капия, Сиврия, Джулюнска шипка и Пирует F1 имат различна чувствителност към заразяване с причинителя на бяло гниене *Sclerotinia sclerotiorum.* Различията в имунната реакция на сортовете пипер към заразяване с *Sclerotinia sclerotiorum,* се изразяват в дължината на инкубационния период и честотата на заразявания.

13. Микромицетните щамове гъби, изолирани от почвените проби, са идентифицирани като сапрофитни гъби с родова принадлежност *Trichoderma* и *Gliocladium*. Изолат *Trichoderma* sp., използван за експерименталната работа, по своите макро -и микро-морфологични показатели се отнася до вид *Trichoderma viride*, щам Trv1.

14. Експерименталният щам *Trichoderma viride* Trv1 притежава изразена антагонистична активност спрямо *Sclerotinia sclerotiorum* и други почвени патогени, образуващи склероции - *Verticillium dahliae, Botrytis cinerea* и *Rhizoctonia solani* в *in vitro* условия. Коефициетът на конкурентоспособност на щама *Trichoderma viride* Trv1 е над 7,4. Щамът се характеризира с бърз растеж и колонизиране на субстрата.

15. Щамът *Trichoderma viride* Trv1 е съвместим с бактерията *Bacillus subtilis* при съвместно отглеждане върху хранителна среда. Това може да послужи като база за проучване в качеството им на щамове - продуценти при създаване на комбинирани биологични препарати за борба с почвените патогени.

16. Щамът *Trichoderma viride* Trv1 е подходящ за намножаване в течна хранителна среда по методиката за дълбочинно производство на биопрепарат. Върху подобрена полусинтетична хранителна среда на база пшеничени трици, *Trichoderma viride* Trv1 реализира пълен цикъл на онтогенеза в процеса на ферментацията. Култивирането на *Trichoderma viride* Trv1 при условия на непрекъснато шейкиране със скорост 120 rpm, температура +28ºC в течение на 96h върху течна полусинтетична хранителна среда с начална киселинност pH 6, осигурява натрупване на биомаса 28 g/L и спори с титър не по-малко от $1x10^8$ CFU/ml.

17. Микробиологичният препарат, произведен на база местен щам *Trichoderma viride* Trv1, повлиява положително биометричните показатели на растенията и увеличава ранния добив при пипера с 28%.

18. Инокулирането на почвата с *Trichoderma* spp. регулира състава на почвената микробна общност. Плътността на *Trichoderma* spp. в почвата е основният регулиращ фактор.

7. ПРИНОСИ

Приноси с оригинален и научен характер

1. За пръв път в България са описани симптомите на заболяването бяло гниене по пипер, специфични само за тази култура.
2. За пръв път в България е проучена биологията на патогена *Sclerotinia sclerotiorum*, причиняващ бяло гниене по оранжериен пипер.
3. За пръв път в България е установено, че гъбата *Sclerotinia sclerotiorum* минава пълен цикъл на развитие при отглеждане на пипер в неотопляеми култивационни съоръжения.
4. За пръв път в България е проучена имунната реакция на сортове пипер към заразяване с *Sclerotinia sclerotiorum* и са установени различия в показателите “инкубационен период“ и “честота на заразявания“.
5. От изолираните микромицетни гъби от род *Trichoderma* е избран щам с висока антагонистична активност спрямо *Sclerotinia sclerotiorum* и други почвени патогени, образуващи склероции - *Verticillium dahliae, Botrytis cinerea* и *Rhizoctonia solani*.

6. Проучени са основните параметри за дълбочинно производство на биопрепарат на база селектирания щам *Trihoderma viride* Trv1 - хранителна среда, температура, светлина, pH на средата, условия за ферментиране и намножаване.

7. Установено е, че щамът *Trihoderma viride* Trv1 е съвместим с бактерията *Bacillus subtilis* при съвместно отглеждане върху хранителна среда. Това може да послужи като база за проучване в качеството им на щамове -продуценти, при създаване на комбинирани биологични препарати за борба с почвените патогени.

Научни приноси с потвърдителен характер

1. Проучени са културалните признаци на патогена *Sclerotinia sclerotiorum*. Изследвано е влиянието на източниците на въглехидрати върху нарастването на мицела, формирането на склероции и натрупването на биомаса; способността на гъбата към образуване на склероции при различни режими на температура и светлина; съхранението и жизнеността на склероциите, в зависимост от тяхната маса; условията за образуване на апотеции и аскоспори.

2. За намножаване на биомаса на *Trichoderma viride* Trv1 е избрана подобрена полусинтетична хранителна среда на база пшеничени трици, която позволява на гъбата да реализира пълен цикъл на онтогенеза в процеса на ферментацията и осигурява висок титър на получения биопрепарат.

Приноси с научно-приложен характер

1. Разработена е методика за дълбочинно производство на биопрепарат на база местен щам *Trihoderma viride* Trv1 с висока антагонистична активност спрямо причинителя на бяло гниене по пипер.

2. Проучено е влиянието на биопрепарат на база *Trihoderma viride* Trv1 върху имунната реакция на растенията към заразяване с бяло гниене, растежните прояви, продуктивността и биологичната активност на почвата при отглеждане на пипер в оранжерийни условия.

3. Разработена е технология за приложение на биопрепарат на база *Trihoderma viride* Trv1, съчетаващ свойства на биофунгицид, биотор и препарат за биоремедиация при отглеждане на пипер в оранжерийни условия.

Резултатите от проведените изследвания са апробирани като научни статии в рецензирани списания.

Публикации на автора във връзка с дисертационния труд

1. Olga Georgieva and **Nataliya Karadzhova. 2022**. Monitoring the productivity of *Trichoderma viride* strain in submerged cultivation. Agricultural Sciences and Technology, vol. 14, No 2, pp 75–80. ISSN 1313–8820 (print) ISSN 1314-412X (online) https://agriscitech.eu/wp-content/uploads/2022/06/9_AST_2_June_2022.pdf

2. **Natalia Karadzhova. 2023.** Study on the Biology of the *Sclerotinia Sclerotiorum* Pathogen, Causing White Rot of Pepper. Quest Journals. Journal of Research in Agriculture and Animal Science Volume 10 ~ Issue 3 (2023) pp: 56-62 ISSN (Online): 2321-9459. https://www.questjournals.org/jraas/papers/v10-i3/10035662.pdf

3. **Nataliya Karadzhova**. 2024. Effect of silicon foliar fertilization on limiting the growth of stem and root necrosis in pepper (*Capsicum annum* L.). Bulgarian Journal of Agricultural Science, 30 (3), 418-422 https://www.agrojournal.org/30/03-06.pdf

Участия в научни конференции с постер

1. Effect of silicone foliar fertilization on limiting the growth of stem necrosis in pepper *Capsicum annuum* (L.) - 18-та международна среща по генетика и селекция на пипер и патладжан Eucarpia, 18-21 септември 2023 г., Пловдив.
2. *In vitro* study of *Trichoderma* isolates - potential antagonists of *Sclerotinia sclerotiorum, the* causitive agent of white mold on pepper (*Capsicum annuum L.*) - Научно-практическа конференция „Опитът от вчера, действията днес, увереността за утре “, 40 години на Факултет по растителна защита и агроекология, 07 ноември 2023 г, Аграрен Университет – Пловдив.

Бяло гниене (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary) по пипер (*Capsicum annum* L.) в култивационни съоръжения и възможности за биологичен контрол

Наталия Георгиева Караджова

РЕЗЮМЕ

През периода 2020–23 година на територията на институт по зеленчукови култури „Марица“, Пловдив са извършени проучвания относно етиологията на заболяването бяло гниене по пипер, биологията на патогена *Sclerotinia sclerotiorum* и възможностите за биологична борба.

Патогенът е избран за предмет на изследването в резултат на проведения мониторинг на болести по пипер в оранжерийни комплекси в Пловдивска област през периода 2020–22 г. Установено е, че стъбленото бяло гниене по пипера е недостатъчно проучено и трудно контролируемо заболяване при отглеждане на културата в неотопляеми оранжерии в България. При пипера патогенът *S. sclerotiorum* причинява сухи некрози по стъблата или клоните с добре изразена концентричност. Концентричността на некрозите, причинени от бяло гниене, е симптом, характерен само за културата пипер. Тези симптоми на бяло гниене по пипер не са описани от други автори. Направени са изолации на патогена *S. sclerotiorum* и патогенитетът им е доказан по правилата на Кох. Идентифицирането на таксономичната принадлежност на гъбата *S. sclerotiorum* е направено според културалните и морфологични признаци с помощта на съвременни определители и микологични атласи. Проучени са морфологичните и културални признаци на патогена *S. sclerotiorum*: изследвано е влиянието на източниците на въглехидрати върху нарастването на мицела, формирането на склероции и натрупването на биомаса; способността на гъбата към образуване на склероции при различни режими на температура и светлина; съхранението и жизнеността на склероциите, в зависимост от тяхната маса; условията за образуване на апотеции и аскоспори. Установено е, че гъбата *S. sclerotiorum* минава пълен цикъл на развитие при отглеждане на пипер в култивационни съоръжения. Запазва се в растителните остатъци и почвата във вид на склероции и мицел. Заразяването на растенията се осъществява чрез мицел и аскоспори. Формирането на склероции, тяхната маса, срокът на съхранение и жизненост, образуване на апотеции с асци и аскоспори при гъбата *S. sclerotiorum* зависи от режима на температура и светлина. Най - добри показатели за растеж на мицела са температура +23-25ºС без светлина, за образуването на склероции са температура +19ºС при естествен режим на светлина ден/нощ. Количеството на въглехидрати е основен фактор, оказващ влияние върху нарастването на мицела, формирането на склероции и натрупването на биомаса при *S. sclerotiorum*. Скоростта на растеж и масата на мицела, броят и големината на склероциите на гъбата се увеличава върху среда с високо съдържание на въглехидрати. Подреждането на склероциите при *S. sclerotiorum* е характерен таксономичен признак на гъбата. В процеса на своето формиране склероциите образуват концентрични пръстени по повърхността на хранителната среда. Жизнеността на склероциите зависи от размера. Способността за покълване при едрите склероции е по-висока. В края на периода на съхранение тя намалява приблизително с 14%, при дребните - наполовина. Апотеции се образуват върху склероциите 4 седмици след инкубация при +15°С. В условията на България гъбата *S. sclerotiorum* може да заразява растенията чрез аскоспори през месеците април-май, периода на масов цъфтеж и начало на плододаване при пипера. Аскоспорите заразяват растенията по дифузен път и, по този начин, гъбата минава всички фази от своята онтогенеза върху културата. За пръв път в България е проучена имунната реакция на сортове пипер към заразяване със *S. sclerotiorum* и са установени

различия в показателите “инкубационен период“ и “честота на заразявания“. С по-слаба имунна реакция са сортове с тънък перикарп и голямо съдържание на въглехидрати.

Биологичната борба с причинителя на бяло гниене по пипер *Sclerotinia sclerotiorum* е приоритетно направление в проведените изследвания. От почвени проби, взети от заразен участък, са изолирани гъби и бактерии. Антагонистичната им активност спрямо *Sclerotinia sclerotiorum* е проверена в лабораторни, съдови и сравнителни оранжерийни опити. За експерименталната работа е избран изолат *Trichoderma* sp., който по своите макро -и микро-морфологични показатели се отнася до вид *Trichoderma viride*, щам Trv1. Експерименталният щам Trv1 притежава изразена антагонистична активност спрямо *S. sclerotiorum* и други почвени патогени, образуващи склероции - *Verticillium dahliae, Botrytis cinerea* и *Rhizoctonia solani* в *in vitro* условия. Коефициетът на конкурентоспособност на щама Trv1 е над 7,4. Щамът Trv1 е подходящ за намножаване в течна хранителна среда по методиката за дълбочинно производство на биопрепарат. Върху подобрена полусинтетична хранителна среда на база пшеничени трици, *T. viride* Trv1 реализира пълен цикъл на онтогенеза в процеса на ферментация. Култивирането на Trv1 при условия на непрекъснато шейкиране със скорост 120 rpm, температура +28ºC в течение на 96h върху течна полусинтетична хранителна среда с начална киселинност pH 6, осигурява натрупване на биомаса 28 g/L и спори с титър не по-малко от $1x10^8$ CFU/ml. На база местен щам *Trihoderma viride* Trv1 са произведени експериментални партиди течен биопрепарат с висока ефективност спрямо *S. sclerotiorum* и други почвени патогени, образуващи склероции - *Verticillium dahliae, Botrytis cinerea* и *Rhizoctonia solani*. Биологичната активност на биопрепарата е изпитана в оранжерийни условия при пипер сорт Пирует F1. В сравнителен опит с биологични и органични продукти е проучено влиянието на биопрепарата „Триходермин“ върху имунната реакция на растенията към заразяване с бяло гниене, растежните прояви и продуктивността при пипер сорт Пирует F1 и биологичната активност на почвата. Установено е, че накисването на семената и почвеното внасяне на течен биопрепарат „Триходермин“ с титър 1.10^8 CFU/ml при разходна норма на работния разтвор 10 ml/10L вода за 20 m^2 засилва имунната реакция на растенията към заразяване с бяло гниене и увеличава продуктивността при пипера с 28%. Проучена е биологичната активност и структурният състав на почвата в опита в различни фенологични фази от развитието на културата. Установено е, че инокулирането на почвата с *Trichoderma viride* регулира състава на почвената микробна общност. Внасянето на „Триходермин“ увеличава биогеността на почвата с 12% към средата и с 74% - към края на вегетацията. Биологичният препарат произведен на база местен щам антагонист *Trichoderma viride* Trv1 успешно може да се използва за извеждане на биологична борба с бяло гниене при пипер отглеждан в оранжерийни условия.