

АГРАРЕН УНИВЕРСИТЕТ – ПЛОВДИВ

*ФАКУЛТЕТ ПО РАСТИТЕЛНА ЗАЩИТА И
АГРОЕКОЛОГИЯ*

КАТЕДРА ЕНТОМОЛОГИЯ

КОСТАДИН КИРИЛОВ ТРАЯНОВ

***РАСТИТЕЛНИ ПАРАЗИТНИ НЕМАТОДИ ОТ
РОД GLOBODERA SKARBILOVICH, 1959 ПО
КАРТОФИТЕ В БЪЛГАРИЯ***

АВТОРЕФЕРАТ

**НА ДИСЕРТАЦИЯ ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОНС „ДОКТОР”
Научна специалност – „Растителна защита” (Ентомология)**

НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ

ПРОФ. Д.С.Н. ХАРИ САМАЛИЕВ

Пловдив, 2021

Дисертационният труд е написан на 128 страници и съдържа 24 таблици и 16 фигури. В списъка с цитирана литература са посочени 248 източника, от които 5 на кирилица и 243 на латиница.

Експерименталната и лабораторна работа е изведена в катедра „Ентомология” и катедра „Генетика и селекция” към Аграрен университет – Пловдив, Институт по зеленчукови култури „Марица” – Пловдив, Институт по растителни генетични ресурси „К. Малков” – Садово, Централна лаборатория по карантина на растенията – София, Институт по почвознание, агротехнологии и защита на растенията „Никола Пушкиров” – София, през периода 2016-2019 година.

Дисертационният труд е обсъден и предложен за защита с протокол № 07/16.02.2021 г. от катедрен съвет на катедра „Ентомология”, факултет по Растителна защита и Агроекология при Аграрен университет – Пловдив.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на.....г. от.....ч., в.....аудитория на Аграрен университет – Пловдив пред специализирано научно жури, утвърдено със заповед на Ректора № РД 16-211/05.03.2021 г.

Рецензии от:

проф. д-р Радослав Андреев Андреев
доц. д-р Винелина Панайотова Янкова-Михайлова

Становища от:

проф. д-р Вили Борисова Харизанова
проф. д-р Веселин Александров Арнаудов
проф. д-р Марияна Йорданова Иванова

Благодарности

Издавам своята признателност към научния ми ръководител проф. д.с.н. Хари Самалиев за времето, съветите и усилията, които вложи в реализирането на настоящото проучване.

Благодаря на колектива на катедра „Ентомология” за подкрепата, ценните съвети и помощта, които не пестяха по време на обучението ми като докторант, както и за професионалното отношение, което оценявам високо.

Материалите по защитата са на разположение на сайта на Аграрен университет – Пловдив – www.au-plovdiv.bg

1. УВОД

Картофите са ценна продоволствена култура и не напразно са наречени втори хляб. Хранителното им значение се определя от богатото им съдържание на скорбяла, както и от наличието на много други ценни вещества, като протеини, аминокиселини, захари, витамини и други. Значението на картофите като храна за селскостопанските животни също е много голямо и се определя от факта, че те са не само богати на хранителни вещества, но са и сочен фураж, особено ценен за млечните животни и свинете. Картофите също са и ценна техническа суровина, от която се получават нишесте, спирт, малтоза, декстрин, лепило каучук и други. Също така е важно да се отбележи, че картофите заемат площи, които са малко пригодни за други земеделски култури.

По данни на отдел „Агrostатистика” към Министерството на земеделието, храните и горите, продукцията от зеленчуци за реколта 2019 г. е в размер на 752.1 хил. тона. Най-голямо е производството на картофи – 197.4 хил. тона.

По време на вегетацията на картофените растения се създават условия, които са благоприятни за развитието на различни болести и неприятели, в това число и растително-паразитни нематоди. Основните видове паразитни нематоди с икономическо значение за картофите принадлежат към родовете *Globodera*, *Pratylenchus*, *Meloidogyne* и *Ditylenchus*. С най-голямо значение за картофите това са паразитните видове нематоди от род *Globodera*, а именно *Globodera rostochiensis* (Wollenweber, 1923) Behrens 1975 и *Globodera pallida* (Stone, 1973) Behrens 1975 (картофени цистообразуващи нематоди - КЦН). Картофените цистообразуващи нематоди са ендопаразити по корените на картофите, които са трудни за контрол, поради това, че формират цисти съдържащи яйца и ларви, които остават жизнеспособни в почвата повече от 15 години. Все още основният метод за борба срещу вредителите по културните растения, в това число и срещу нематодите е химичният. Въпреки това, този метод е нерентабилен и екологично опасен, защото замърсява почвата и растителната продукция, а също така оказва негативно влияние върху полезната микрофлора в почвата. Това налага използването на други способности и подходи за борба – например устойчиви или толерантни сортове картофи, а също така проучването и приложението на различни по своя състав биологични продукти с бактериален или ботанически произход, които притежават различен механизъм на действие срещу КЦН.

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО

Целта на дисертационния труд е да се установи видовия състав и разпространение на цистообразуващи нематоди от род *Globodera* в картофените насаждения на основните производителни области на

територията на България, както и да се проучат възможностите за алтернативни средства за борба с тези паразити.

За реализиране на тази цел са поставени следните задачи:

1. Проучване разпространението на цистообразуващите нематоди от род *Globodera* по картофите (КЦН).
2. Морфологична и молекулярна характеристика на установените видове КЦН.
3. Установяване на реакцията (устойчивост/чувствителност) на картофени сортове/линии към *Globodera pallida* и *Globodera rostochiensis*.
4. Селекция на ефективни агенти за биологичен контрол с КЦН:
 - а) Скриниране на растителни екстракти, като възможни агенти за биологична борба с КЦН от род *Globodera*
 - Установяване факторите, определящи ефикасността на селектираните растителни екстракти (*Juglans regia*, *Ruta graveolens* и *Plantago major*) срещу яйца и ларви втора възраст (Л₂) на *G. rostochiensis* и *G. pallida* – *in vitro*;
 - Установяване на метаболитните им профили (налични вещества) на *J. regia*, *R. graveolens* и *P. major*, чрез газ хроматография – мас спектрометрия (ГХ-МС).
 - б) Скриниране на ризобактерии, като възможни агенти за контрол с *Globodera* spp.
 - Проучване факторите, определящи ефикасността на селектираната ризобактерия *Serratia plymuthica* изолат 72 срещу яйца и Л₂ на *G. pallida* – *in vitro*;
 - *In vivo*, установяване ефикасността на *S. plymuthica* изолат 72 срещу инвазията, развитието и размножаването на *G. pallida* по картофите;

3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

3.1. Събиране на изходен материал

Почвените проби са събрани през втората половина на вегетацията и в края/след вегетацията на картофите и обхваща 15 района на територията на четири области – Софийска, Пазарджишка, Смолянска и Бургаска.

3.2. Морфологично и молекулярно идентифициране на *G. rostochiensis* и *G. pallida*

3.2.1. Морфологична характеристика

При идентифицирането на видовете от род *Globodera* spp. са изследвани цисти и ларви 2-ра възраст.

Получените резултати от морфометричната характеристика са сравнени със съответните стойности и за двата вида по литературни данни (EPPO, 2013).

3.2.2. Молекулярна характеристика

Молекулярна характеристика на популациите е извършена посредством метода на полимеразната верижна реакция.

Постановката на експеримента е подробно описан в съответния раздел на дисертацията.

3.3. Методи на проучванията за установяване реакцията на картофени сортове и линии към *Globodera* spp.

3.3.1. Растителен материал от *Solanum tuberosum* за тестиране

За установяване на реакцията им спрямо КЦН са скринирани тринадесет линии *S. tuberosum* - Е 1809, Е 606, Е 1789, Е 1096, Е 1811, Е 1210, Е 68, Е 292, Е 330, Д 112, Д 348, Д 497, Д 344 и седем търговски сорта - Cronos, Cekin, Gandawa, Gawin, Owacij, Ivetta и Desiree (контрола)¹

3.3.2. Скриниране на картофени сортове и линии за установяване относителната устойчивост/чувствителност към *Globodera* spp.

Относителната устойчивост на всеки от тестваните сортове/линии към КЦН е изчислена, като % от неустойчивия сорт картофи (контрола) (метод на Seinhorst, 1986), след което е определена степента на устойчивост/чувствителност по скала 1 - 9 (OEPP/EPPO, 2006) (табл. 1).

Таблица 1

Относителна чувствителност %	*скала
< 1	9
1.1 – 3	8
3.1 – 5	7
5.1 – 10	6
10.1 – 15	5
15.1 – 25	4
25.1 – 50	3
50.1 – 100	2
> 100	1

*Скала: от 1 до 9 (9 / 1 – силно устойчив / силно чувствителен)

3.4. Методи на изследванията за определяне ефикасността на препарати/изолати с микробиален произход и препарати/екстракти с ботанически произход към *G. pallida*/*G. rostochiensis*

3.4.1. Тестови бактерии

В експеримента са включени местни изолати² на: *Pseudomonas chlororaphis* изолат 109А, *Pseudomonas chlororaphis* изолат Ро4, *Bacillus amyloliquefaciens* изолат 162, *Bacillus pumilus* изолат 109, *Bacillus amyloliquefaciens* изолат 185, *Bacillus amyloliquefaciens* изолат 186, *Bacillus megaterium* изолат 95, *Bacillus megaterium* изолат 174, *Bacillus subtilis*

¹Различните сортове и линии ни бяха предоставени, с любезното съдействие на доц. д-р Емилия Начева (ИЗК „Марица“, Пловдив) и главен експерт Дора Бондова (Опитна станция по картофите - гр. Самоков)

²Тестовите изолати с микробиален произход, ни бяха предоставени във вид на културална течност с титър $\times 10^8$ клетки/ml/безклетъчен филтрат, с любезното съдействие на доц. В. Тринговска - ИЗК „Марица“, Пловдив.

изолат 132, *Bacillus subtilis* изолат 164, *Serratia plymuthica* изолат 201 и *Serratia plymuthica* изолат 72.

- Култивиране на бактериални изолати

За целите на експеримента от съответните бактериални изолати са приготвяни *стартер култури*. За целта 2 ml от разредената 1/10 течна хранителна среда е добавен съответният бактериален инокулум. Епруветките са поставени на тъмно в шейкър инкубатор при 27°C и 140 оборота за 12 часа. За подготвяне на *тест културите* 10 µl от съответната стартер културата е култивирана в 10 ml хранителната среда след което епруветките са поставени на тъмно в шейкър инкубатор при 24°C и 140 оборота за 72 часа. Концентрацията на бактериалните клетки в културалната течност е определена с помощта на спектрофотометър. Необходимата концентрация (културална течност с титър $\times 10^8$ клетки/ml) е получена чрез разреждане със СДВ.

- Приготвяне на безклетъчни филтрата (БФ)

За целта тестовите бактерии са култивирани, както е посочено в т. 3.4.1. След което бактериалната суспензия ($\times 10^8$ клетки/ml) от съответния тестван изолат е центрофугирана двукратно при 4000 rpm за 10 min. Екстрахираният БФ е филтруван допълнително през бактериално сито с диаметър на отворите 0.45 µm, с цел пълното отстраняване на бактериалните клетки и остатъчни частици във филтрата. Необходимите за експериментите концентрации са получени чрез разреждане със СДВ.

3.4.3. Тестови растителни екстракти

- *Растителен материал*

За целта на експеримента са използвани напълно развити растения на *Tanacetum vulgare*, *Artemisia vulgaris*, *Allium ursinum*, *Tagetes patula*, *Yuglans regia*, *Salvia officinalis*, *Ruta graveolens*, *Plantago major* представители на българската флора³.

- *Приготвяне на растителни екстракти*

Постановката на конкретния експеримент е подробно описан в дисертацията.

- Газ хроматография – мас спектрометрия анализи (ГХ-МС)

Постановката на конкретния експеримент е подробно описан в дисертацията.

3.5. Лабораторни опити

3.5.1. Скриниране на БФ на бактериални изолати и растителни екстракти за ефикасността им срещу *Globodera spp.*

³Тестовите растителни екстракти, ни бяха предоставени във вид на суров екстракт (ml/mg), с любезното съдействие на доц. М. Николова, БАН, София.

Използвани са стандартни нематологични методи за установяване ефикасността на бактериални изолти и растителни екстракти срещу ларви и цисти на *Globodera* spp.

Със селектираните бактериални изолати/растителни екстракти показали най-добър резултат са проведени експерименти при контролирани условия по адаптирана за *Globodera* spp. методика на Samaliev et al. (2000): - „*in vitro*“, за установяване влиянието на концентрацията и експозицията на съответния бактериален щам/растителен екстракт върху излюпването на L_2 и върху L_2 на *G. pallida*, както и - „*in vivo*“, за определяне на ефективността на съответния селектиран/и бактериален щам/растителен екстракт върху инвазията на L_2 и развитието на *G. pallida* в корените на растенията.

3.5.2. „*In vitro*“ експерименти

3.5.2.1. Установяване влиянието на концентрацията/температурата и експозицията на селектиран бактериален изолат (бактериална суспензия на *S. plymuthica* изолат 72) върху L_2 на *G. pallida*

Използвани са стандартни нематологични методи за установяване ефикасността на бактериален изолат (бактериална суспензия на *S. plymuthica* изолат 72) върху L_2 на *G. pallida*.

Постановките на конкретните експерименти са подробно описани в дисертацията.

3.5.2.2. Установяване влиянието на концентрацията/температурата и експозицията на бактериален изолат (бактериална суспензия на *S. plymuthica* изолат 72) върху излюпването на L_2 на *G. pallida*

Използвани са стандартни нематологични методи за установяване ефикасността на бактериален изолат (бактериална суспензия на *S. plymuthica* изолат 72) върху L_2 на *G. pallida*. Процентът на излюпване е изчисляван по формулата:

$$\text{процент на излюпване} = \text{излюпени } L_2 \times 100 / \text{пълни яйца} + L_2$$

Постановките на конкретните експерименти са подробно описани в дисертацията.

3.5.2.3. Установяване влиянието на концентрацията/температурата и експозицията на безклетъчен филтрат (БФ) *S. plymuthica* изолат 72 и растителни екстракти *J. regia*, *R. graveolens* и *P. major* върху L_2 на *G. pallida*

Използвани са стандартни нематологични методи за установяване ефикасността на безклетъчен филтрат (БФ) *S. plymuthica* изолат 72 и растителни екстракти *J. regia*, *R. graveolens* и *P. major* върху L_2 на *G. pallida*. Постановките на конкретните експерименти са подробно описани в дисертацията.

3.5.2.4. Установяване влиянието на концентрацията/температурата и експозицията на безклетъчен филтрат (БФ) *S. plymuthica* изолат 72 и растителни екстракти *J. regia*, *R. graveolens* и *P. Major* върху излюпването на L_2 на *G. pallida*

Използвани са стандартни нематологични методи за установяване ефикасността на безклетъчен филтрат (БФ) *S. plymuthica* изолат 72 и растителни екстракти *J. regia*, *R. graveolens* и *P. major* върху L_2 на *G. pallida*. Процента на излюпване е изчисляван по формулата:

$$\text{процент на излюпване} = \frac{\text{излюпени } L_2 \times 100}{\text{пълни яйца} + L_2}$$

Постановките на конкретните експерименти са подробно описани в дисертацията.

3.5.3. „In vivo” експерименти

3.5.3.1. Влияние на бактериална суспензия (БС)/безклетъчен филтрат (БФ) *S. plymuthica* изолат 72 върху инвазията на L_2 на *G. pallida* в корените на растенията

Експериментът е изведен по модифицирания метод на Philips et al. (1980).

Постановките на конкретните експерименти са подробно описани в дисертацията.

3.5.3.2. Влияние на бактериална суспензия (БС)/безклетъчен филтрат (БФ) *S. plymuthica* изолат 72 върху развитието на *G. pallida* в корените на растенията

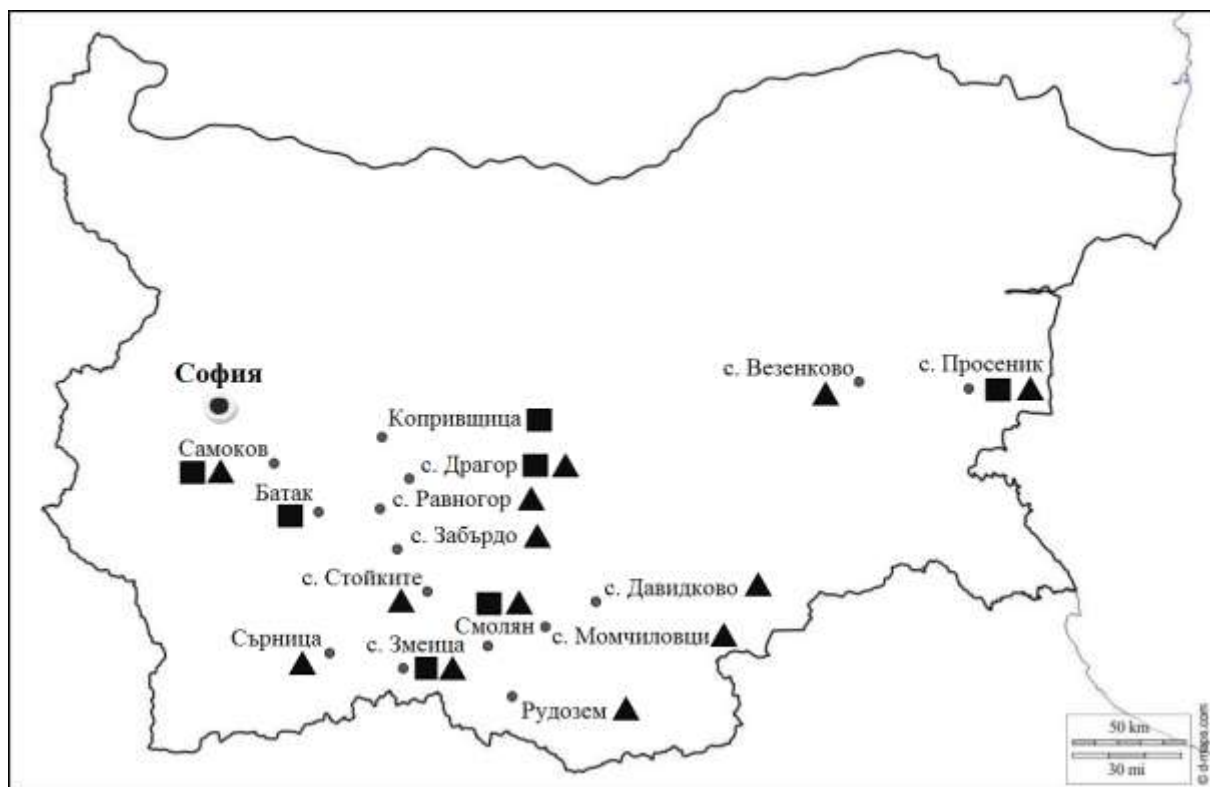
Постановките на конкретните експерименти са подробно описани в дисертацията.

4. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

4.1. КЦН *Globodera* spp. в агроценозата на картофите

4.1.1. Разпространение и видов състав на *Globodera* spp.

Областите и населените места, от които са взети проби за изследване и установяване на разпространението на картофените цистообразуващи нематоди по картофите са представени в таблица 2 и фигура 1. Резултатите показват, че от изследваните общо 199 проби от 15-те района на Пазарджишка, Софийска, Смолянска и Бургаска области, КЦН бяха установени в 15 от тях (табл. 2; фиг. 1), т.е. разпространението на картофените цистообразуващи нематоди в картофените насаждения на изследваните райони беше 100%.



Фигура 1. Изследвани райони в четирите области – Софийска, Пазарджишка, Смолянска и Бургаска; ■ - *G. rostochiensis*; ▲ - *G. pallida*; за периода 2017-2019 г.

Таблица 2. Разпространение, видов състав и популационната плътност на картофените цистообразуващи нематоди /КЦН/ от род *Globodera* в Пазарджишка, Софийска, Смолянска и Бургаска области за периода 2017-2019 г.

Населено място		Брой проби		Вид КЦН		Плътност (Брой цисти/100 g почва)	
				<i>G.rostochiensis</i>		<i>G. pallida</i>	
Пазарджишка област							
Равногор		20		-		+	
Драгор		12		+		+	
Сърница		18		-		+	
Батак		15		+		-	
Софийска област							
Копривщица		18		+		-	
Самоков		14		+		+	
Смолянска област							
Смолян		17		+		+	
Момчиловци		13		-		+	
Давидково		12		-		+	
Рудозем		9		-		+	
Стойките		3		-		+	
Забърдо		18		-		+	
Змеица		22		+		+	
Бургаска област							
Просеник		5		+		+	
Везенково		3		-		+	

Резултатите в таблица 2 показват, че броят на екстрахираните от почвените проби цисти варира от 3.5 до 610. Най-висока плътност е отчетена в площите на Равногор (610 цисти/100 g почва), а най-ниска (3.5 цисти/100 g почва) във Везенково.

По отношение на видовия състав се установи, че в изследваните площи са разпространени и двата вида КЦН - *G. rostochiensis* и *G. pallida*. В 13 района е идентифицирана *G. pallida*, а в 7 - *G. rostochiensis*.

Двата вида са разпространени самостоятелно или в асоциация, както следва: *G. pallida* се установи в девет от насажденията самостоятелно, в пет - съвместно с *G. rostochiensis*. В пет от районите се установи *G. rostochiensis* в асоциация с *G. pallida*, а *G. rostochiensis* самостоятелно се установи в два от районите (Батак и Копривщица) на изследваните картофопроизводителни облсти (табл. 2).

4.1.2. Морфологично и молекулярно идентифициране на *G. rostochiensis* и *G. pallida*

4.1.2.1. Морфологична характеристика

Получените резултати от морфологичната идентификация на цисти и Л₂, показаха, че последните принадлежат към род *Globodera*.

Проби 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, и 15 са морфологично идентифицирани като *Globodera pallida* (табл. 3 и 4).

Измерените от нас средни стойности за Л₂, като дължина на тялото 469.83 µm (395.22 – 519.85) и дължина на стилета 23.04 µm (20.44 – 25.29), са в границите в сравнение със стойностите на референтните данни (табл. 3). стойностите на другите характеристики на Л₂, като дължината на опашката и хиалиновата област на опашката, имат малки разлики в сравнение със стойностите им, посочени в литературните данни (EPPO 2013). Измерените средни стойности за цисти като разстояние на анус-фенестър 48.22 µm (36.58 – 74.22) и брой на кутикуларни гънки 8.38 (7.00 – 11.00) са в границите в сравнение с техните стойности на референтните данни (табл. 3). Средните стойности на другите характеристики за цисти - отношение на Гранек имат малки разлики в сравнение със стойностите им, посочени в литературните данни (EPPO 2013).

Останалите две проби – 13 и 14, са морфологично идентифицирани като *Globodera rostochiensis* (табл. 3 и 4). Средните стойности на основните белези за ларви 2-ра възраст - дължина на тялото 451.07µm (427.25 - 474.89); дължина на опашката 43.65µm (39.44 – 47.77); хиалинова област на опашката 24.81 µm (21.52 - 28.10) и дължина на стилета 21.80 µm (21.12 - 22.48), са в границите с техните референтни стойности по литературни данни (табл. 3). Измерените средни стойности за цисти като брой на кутикуларните гънки 18.00 (18.00 – 18.00) са в границите в сравнение с техните стойности на референтните данни (табл. 3). Средните стойности на другите характеристики за цисти – разстояние анус-фенестър и отношение

на Гранек варира най-много в сравнение със стойностите им, посочени в литературните данни (EPPO 2013).

Таблица 3. Морфометрични характеристики на ларви 2-ра възраст и цисти на *G.rostochiensis*/*G. pallida* от български популации в сравнение с характеристиките на OEPP / EPPO Buletin (2013). Измерванията на ларви 2-ра възраст и цисти от български популации са в μm и са представени като средно $\pm$ s.d.

	<i>G. pallida</i> * (n = 13)	<i>G. rostochiensis</i> * (n = 2)	<i>G. pallida</i> **	<i>G. rostochiensis</i> **
Ларви 2-ра възраст				
Дължина на тялото	469.83 $\pm$ 29.02 (395.22 - 519.85)	451.07 $\pm$ 33.68 (427.25 - 474.89)	452- 486	392- 468
Дължина на опашката	44.98 $\pm$ 8.96 (30.91 - 59.01)	43.65 $\pm$ 5.89 (39.44 - 47.77)	50-53	44 - 51
Дължина на хиалиновата област	23.13 $\pm$ 3.11 (17.29 - 28.10)	24.81 $\pm$ 4.65 (21.52 - 28.10)	26-27	20-27
Дължина на стилета	23.04 $\pm$ 1.38 (20.44 - 25.29)	21.80 $\pm$ 0.96 (21.12 - 22.48)	23-24	20-22
Цисти				
Разстояние анус-фенестър	48.22 $\pm$ 10.33 (36.58 - 74.22)	106.56 $\pm$ 4.28 (103.53 - 109.59)	48-54	51-70
Диаметър фенестър	23.98 $\pm$ 4.86 (18.60 - 36.53)	16.70 $\pm$ 3.74 (14.05 - 19.35)	***	***
Отношение на Гранек	2.12 $\pm$ 0.65 (1.38 -3.93)	6.58 $\pm$ 1.73 (5.35 - 7.80)	2.1-2.5	3.0-4.5
Брой на кутикуларните гънки	8.38 $\pm$ 1.19 (7.00 - 11.00)	18.00 $\pm$ 0.00 (18.00 - 18.00)	12	17-20

*стойности от български популации на *G. pallida*/*G.rostochiensis*; ** съгласно бюлетина на OEPP/EPPO (2013); ***няма данни;

Таблица 4. Морфометрични характеристики на цисти и ларви 2-ра възраст на *Globodera rostochiensis* и *Globodera pallida* на проби от български популации. Всички измервания са в μm .

Номер на изследваната проба п*	Ларви 2-ра възраст				Цисти				Видова принадлежност
	Дължина на тяло	Дължина на опашка	Дължина на хиалинова област	Дължина на стилета	Разстояние анус-фенестър	Диаметър фенестър	Отношение на Гранек	Брой кутикуларни гънки	
1. Равногор	491.75	59.01	25.29	22.48	36.81	20.51	1.79	9	<i>G. pallida</i>
2. Драгор	463.65	53.39	28.10	25.29	38.74	21.82	1.77	8	<i>G. pallida</i>
3. Сърница	491.75	50.58	22.48	22.48	39.34	25.29	1.55	8	<i>G. pallida</i>
4. Самоков	519.85	50.58	19.67	25.29	50.58	36.53	1.38	9	<i>G. pallida</i>
5. Смолян	476.38	53.55	25.64	21.74	50.90	20.25	2.51	8	<i>G. pallida</i>
6. Момчиловци	455.88	49.13	26.03	22.76	36.58	18.60	1.97	8	<i>G. pallida</i>
7. Давидково	454.18	44.39	23.62	22.62	43.78	22.43	1.95	8	<i>G. pallida</i>
8. Рудозем	465.21	45.14	22.66	22.82	49.86	23.84	2.09	9	<i>G. pallida</i>
9. Стойките	469.85	32.45	19.62	24.64	56.42	20.16	2.79	11	<i>G. pallida</i>
10. Забърдо	483.77	35.30	22.28	22.82	46.73	23.63	1.98	7	<i>G. pallida</i>
11. Змеица	395.22	35.26	17.29	20.44	46.73	23.63	1.98	7	<i>G. pallida</i>
12. Просеник	457.06	45.11	24.83	23.76	74.22	24.12	3.07	10	<i>G. pallida</i>
13. Батак	474.89	47.77	28.10	22.48	109.59	14.05	7.80	18	<i>G. rostochiensis</i>
14. Копривщица	427.25	39.44	21.52	21.12	103.53	19.35	5.35	18	<i>G. rostochiensis</i>
15. Везенково	483.32	30.91	16.86	22.48	56.20	30.91	1.82	7	<i>G. pallida</i>
GRO**	392-468	44-51	20-27	20-22	51-70	***	3.0-4.5	17-20	
GPA**	452-486	50-53	26-27	23-24	48-54	***	2.1-2.5	12	

* номер на изследваната проба цисти / Л₂; ** съгласно бюлетина на OEPP / EPPO (2013); ***няма данни

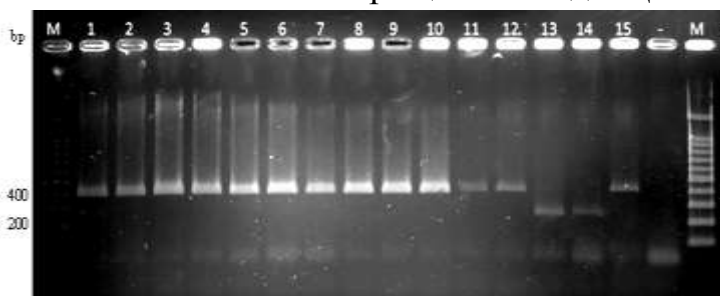
4.1.3. Молекулярна характеристика

За целта на изследването са използвани набор от ген-специфични праймери (табл.5), с цел установяване на видова принадлежност.

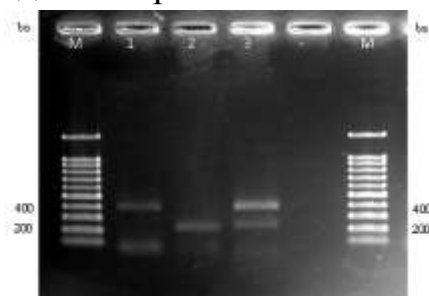
Таблица 5. Ген-специфични праймери за установяване на видова принадлежност при представители от род *Globodera*

Вид	Праймер	Очакван продукт (bp)
<i>G. rostochiensis</i>	UNI-5'-GCAGTTGGCTAGGGATCTTC-3' GPA1-5'-GGTGACTCGACGATTGCTGT-3'	239
<i>G. pallida</i>	GRO5A- 5'-ATGTTGTAC GTGCCGTACCTT-3'	391

Прилагането на мултиплексния PCR метод с праймерите UNI, GPA1 и GRO1 позволява да се разграничат *G. rostochiensis* и *G. pallida* (фиг. 2), на базата на получените фрагменти съответно от 391 bp за *G. pallida* и 239 bp за *G. rostochiensis*, а също така дава възможност и за точното идентифициране на всеки вид *Globodera* при анализиране на смесени популации в единична реакция (фиг. 3). Фигура 2 представя електрофоретични профили от мултиплексен PCR на анализирани проби от цистообразуващи нематоди. Трите праймера амплифицират продукти от малък регион между вътрешния транскрибиран спейсър 1 (ITS1) и 5.8 S рибозомния РНК генен регион, който е изключително показателен чрез конституитивното си присъствие. Този регион е идентифициран като подходящ за класифициране, молекулярна диагностика и филогенетични реконструкции на различни организми и на различни таксономични нива, включително растително-паразитни нематоди (Marek et al., 2010; Douda et al., 2013). Методът на мултиплексния PCR анализ, е надежден и лесно приложим за бърза идентификация на различните КЦН в лабораторни условия, който успешно допълва основния морфологичен метод за разграничаване на двата вида. Въз основа на комбинираните данни от морфологичните характеристики и приложените молекулярни методи, картофените цистообразуващи нематоди, открити в България, съдържат *G. pallida* като най-често срещаният вид КЦН в изследваните региони.



Фигура 2. Продукти от мултиплекс PCR с използване на праймери UNI, GPA1 и GRO1; линия M - 100bp молекулярен маркер; редове 1-15 - КЦН проби; линия - отрицателен контрол



Фигура 3. Мултиплекс PCR с използване на праймери UNI, GPA1 и GRO1; линия M-100 bp молекулярен маркер; линия 1-*G. pallida*; линия 2-*G.rostochiensis*; линия 3-смесени популации (*G.pallida*/*G.rostochiensis*);-отрицателна контрола

4.2. Скриниране на картофени сортове и линии за установяване относителната устойчивост/чувствителност към *Globodera* spp.

G. rostochiensis

От данните, представени в таблица 6 се вижда, че тестваните картофени сортове/линии за устойчивост към *G. rostochiensis* реагират по различен начин.

Установено беше, че 13 от общо 13 тествани картофени сортове/линии са устойчиви на *G. rostochiensis* - индекс на устойчивост от 5 до 9.

G. pallida

Резултатите показват, че 5 от общо 13 тествани картофени сортове/линии са силно чувствителни към *G. pallida* – индекс от 1 до 2. Два от тестваните сортове Cronos и Ivetta, както и линия Е 1096 е установена устойчивост към *G. pallida* индекс на устойчивост – 5. От тестваните линии Е 1811, Е 1809, Е 606 и Е 68 е установена толерантност към *G. pallida* (индекс – 3 и 4).

Таблица 6. Относителна чувствителност на различни картофени сортове/линии към *G. rostochiensis* (популация Копривщица) и *G. pallida* (популация Равногор)

популация (контролация) G. pallida (популация Гълъбог)				
No	Сорт/кандидат сорт	Устойчив към <i>Globodera</i>	Индекс на устойчивост*	
			<i>G. rostochiensis</i>	<i>G. pallida</i>
Сортове				
1	Desiree контрола	Чувствителен	1	1
2	Cronos	Ro1,Ro4; Pa2, Pa3	8	5
3	Chekin	Ro1,Ro4; Pa3	8	1
4	Gandawa	Ro1,Ro3, Ro4; Pa3;	9	1
5	Gawin	Ro1,Ro3,Ro4; Pa3	7	2
6	Owacij	Ro1,Ro3,Ro4; Pa3	8	2
7	Ivetta	Ro1,Ro3; Pa2,Pa3	9	5
Линии				
1	E 1789	Неустановена	7	
2	E 606	Неустановена	7	
3	E 1096	Неустановена	8	
4	E 1809	Неустановена	8	
5	Д 344	Неустановена	7	
6	Д 497	Неустановена	6	
7	Д 348	Неустановена	7	
8	E 1811	Неустановена		3
9	E 1809	Неустановена		4
10	E 1096	Неустановена		5
11	E 606	Неустановена		4
12	Д 348	Неустановена		2
13	E 68	Неустановена		3
14	Desiree (контрола)	Чувствителен	1	1

*Скала: от 1 до 9 (1- силно чувствителен; 2-3 чувствителен; 4-5 толерантен; 6-8-устойчив, силно устойчив-9)

4.3. Лабораторни опити „in vitro“

4.3.1. Скриниране на БФ на бактериални изолати и растителни екстракти за ефикасността им срещу *Globodera* spp.

Резултатите от проведения скрининг на различни бактериални изолати и растителни екстракти показват, че всички 12 тествани БФ на бактериални изолати и 8 растителни екстракти проявяват нематоциден ефект спрямо L_2 на *Globodera* spp. (табл. 7 и 8).

Таблица 7. Ефикасност на БФ на бактериални изолати срещу *G. rostochiensis* и *G. pallida* след 72 часа експозиция при температура $22 \pm 1^\circ\text{C}$

Варианти	<i>G. rostochiensis</i>		<i>G. pallida</i>	
	Брой живи	Смъртност (%)*	Брой живи	Смъртност (%)*
БФ на бактериални изолати**				
<i>Serratia plymuthica</i> 72	14.00g***	86.00	16.00f	84.00
<i>Serratia plymuthica</i> 201	38.00f	62.00	46.00d	54.00
<i>Bacillus pumilus</i> 109	58.00c	42.00	60.00c	40.00
<i>Bacillus megaterium</i> 95	70.00b	30.00	75.00b	25.00
<i>Bacillus subtilis</i> 132	46.00e	54.00	52.00d	48.00
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 162	60.00c	40.00	64.00c	36.00
<i>Bacillus subtilis</i> 164	82.00a	18.00	90.00a	10.00
<i>Bacillus megaterium</i> 174	85.00a	15.00	88.00a	12.00
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 185	19.00g	81.00	20.00ef	80.00
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 186	90.00a	10.00	87.00a	13.00
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> 109A	50.00de	50.00	59.00c	41.00
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Po4	20.00g	80.00	26.00e	74.00

*%спрямо контролата; **концентрация 5%; ***a,b,c,... степен на доказаност при $P_{0.05}$ по Duncan's Multiple Range Test

Таблица 8. Ефикасност на растителни екстракти срещу *G. rostochiensis* и *G. pallida* след 72 часа експозиция при температура $22 \pm 1^\circ\text{C}$

Варианти		<i>G. rostochiensis</i>		<i>G. pallida</i>	
		Брой живи	Смъртност (%)*	Брой живи	Смъртност (%)*
Растителни екстракти**					
растителен вид	растителна част				
<i>Tanacetum vulgare</i> 21 (вратига)	надземна част – цветове	58.00d	42.00	60.00de	40.00
<i>Allium ursinum</i> 30 (мечи лук)	надземна част – листа	76.00b	24.00	77.00b	23.00
<i>Tagetes patula</i> 11 (турта)	надземна част – цветове	70.00c	30.00	67.00c	33.00
<i>Artemisia absinthium</i> 10 (обикновен пелин)	надземна част – листа и цветове	62.00d	38.00	66.00cd	34.00
<i>Yuglans regia</i> 16 (зелено орехче)	надземна част – зелени плодчета	20.00g	80.00	22.00g	78.00
<i>Salvia officinalis</i> 50 (градински чай)	надземна част – листа	81.00a	19.00	88.00a	12.00
<i>Ruta graveolens</i> (седефче)	надземна част – листа и цветове	31.00f	69.00	33.00f	67.00
<i>Plantago major</i> (живовлек)	надземна част – листа	53.00e	47.00	58.00e	42.00

*%спрямо контролата; **концентрация 5%; ***a,b,c,... степен на доказаност при $P_{0.05}$ по Duncan's Multiple Range Test

Получените резултати от първичния скрининг показват, че от бактериалните изолати – *Serratia plymuthica* 72 демонстрира най-висока ефикасност спрямо тестваните видове КЦН (табл. 7), а от растителните екстракти – *Yuglans regia* 16, следван от *Ruta graveolens* и *Plantago major* (табл. 8).

Получените първоначални резултати ни дават основание да продължим по-нататъшните *in vitro* и *in vivo* експерименти за установяване на ефикасността на бактериален изолат *Serratia plymuthica* 72 и растителни екстракти *Yuglans regia* 16, *Ruta graveolens* и *Plantago major*, като средства за контрол на *Globodera* spp. с *G. pallida*.

4.3.2. Установяване влиянието на концентрацията/температурата и експозицията на растителни екстракти *J. regia*, *R. graveolens* и *P. major* върху L_2 на *G. pallida*

4.3.2.1. Установяване влиянието на концентрацията и експозицията на растителни екстракти *J. regia*, *R. graveolens* и *P. major* върху L_2 на *G. pallida*

Резултатите от проведените експерименти представени в таблица 9 показват, че всички тествани растителни екстракта проявяват нематоциден ефект спрямо L_2 на *G. pallida*.

Нематоцидният ефект на растителните екстракти върху L_2 на *G. pallida* е различен при различна концентрация и експозиция. С повишаване на концентрацията и експозицията на L_2 в разтворите от растителен екстракт е отчетено повишаване смъртността им спрямо контролата.

Таблица 9. Ефикасност на растителни екстракти срещу L_2 *G. pallida* при различни концентрации и експозиция при температура $22\pm 1^\circ\text{C}$

Варианти/ Експозиция*	Растителни екстракти	
	<i>Globodera pallida</i>	
	Брой живи	Смъртност (%)**
	2.5%***	
1	2	3
<i>Juglans regia</i>		
24 часа	85.25a****	14.75
48 часа	74.25c	25.75
72 часа	63.00ef	37.00
<i>Ruta graveolens</i>		
24 часа	87.25a	12.75
48 часа	79.25b	20.75
72 часа	66.50de	33.50
<i>Plantago major</i>		
24 часа	88.25a	11.75
48 часа	80.25b	19.75
72 часа	68.25d	31.75
5.0%		
<i>Juglans regia</i>		
24 часа	67.25de	32.75
48 часа	41.25k	58.75
72 часа	21.00mn	79.00

Таблица 9 (продължение)

1	2	3
<i>Ruta graveolens</i>		
24 часа	79.25b	20.75
48 часа	67.25de	32.75
72 часа	34.25l	65.75
<i>Plantago major</i>		
24 часа	80.25b	19.75
48 часа	68.25d	31.75
72 часа	57.25gh	42.75
10.0%		
<i>Juglans regia</i>		
24 часа	51.25i	48.75
48 часа	30.25l	69.75
72 часа	18.25n	81.75
<i>Ruta graveolens</i>		
24 часа	54.25hi	45.75
48 часа	46.25j	53.75
72 часа	24.00m	76.00
<i>Plantago major</i>		
24 часа	73.25c	26.75
48 часа	59.25f	40.75
72 часа	39.75k	60.25

*експозиция на растителните екстракти върху L_2 ; ***% спрямо контрола; ***концентрация на растителните екстракти; ****a,b,c,... степен на доказаност при $P_{0.05}$ по Duncan's Multiple Range Test

Най-висок процент на смъртност на L_2 , е отчетено при експозиция от 72 часа в 10.0% концентрация, като броят на мъртвите L_2 при съответните растителни екстракти беше както следва *G. pallida* – 81.75% (*J. regia*), 76.00% (*R. graveolens*) и 60.25% (*P. major*). Най-висок процент на смъртност на L_2 е отчетено при растителен екстракт *J. regia* при всички тествани концентрации и експозиции. Най-нисък процент на смъртност на L_2 е отчетено при растителен екстракт *P. major* при всички тествани концентрации и експозиции. В контролите не са отчетени мъртви L_2 .

4.3.2.2. Установяване влиянието на температурата и експозицията на растителни екстракти *J. regia*, *R. graveolens* и *P. major* върху L_2 на *G. pallida*

Резултатите описани в таблица 10 показват, че ефикасността на растителните екстракти *J. regia*, *R. graveolens*, *P. major* също зависи, както от експозицията така и от температурата. При всички тествани температурни стойности и експозиции е отчетено нематочиден ефект на тестваните екстракти.

Таблица 10. Ефикасност на растителни екстракти *J. regia*, *R. graveolens*, *P. major* (концентрация 5%) срещу L_2 на *G. pallida* при различни експозиция и температура

Варианти/ Експозиция*	<i>Globodera pallida</i>	
	Брой живи	Смъртност (%)**
	температура $14 \pm 1^\circ C$	
1	2	3
<i>Juglans regia</i>		
24 часа	81.50b***	18.50

Таблица 10 (продължение)

1	2	3
48 часа	75.50c	24.50
72 часа	64.50fg	35.50
<i>Ruta graveolens</i>		
24 часа	88.00a	12.00
48 часа	81.50b	21.50
72 часа	69.25e	30.75
<i>Plantago major</i>		
24 часа	89.75a	10.25
48 часа	82.75b	17.75
72 часа	75.25cd	24.75
температура 19±1°C		
<i>Juglans regia</i>		
24 часа	69.75e	30.25
48 часа	48.50ij	51.50
72 часа	24.75l	75.25
<i>Ruta graveolens</i>		
24 часа	80.50b	19.55
48 часа	70.75de	29.25
72 часа	44.50j	55.50
<i>Plantago major</i>		
24 часа	82.75b	17.25
48 часа	71.75cde	28.25
72 часа	61.00g	39.00
температура 24±1°C		
<i>Juglans regia</i>		
24 часа	52.75hi	47.25
48 часа	37.25k	62.75
72 часа	22.25l	77.75
<i>Ruta graveolens</i>		
24 часа	68.50ef	31.50
48 часа	53.25h	46.75
72 часа	39.00k	61.00
<i>Plantago major</i>		
24 часа	74.75cd	25.25
48 часа	60.25g	39.75
72 часа	46.00j	54.00

*експозиция на растителните екстракти върху Л₂; **% спрямо контрола; ***a,b,c.... степен на доказаност при P_{0.05} по Duncan's Multiple Range Test

При нарастване на температурата е установено повишаване действието на растителните екстракти по отношение на смъртността на Л₂. Висока смъртност срещу Л₂ *G. pallida* е отчетена при температури: 19±1°C и 24±1°C, при вариантите с растителни екстракти *J. regia* и *R. graveolens*. При вариантите с растителен екстракт *P. major* е отчетена най-ниска смъртност на Л₂ за всички експозиции и температури в сравнение с вариантите на растителни екстракти *J. regia* и *R. graveolens*. Най-висока смъртност на Л₂ е отчетена при вариант с растителен екстракт *J. regia* при температура 24±1°C и експозиция 72 часа, съответно 77.75% (табл. 10).

Най-ниска смъртност на Л₂ на *G. pallida* при експозиция 72 часа е отчетена при 14±1°C за всички изпитани растителни екстракти, като при тази температурна стойност най-добър ефект е установено за растителен

екстракт *J. regia* (35.50%), следван от *R. graveolens* (30.75%) и *P. major* (24.75%).

4.3.3. Установяване влиянието на концентрация/температура и експозицията на растителни екстракти *J. regia*, *R. graveolens* и *P. major* върху излюпването на L_2 на *G. pallida*

4.3.3.1. Установяване влиянието на концентранцията и експозицията на растителни екстракти *J. regia*, *R. graveolens* и *P. major* върху излюпването на L_2 на *G. pallida*

Данните за инхибиращ ефект на растителните екстракти *J. regia*, *R. graveolens* и *P. major* върху излюпването на L_2 на *G. pallida*. са представени в таблица 11. При всички концентрации и експозиции на тестваните растителни екстракти е отчетено инхибиращ ефект спрямо напускане на L_2 от цистите.

Таблица 11. Ефикасност на растителни екстракти *J. regia*, *R. graveolens*, *P. major* върху излюпване (%) на L_2 на *G. pallida*, при различна концентрация и експозиция и 4 седмици след пренасянето на цистите в ККЕ при температура $22 \pm 1^\circ\text{C}$

Експозиция/ седмици*	Излюпени L_2 (%) /Концентрация			
	2.5%	5.0%	10.0%	контрола**
<i>Juglans regia</i>				
1	65.25c***	56.50d	34.00f	74.41b
2	54.25d	46.25e	27.25 gh	81.81a
3	44.75e	33.00fg	23.50hi	85.18a
6	42.55e	31.25fg	20.75i	83.65a
<i>Ruta graveolens</i>				
1	72.21bc	69.00c	59.00e	73.50b
2	69.75c	62.50d	51.50f	79.95a
3	47.25f	54.50f	44.75fg	83.34a
6	45.10fg	52.00f	42.45g	82.20a
<i>Plantago major</i>				
1	80.25bc	76.00cd	69.50ef	76.52c
2	71.00de	71.00de	63.50gh	80.21bc
3	66.00efg	63.50gh	58.25hi	86.23a
6	65.00fg	61.75ghi	57.10i	85.00ab

*експозиция на растителните екстракти върху цистите; **контрола-стерилна дестилирана вода; ***a,b,c,... степен на доказаност при $P_{0.05}$ по Duncan's Multiple Range Test

Най-слаб инхибиращ ефект е отчетено при всички варианти на растителен екстракт *Plantago major* (табл. 11). Най-силен инхибиращ ефект е отчетено при всички варианти на растителен екстракт *J. regia* (виж табл. 11). С повишаване на експозицията и концентрацията на тестваните растителни екстракти *J. regia*, *R. graveolens*, *P. major*, е установено понижаване в процентът на излюпените L_2 от цистите. При концентрация 2.5% за всички варианти на тестваните растителни екстракти *J. regia*, *R.*

graveolens и *P. major*, е отчетено най-слаб инхибиращ ефект. При концентрация 10.0% за всички варианти на тестваните растителни екстракти *J. regia*, *R. graveolens* и *P. major*, е отчетено най-силен инхибиращ ефект върху излюпване на ларви втора възраст от цистите.

4.3.3.2. Установяване влиянието на температурата и експозицията на растителни екстракти *J. regia*, *R. graveolens* и *P. major* върху излюпването на L_2 на *G. pallida*

Данните за инхибиращ ефект на растителните екстракти *J. regia*, *R. graveolens* и *P. major*, върху излюпването на ларви втора възраст на *G. pallida*, са представени в таблица 12. От получените резултати е установено, че тестваните растителни екстракти проявяват различен инхибиращ ефект спрямо излюпването на инвазионните ларви втора възраст от цистите, както и че ефектът на потискане е различен при различни температурни стойности.

Таблица 12. Влияние на растителни екстракти *J. regia*, *R. graveolens* и *P. major* върху излюпването на L_2 на *G. pallida* при различна температура и експозиция и 4 седмици след пренасянето на цистите в ККЕ

Експозиция/ седмици*	Излюпени L_2 (%) /Температура			
	14±1°C	19±1°C	24±1°C	контрола**
<i>Juglans regia</i>				
1	60.75c	56.50cd	52.00de	75.65b
2	56.60cd	46.25fg	42.00g	82.51a
3	52.25de	33.00h	31.25h	84.30a
6	49.45ef	31.25h	29.75h	83.65a
<i>Ruta graveolens</i>				
1	75.75bc	71.00cd	57.75e	79.00ab
2	72.00cd	67.25d	50.00f	82.85a
3	53.75ef	59.00e	46.25fg	84.64a
6	50.00f	55.25ef	43.30g	83.00a
<i>Plantago major</i>				
1	77.00cd	70.25ef	65.80fg	80.82bc
2	73.33de	68.00fg	65.00gh	81.00bc
3	71.00ef	60.65hi	52.50j	83.50ab
6	70.00efg	60.00i	51.75j	87.75a

*експозиция на растителните екстракти върху цистите; **контрола-стерилна дестилирана вода;

***a,b,c,... степен на доказаност при $P_{0.05}$ по Duncan's Multiple Range Test

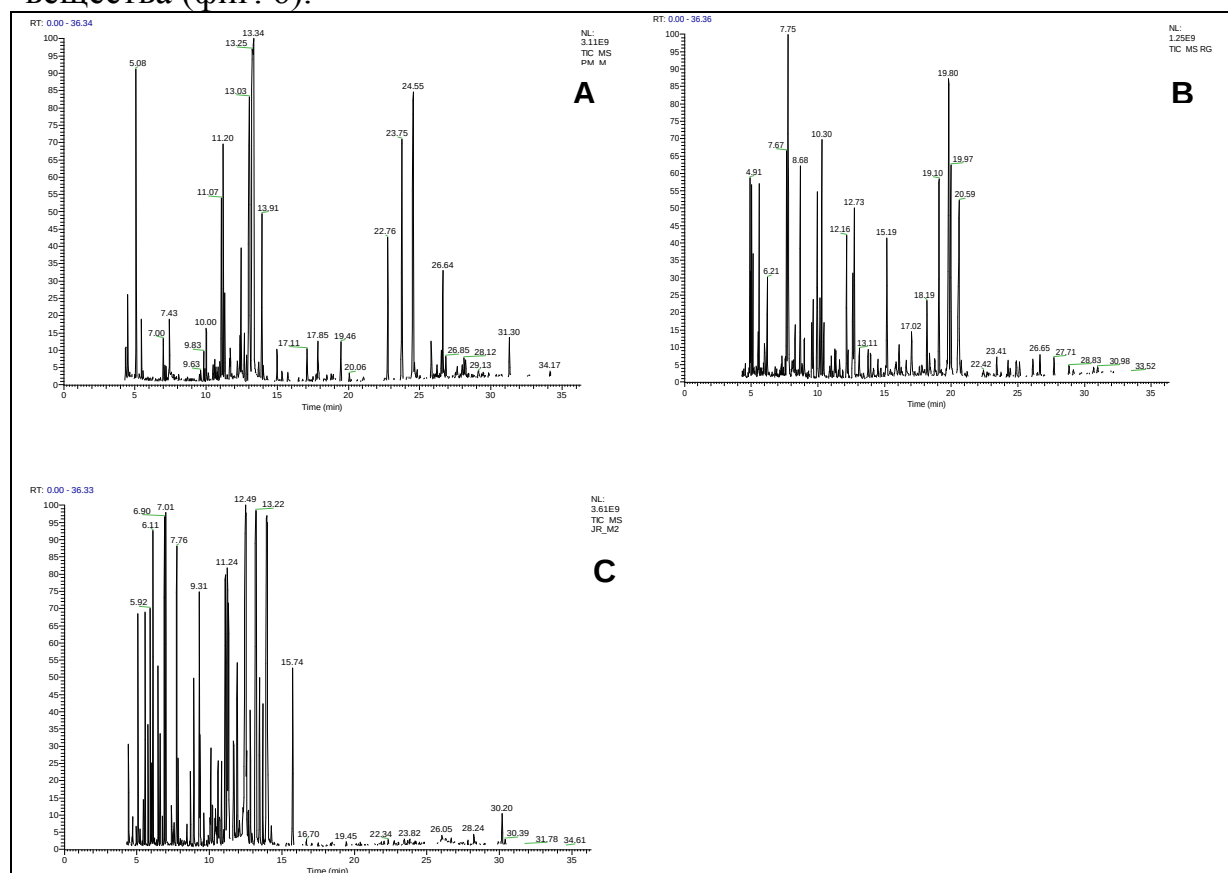
С повишаване на експозицията и концентрацията на тестваните растителни екстракти *J. regia*, *R. graveolens* и *P. major*, е отчетено понижение в процентът на излюпените L_2 от цистите.

При вариантите с температурна стойност 14±1°C за всички варианти на тестваните растителни екстракти *J. regia*, *R. graveolens* и *P. major*, е отчетен най-слаб инхибиращ ефект. При температурни стойности 19±1°C

и $24 \pm 1^\circ\text{C}$ за вариантите с растителен екстракт *J. regia*, получените резултати са сходни и имат малка статистическа разлика една от друга. Най-слаб инхибиращ ефект при всички варианти и температури е отчетено за растителен екстракт *P. major*. (табл. 12). Най-силен инхибиращ ефект при всички варианти и температури е отчетено за растителен екстракт *J. regia* (виж табл. 12).

За всички три растителни екстракти (*J. regia*, *R. graveolens* и *P. major*) използвани в „*in vitro*” експериментите са проведени допълнителни изследвания, чрез газ хроматография – мас спектрометрия (ГХ-МС) за установяване на метаболитните им профили (налични вещества).

Големият брой пикове в хроматограмите показва наличието на много вещества (фиг. 6).



Фигура. 6. ГХ-МС хроматограми на изследваните видове: **A** - *Ruta graveolens*, **B** - *Plantago major* **C** - *Juglans regia*

Най-добре представената метаболитна група е на въглехидратите. Установени са изомери на фруктоза, глюкоза и много монозахариди, дизахариди и тризахариди. Широка гама от органични, фенолни, аминокиселини и мастни киселини също са установени. Допълнително са идентифицирани алкалоиди, кумарини и стероли в екстракта на *R. graveolens*. Идентифицираните съединения са в съответствие с вече докладвани данни за химичния състав на *R. graveolens* (Ekiert and Kisiel, 1997; Kostova et al., 1999, Arora and Tandon, 2015). Основният пик на хроматограмата на екстракта от *P. major* е идентифициран като сорбитол (захарен алкохол). В

екстракта на *J. regia*, освен въглехидратите е идентифицирано голямо разнообразие от органични и фенолни киселини. Ябълчената и треонинова киселини са определени като основни. Фосфорната и галова киселини са също добре представени (виж табл. 13).

Таблица 13. Идентифицирани метаболити в метанолови екстракти на изследваните видове чрез ГХ-МС

Съединения	RI*	Изследвани ратителни екстракти**		
		<i>Juglans regia</i>	<i>Plantago major</i>	<i>Ruta graveolens</i>
1	2	3	4	5
Органични киселини				
Фосфорна киселина	1267	1.70		
Янтарна киселина	1311	0.35	0.93	0.04
Глицеринова киселина	1324	0.13		0.06
Фумарова киселина	1347	0.88		
Ябълчена киселина	1482	4.46		0.61
Треонинова киселина	1551	5.07	0.10	0.18
Рибонова киселина	1757	0.23	0.22	0.21
Хинова киселина	1855	2.06		0.33
Аскорбинова	1943	0.02		
Фенолни киселини				
3,5-Диметокси-4-хидрокси бензоена киселина (Сирингова киселина)	1896	0.40		
3,4,5-Трихидроксibenзоена киселина (Галова киселина)	1951	1.02		
3,5-Дихидроксibenзоена киселина	2007		0.01	
<i>trans</i> -3,4-Дихидроксиканелена киселина (Кафеена киселина)	2134		0.11	
Полиоли				
Глицерол	1269		5.64	
Мезо-Еритрол	1493		0.25	
2-Хидроксиглутарова киселина	1566		0.04	
Арабинова киселина, 1,4-лактон	1630	0.84	0.10	0.02
Сорбитол	1943		34.76	
Мио-Инозитол	2088	2.37	0.22	0.09
Галактозил глицерол	2313	0.07	1.01	0.03
2-Хексадеканил глицерол	2584		0.16	
Въглехидрати				
Арабиноза	1677	3.56		
Рибоза	1701	0.37	0.20	0.06
Монозахарид 1	1738	0.08		
Фруктоза 1	1803	2.40	2.64	1.13
Фруктоза 2	1810	3.32	5.03	1.73
Фруктоза 3	1817	4.92	1.70	0.97
Монозахарид 2	1844	0.05		
Монозахарид 3	1847		0.08	0.01
Глюкоза 1	1891	13.17	2.64	83.65
Монозахарид 4	1893	4.86		

Таблица 13 (продължение)

1	2	3	4	5
Монозахарид 5	1903	0.54	1.25	0.02
Глюкоза 2	1936	12.59		
Галактоза	1965		0.34	
Монозахарид 6	1978		3.74	
Монозахарид 7	1979	14.55		0.20
Монозахарид 8	1983	15.78		
Дизахарид 1	2522		3.34	2.01
Захароза	2637	0.03	2.76	2.98
Дизахарид 2	2639		8.11	
Дизахарид 3	2641		15.06	
Threhalose	2740	0.09	0.11	
Дизахарид 4	2819		0.06	
Дизахарид 5	2859		0.31	
Тризахарид 1	2874		0.10	
Тризахарид 2	2883		0.38	
Тризахарид 3	2901		0.37	
Тризахарид 4	2907		0.06	
Въглехидратно производно 1	2786		2.76	
Въглехидратно производно 2	3134		1.23	
Аминокиселини				
Валин	1217		0.07	
Серин	1259		0.10	
Треонин	1295		0.08	
Фенилаланин	1365.0			0.02
Пироглутаминова киселина	1522	0.13	1.09	
Аланин	1556		0.10	
Стероли				
Мегестрол ацетат	2659			1.83
Кампестрол	3245			0.20
β -Ситостерол	3352		0.20	0.13
Алкалоиди				
Фурохинолинов алкалоид (скиммианин)	2299			0.07
6,7 диметоксидиктамин (кокусагинин)	2382			0.21
Кумарини				
Ксантотоксин (метоксален)	1935			0.48
Вергаптен	1955			0.34
Масни киселини				
Октанова киселина (Каприлова киселина, C8:0)	1534		0.09	0.62
Хексадеканова киселина (Палмитино киселина, C16:0)	1922		0.94	1.28
Октадекадионова киселина (Линолова киселина, C18:2)	2089			0.05
Октадекатриенова киселина (Линоленова киселина, C18:3)	2120		1.03	0.13
Октадеканова киселина (Стеаринова киселина, C18:0)	2186			0.15

*индекси на Ковач ; **данните са изразени като процент от всички идентифицирани съединения (%)

Настоящият ГХ-МС анализ на екстракта от *J. regia* показва наличието на фенолни киселини (табл. 13). Има данни, че нематотоксичната активност на *J. regia* се дължи на монохидрокси, дихидрокси и трихидрокси фенолни киселини (Mahajan et al., 1985). Mahajan et al., 1992 съобщава, че няколко фенолни киселини - кафеена, 2,6-дихидрокси бензоена, p-метоксиканелена показват висока нематотоксична активност срещу *Meloidogyne incognita*.

За растителният екстракт *R. graveolens* резултатите от проведения ГХ-МС анализ показват наличието на високо съдържание на алкалоиди, кумарини и стероли (табл. 13). Подобно на нашите резултати, Sasanelli, 1992 съобщава, като активни компоненти на екстракта от листата на *R. graveolens* алкалоиди, терпени и кумарини (ксантотоксин) за нематотоксична активност срещу растително-паразитната нематода *Xiphinema index* „in vitro”. При проведения ГХ-МС анализ за растителен екстракт *P. major*, резултатите показват, че е богат на въглехидрати, най-вече със захарния алкохол – орбитол (табл. 13). Няма литературни данни за нематотоксична активност на веществата в тази метаболитна група с изключение на хитозановия полизахарид (Khalil and Badawy, 2012).

4.3.4. Установяване влиянието на концентрация/температура и експозицията на бактериална суспензия (БС) на *S. plymuthica* изолат 72 върху L_2 на *G. pallida*

4.3.4.1. Установяване влиянието на концентрацията и експозицията на бактериална суспензия (БС) *S. plymuthica* изолат 72 върху L_2 на *G. pallida*

Резултатите показват, че бактериална суспензия (БС) на *S. plymuthica* 72 проявява нематотоксичен ефект спрямо L_2 на *G. pallida* (табл. 14).

Нематотоксичният ефект на БС *S. plymuthica* 72 върху L_2 на *G. pallida* е различен при различна концентрация и експозиция. С повишаване на концентрацията и времето на контакт на L_2 с БС е повишена смъртността им спрямо контрола.

Таблица 14. Ефикасност на БС *S. plymuthica* 72 срещу L_2 *G. pallida* при различни концентрация и експозиция, температура $22 \pm 1^\circ\text{C}$

Варианти/ Експозиция*	Globodera pallida	
	Брой живи	Смъртност (%)**
	10 ⁶ клетки/ml***	
24 часа	78.00a****	22.00
48 часа	67.00b	33.00
72 часа	52.50c	47.50
	10 ⁷ клетки/ml	
24 часа	61.75b	38,25
48 часа	51.00c	49.00
72 часа	38.00d	62.00
	10 ⁸ клетки/ml	
24 часа	39.00d	61.00
48 часа	26.75e	79.25
72 часа	13.25f	86.75

*експозиция на БС *Serratia plymuthica* изолат 72 върху L_2 ; **% спрямо контрола; ***концентрация БС *Serratia plymuthica* изолат 72; ****a,b,c,... степен на доказаност при $P_{0.05}$ по Duncan's Multiple Range Test

Резултатите в таблица 14 от тествания БС на *S. plymuthica* изолат 72, показват, че при всички изпитани концентрации и експозиции е наблюдаван нематоциден ефект. Най-висок процент на смъртност на L_2 , респективно е отчетено при експозиция от 72 часа – 86.75% (10^8 клетки/ml), 62.00% (10^7 клетки/ml) и 47.50% (10^6 клетки/ml). В контролите не са отчетени мъртви L_2 .

Повечето ризобактерии, за които е известно, че са вредни за растително-паразитните нематоди действат чрез вторични метаболитни продукт, ензими и токсини. Ефектите от тях включват, потискане на размножаването на нематоди, излюпването на яйца и преживяемостта на ларвите, както и директно убиване на нематоди (Zuckerman & Jasson, 1984; Siddiqui & Mahmood, 1999). Често изследвани видове ризобактерии са *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. (Becker et al., 1988; Sikora, 1992; Tian et al., 2007). Така например от *Bacillus* spp., видът *Bacillus subtilis* проявява широк спектър на активност срещу фитонематодите. Щамът произвежда хидролитични ензими като протеаза, липази, b-глюкоза и целулаза, като те действат на ориентацията на ларвите към растението гостоприемник.

Представителите на *Pseudomonas* spp. произвеждат широк спектър от биоактивни метаболити (антибиотици, сидерофори, летливи вещества и вещества, стимулиращи растежа). Съобщава се за вторични метаболити като 2,4-диацетилфлуороглюкинол (DAPG), продуциран от *Pseudomonas fluorescens*, който контролира ларвите на цистообразуващите нематоди (Cronin et al., 1997; Siddiqui & Shaukat, 2003).

4.3.4.2. Установяване влиянието на температурата и експозицията на бактериална суспензия (БС) *S. plymuthica* изолат 72 върху L_2 на *G. pallida*

Резултатите описани в таблица 15 показват, че ефикасността на БС *S. plymuthica* изолат 72 (концентрация 10^8 клетки/ml) зависи, както от експозицията така и от температурата. При всички тествани температурни стойности и експозиции е отчетено нематоциден ефект.

Таблица 15. Ефикасност на БС *S. plymuthica* изолат 72 (1.7×10^8 клетки/ml) срещу L_2 *G. pallida* при различна експозиция и температура

Варианти/ Експозиция*	Globodera pallida	
	Брой живи	Смъртност (%)**
	температура 14±1°C	
24 часа	87.50a***	12.50
48 часа	83.50a	16.50
72 часа	77.25b	22.75
	температура 19±1°C	
24 часа	64.50c	35.50
48 часа	55.00d	45.00
72 часа	31.75e	68.25
	температура 24±1°C	
24 часа	34.75e	65.25
48 часа	26.25f	73.75
72 часа	11.50g	88.50

*експозиция на БС *Serratia plymuthica* изолат 72 върху L_2 ; **% спрямо контрола; ***a,b,c,... степен на доказаност при $P_{0.05}$ по Duncan's Multiple Range Test

С увеличаване на температурата нарастваше и действието на БС по отношение на смъртността на L_2 . При вариантите с температури: $19\pm 1^\circ\text{C}$ и $24\pm 1^\circ\text{C}$ действието на БС на бактерията се проявяваше много бързо, като при 72 часа експозиция, процентът на смъртност на L_2 на *G. pallida* се увеличаваше съответно – 68.25% ($19\pm 1^\circ\text{C}$) и 88.50% ($24\pm 1^\circ\text{C}$). При температурна стойност $14\pm 1^\circ\text{C}$ действието на БС на *S. plymuthica* изолат 72 е бавно и по-слабо изразено, като отчетеният процент на смъртност на L_2 е 22.75%.

4.3.5. Установяване влиянието на концентрацията/температурата и експозицията на бактериална суспензия (БС) на *S. plymuthica* изолат 72 върху излюпването на L_2 на *G. pallida*

4.3.5.1. Установяване влиянието на концентрацията и експозицията на бактериална суспензия (БС) на *S. plymuthica* изолат 72 върху излюпването на L_2 на *G. pallida*

Данните за ефекта на БС *S. plymuthica* изолат 72 върху излюпването на L_2 на *G. pallida* са представени в таблица 16. При всички тествани концентрации и експозиции е установено, че развитието на бактерията инхибира излюпването на L_2 от цистите, спрямо контрола.

Таблица 16. Ефикасност на БС *S. plymuthica* изолат 72 върху излюпване на L_2 на *G. pallida*. при различна концентрация и експозиция и 4 седмици след пренасянето на цистите в ККЕ при температура $22\pm 1^\circ\text{C}$

Експозиция/ седмици*	Излюпени L_2 (%) / Бактериална концентрация клетки/ml			
	0**	10^6	10^7	10^8
1	57.89c	38.63d	28.26e	11.11gh
2	66.47b	29.83e	14.90g	7.50hi
3	73.50a	22.00f	10.94gh	5.50i
6	75.25a	23.50f	11.75gh	4.25i

*експозиция на БС *Serratia plymuthica* изолат 72 върху цистите; **контрола стерилна дестилирана вода;

***a,b,c,... степен на доказаност при $P_{0.05}$ по Duncan's Multiple Range Test

С повишаване на концентрацията и експозицията на БС *S. plymuthica* изолат 72 е отчетено понижаване на броя на излюпените L_2 от цистите в сравнение с контрола. Най-висок процент на ефикасност е отчетен при концентрация 10^8 клетки/ml за всички варианти на експозиция, като излюпването е редуцирано както следва: 88.89, 92.50, 94.50 и 95.75%. Най-нисък процент на ефикасност е отчетен при концентрация 10^6 клетки/ml за всички варианти на експозиция, съответно 61.37, 70.17, 78.00 и 76.50% (табл. 16). Допускаме, че инхибиращият ефект на бактерията се дължи на отделяне на вторични метаболити с неизяснен състав по време на растежа в хранителна среда.

Подобно на нашия експеримент, Mendoza et al., (2008), съобщават за нематодна активност на вторични метаболити отделени от *Bacillus firmus* по време на растеж в хранителна среда, като значително намаляват излюпването на яйцата от яйчните торбички на *Meloidogyne incognita*.

Basyony and Abo-Zaid (2018) също съобщават за инхибиращ ефект на бактериални суспензии на *Bacillus subtilis* изолат B10 и B8 по отношение на излюпването на яйцата от яйчните торбички на *Meloidogyne incognita*.

4.3.5.2. Установяване влиянието на температурата и експозицията на бактериална суспензия (БС) на *S. plymuthica* изолат 72 върху излюпването на L_2 на *G. pallida*

Данните за ефекта на БС *S. plymuthica* изолат 72 (концентрация 10^8 клетки/ml) върху излюпването на ларви втора възраст на *G. pallida* са представени в таблица 17. Резултатите показват, че инхибиращият ефект на БС *S. plymuthica* изолат 72 зависи значително от температурата.

Таблица 17. Ефикасност на БС *S. plymuthica* изолат 72 (1.7×10^8 клетки/ml) върху излюпване на L_2 на *G. pallida*. при различна температура и експозиция и 4 седмици след пренасянето на цистите в ККЕ

Експозиция/ седмица*	Излюпени L_2 (%) / Температура					
	14±1°C		19±1°C		24±1°C	
	10^8	0**	10^8	0	10^8	0
1	58.51c***	68.00b	11.11c	77.51b	8.85c	77.97b
2	54.12d	73.09a	7.50d	81.81a	8.25c	82.92a
3	27.39e	74.70a	5.50d	80.72ab	6.33c	85.18a
6	14.61f	76.47a	7.25d	79.64	8.00c	82.82a

*експозиция на БС *Serratia plymuthica* изолат 72 върху цистите при различна температура; **контрола - стерилна дестилирана вода; ***a,b,c.... степен на доказаност при $P_{0.05}$ по Duncan's Multiple Range Test

При температурни условия от 14±1°C е отчетено редуциране на броя излюпени L_2 спрямо контролния вариант, но процента е сравнително по-нисък. Допускаме, че това се дължи на ниската температура, при която развитието на бактерията е забавено.

При температурни стойности: 19±1°C и 24±1°C е отчетен задоволителен инхибиращ ефект (табл. 12). При всички варианти с увеличаване на експозицията на БС *S. plymuthica* изолат 72 върху цистите, инхибиращият ефект нараства, респективно намалява процента на излюпени ларви втора възраст спрямо контрола.

Инхибиращият ефект на БС *S. plymuthica* в настоящия експеримент най-вероятно се дължи на различни летливи органични съединения (ЛОС), които инхибират растежа на различни микроорганизми и нематоди (Kai et al., 2007; Dandurishvili et al., 2011). Много малко учени са тествали летливите органични съединения (ЛОС) получени от бактериални изолати спрямо негативното им влияние върху нематодите. Повече тестове са проведени предимно „in vitro”, оценявайки подвижността или смъртността

на ларви втора възраст (L₂), и излюпването им от цистите в резултат на експозицията на ЛОС (Campos et al., 2010). Huang et al., (2010), откриват, че летливите органични съединения отделени от *Bacillus megaterium* причиняват висока процент на смъртност (100%) на ларви втора възраст на *Meloidogyne incognita* и силно инхибират излюпването им от яйчните торбички.

4.3.6. Установяване влиянието на концентрация/температура и експозицията на безклетъчен филтрат (БФ) *S. plymuthica* изолат 72 върху L₂ на *G. pallida*

4.3.6.1. Установяване влиянието на концентрацията и експозицията на безклетъчен филтрат (БФ) *S. plymuthica* изолат 72 върху L₂ на *G. pallida*

Получените резултатите от проведените експерименти показват, че БФ на *S. plymuthica* 72 проявява нематоциден ефект спрямо L₂ на *G. pallida* (табл. 18). Нематоцидният ефект на БФ *Serratia plymuthica* 72 върху L₂ на *G. pallida* е различен при различна концентрация и експозиция. С повишаване на концентрацията и експозицията на L₂ в разтворите на БФ е отчетено повишаване смъртността им спрямо контрола.

Таблица 18. Ефикасност на БФ *S. plymuthica* 72 срещу L₂ *G. pallida* при различни концентрации и експозиция при температура 22±1°C

Варианти/ Експозиция*	Globodera pallida	
	Брой живи	Смъртност (%)**
	2.5%***	
24 часа	80.25a****	19.75
48 часа	69.25b	30.75
72 часа	54.75c	45.25
	5.0 %	
24 часа	36.75d	63.25
48 часа	18.50e	81.50
72 часа	14.25e	85.75
	10.0%	
24 часа	34.50d	65.50
48 часа	16.75e	83.25
72 часа	13.50e	86.50

*експозиция на БФ *Serratia plymuthica* изолат 72 върху L₂; **% спрямо контрола; ***концентрация на БФ *Serratia* sp. изолат 72; ****a,b,c.... степен на доказаност при P_{0.05} по Duncan's Multiple Range Test

Най-висок процент на смъртност на L₂, респективно е отчетен при експозиция от 72 часа – 86.50 % (10.0%), 85.75% (5.0%) и 45.25% (2.5%). В контролите не са отчетени мъртви L₂.

Нашите резултати кореспондират с тези получени от Nandeesh and Ravindra (2020) при „in vitro” експерименти с БФ на ризобактериите *Pseudomonas fluorescens* и *Bacillus subtilis*, в които авторите съобщават за средна до висока смъртност при 72 часа експозиция на ларви втора възраст на *M. incognita*. При проведени „in vitro” експерименти с ризобактерии *Bacillus* spp., Tadigiri et. al. (2020), докладват за висока токсичност на ларви втора възраст на *M. incognita* при експозиция 72 часа, които резултати

кореспондират с резултатите получени от нашите експерименти. Soliman et. al. (2019), също съобщават за висока смъртност на L_2 и инхибиране на излюпването на *M. incognita* при „in vitro” експерименти с БФ на някои бактерии от род *Bacillus*.

4.3.6.2. Установяване влиянието на температурата и експозицията на безклетъчен филтрат (БФ) *S. plymuthica* изолат 72 върху L_2 на *G. pallida*

Резултатите описани в таблица 19 показват, че ефикасността на БФ *S. plymuthica* изолат 72 (концентрация 5%) зависи, както от експозицията така и от температурата. При всички тествани температурни стойности и експозиции е отчетено нематоциден ефект на БФ *S. plymuthica* изолат 72. За разлика от бактериалната суспензия, действието на БФ е по-ефикасно дори и при тестваните ниски температурни стойности.

Таблица 19. Ефикасност на БФ *S. plymuthica* изолат 72 (концентрация 5%) срещу L_2 на *G. pallida* при различна експозиция и температура

Варианти/ Експозиция*	<i>Globodera pallida</i>	
	Брой живи	Смъртност (%)**
температура 14±1°C		
24 часа	70.00a	30.00
48 часа	57.50b	42.50
72 часа	42.75c	57.25
температура 19±1°C		
24 часа	36.75d	63.25
48 часа	18.50f	81.50
72 часа	10.75g	89.25
температура 24±1°C		
24 часа	32.25e	67.75
48 часа	16.75f	83.50
72 часа	7.75g	92.25

*експозиция на БФ *Serratia plymuthica* изолат 72 върху L_2 ; **0% спрямо контрола; ***a,b,c.... степен на доказаност при $P_{0.05}$ по Duncan's Multiple Range Test

С увеличаване на температурата нараства и действието на БФ по отношение на смъртността на L_2 , като за разлика от БС на *S. plymuthica* изолат 72 колебанията на получените резултат в по-ниска степен зависят от температурните стойности. При вариантите с температури: 19±1°C и 24±1°C действието на БФ на бактерията се проявяваше много бързо, като при 72 часа експозиция, процента на смъртност на L_2 на *G. pallida* е увеличено съответно – 89.25% (19±1°C) и 92.25% (24±1°C). При вариантите с ниска температурна стойност от 14°C също е отчетено нематоциден ефект, но действието на БФ на *S. plymuthica* изолат 72 е по-слабо изразено спрямо процента на смъртност на L_2 . Въпреки това действието на БФ е по-ефикасно дори и при тази ниска температура, за разлика от бактериалната суспензия.

При 14±1°C и експозиция от 72 часа отчетеният процент смъртност на L_2 *G. pallida* е 71.50%. Най-висок нематоциден ефект на БФ *S. plymuthica* изолат 72 е отчетено при вариант с температура 24±1°C, а най-

нисък нематоциден ефект е отчетено при вариант с температура $14\pm 1^{\circ}\text{C}$ (табл. 19).

4.3.7. Установяване влиянието на концентрация/температура и експозицията на безклетъчен филтрат (БФ) *S. plymuthica* изолат 72 върху излюпването на L_2 на *G. pallida*

4.3.7.1. Установяване влиянието на концентрацията и експозицията на безклетъчен филтрат (БФ) *S. plymuthica* изолат 72 върху излюпването на L_2 на *G. pallida*

Данните за ефекта на БФ *S. plymuthica* изолат 72 върху излюпването на L_2 на *G. pallida* са представени в таблица 20. При всички тествани концентрации и експозиции е отчетено инхибиращ ефект спрямо излюпване на L_2 от цистите.

Таблица 20. Ефикасност на БФ *S. plymuthica* изолат 72 върху излюпване (%) на L_2 на *G. pallida*. при различна концентрация и експозиция и 4 седмици след пренасянето на цистите в ККЕ при температура $22\pm 1^{\circ}\text{C}$

Експозиция/ седмици*	Излюпени L_2 (%) /Концентрация			
	контрола**	2.5%	5.0%	10.0%
1	60.52d***	31.00e	21.45fg	5.26ij
2	66.84c	25.52f	11.94h	0.00j
3	75.43b	19.04g	7.91hi	0.00j
6	81.50a	17.65g	6.55hi	0.00j

*експозиция на БФ *Serratia plymuthica* изолат 72 върху цистите; **контрола-стерилна дестилирана вода;

***a,b,c.... степен на доказаност при $P_{0.05}$ по Duncan's Multiple Range Test

С повишаване на експозицията и концентрацията на БФ *S. plymuthica* изолат 72 се понижава броят на излюпените L_2 от цистите. Най-нисък процент на ефикасност е отчетено при концентрация 2.5% за всички варианти на експозиция, съответно 69.00, 74.48 и 80.96%, въпреки това ефикасността на БФ е значителен спрямо контрола. Най-висок процент на ефикасност е отчетено при концентрация 10.0% за всички варианти на експозиция. При тази концентрация за експозиция 2 и 3 седмици излюпването на L_2 е напълно потиснато.

4.3.7.2. Установяване влиянието на температурата и експозиция на безклетъчен филтрат (БФ) *S. plymuthica* изолат 72 върху излюпването на L_2 на *G. pallida*

Данните за ефективността на БФ *S. plymuthica* изолат 72 върху излюпването на ларви втора възраст на *G. pallida* са представени в таблица 21. За разлика от бактериалната суспензия ефикасността на БФ *S. plymuthica* изолат 72 излюпването на L_2 на *G. pallida* зависи много по-малко от температурата.

Таблица 21. Ефикасност на БФ *S. plymuthica* изолат 72 (концентрация 5%) върху излюпване (%) на L_2 на *G. pallida* при различна температура и експозиция и 4 седмици след пренасянето на цистите в ККЕ

Експозиция/ седмици*	Излюпени L_2 (%) /Температура					
	14±1°C		19±1°C		24±1°C	
	5.0%	0**	5.0%	0	5.0%	0
1	41.30c***	66.79b	21.45c	76.23b	19.95c	78.20b
2	32.56d	69.88b	11.94d	79.00ab	9.25d	82.89a
3	24.70e	75.13a	7.91e	82.20a	0.00e	84.10a
6	19.25f	77.46a	3.10f	81.57a	0.00e	83.79a

*експозиция на БФ *Serratia plymuthica* изолат 72 върху цистите; **контрола-стерилна дестилирана вода;

***a,b,c.... степен на доказаност при $P_{0.05}$ по Duncan's Multiple Range Test

При температури 19±1°C и 24±1°C е отчетено средно до високо редуциране на излюпване на L_2 спрямо контролните варианти. Процентът на излюпване намалява с увеличаване на експозицията. При температура 24±1°C, експозиция 3 и 6 седмици е отчетено пълно потискане на излюпване на L_2 .

При температура 14±1°C, ефикасността на БФ се проявява по-бавно, но въпреки това също е отчетено редуциране на процента на излюпване на L_2 спрямо контрола (табл. 21).

4.4. Лабораторни опити „in vivo“

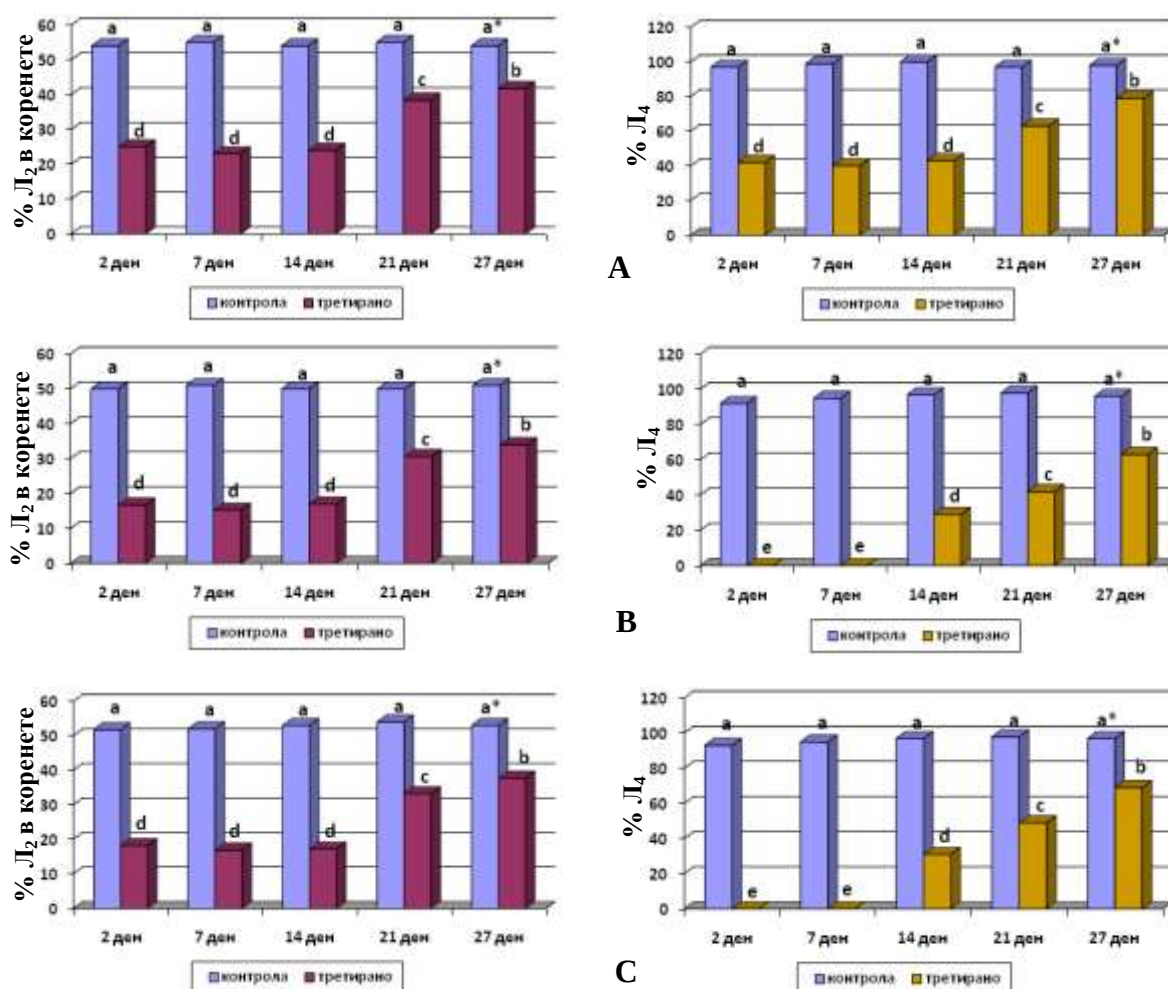
4.4.1. Влияние на бактериална суспензия (БС)/безклетъчен филтрат (БФ) *S. plymuthica* изолат 72 при различна температура върху инвазията на L_2 на *G. pallida* в корените на растенията

4.4.1.1. Влияние на бактериална суспензия (БС) на *S. plymuthica* изолат 72 при различна температура върху инвазията на L_2 на *G. pallida* в корените на растенията

Получение резултатите показват, че бактериална суспензия (БС) на *S. plymuthica* изолат 72 намалява броя на проникналите L_2 на *G. pallida* в корените на картофените растения и при трите експериментални температури (14±1, 19±1 и 24±1°C) (фиг. 7/А, В, С/).

Резултатите на фигура 7 (А) от тестваната БС на *S. plymuthica* изолат 72 при температура 14±1, показват че намалява инвазията на L_2 в корените на картофените растения спрямо контролите при всички варианти. Най-висока ефикасност на БС спрямо инвазията на L_2 в корените, е отчетен при заразяване на растенията на седмият ден след внасяне на БС в ризосферата на растенията, като е отчетено 23.00% проникнали L_2 , а при контролата, значително повече – 54.00 % (фиг. 7 /А/). Най-ниска ефикасност на БС спрямо инвазията на L_2 е отчетен при заразяване на растенията на двадесет и седмият ден след внасяне на БС в ризосферата на растенията, като е отчетено 41.75% проникнали L_2 , а при контролният вариант съответно 54.00% (фиг. 7 /А/). Процентът на L_4 (женски и мъжки), развиващ се в третираните растения, е значително по-

нисък в сравнение с нетретираните варианти. Действието БС на *S. plymuthica* изолат 72 е сходен с този на проникналите L_2 в корените на картофените растения (фиг. 7 /А/).



Фигура 7. Процент L_2 и L_4 на *G. pallida* проникнали в корените на кортофите при: **А** 14±1°C; **В** 19±1°C; **С** 24±1°C 65, 31 и 21 дни след заразяване с 1000 ларви-втора възраст след различни периоди на експозиция с бактериална суспензия *S. plymuthica* изолат 72 (1.7×10^8 клетки/ml). Процентът L_4 е изчислен като % от проникналите нематоди; a,b,c,... степен на доказаност при $P_{0.05}$ по Duncan's Multiple Range Test

Резултатите на фигура 7 (В) от тестваната БС на *S. plymuthica* изолат 72 при температура 19±1, показват че значително намалява инвазията на L_2 в корените на картофените растения спрямо контролите при всички варианти. Най-висока ефикасност на БС спрямо инвазията на L_2 в корените, е отчетен при заразяване на растенията на седмият ден след внасяне на БС в ризосферата на растенията, като е отчетено 15.25% проникнали L_2 , а при контролата, значително повече – 51.00 % (фиг. 7 /В/). Най-ниска ефикасност на БС спрямо инвазията на L_2 беше отчетен при заразяване на растенията на двадесет и седмият ден след внасяне на БС в ризосферата на растенията, като е отчетено 34.00% проникнали L_2 , а при контролният вариант съответно 51.00% (фиг. 7 /В/). Процентът на L_4

(женски и мъжки) развиващ се в третираните растения е значително по-нисък в сравнение с нетретираните варианти. При варианти, когато растенията са заразявани с L_2 до 14 и 7 дни след апликиране на БС на *S. plymuthica* изолат 72 не е отчетен процент нематоди достигнали стадий на развитие L_4 (фиг. 7 /В/).

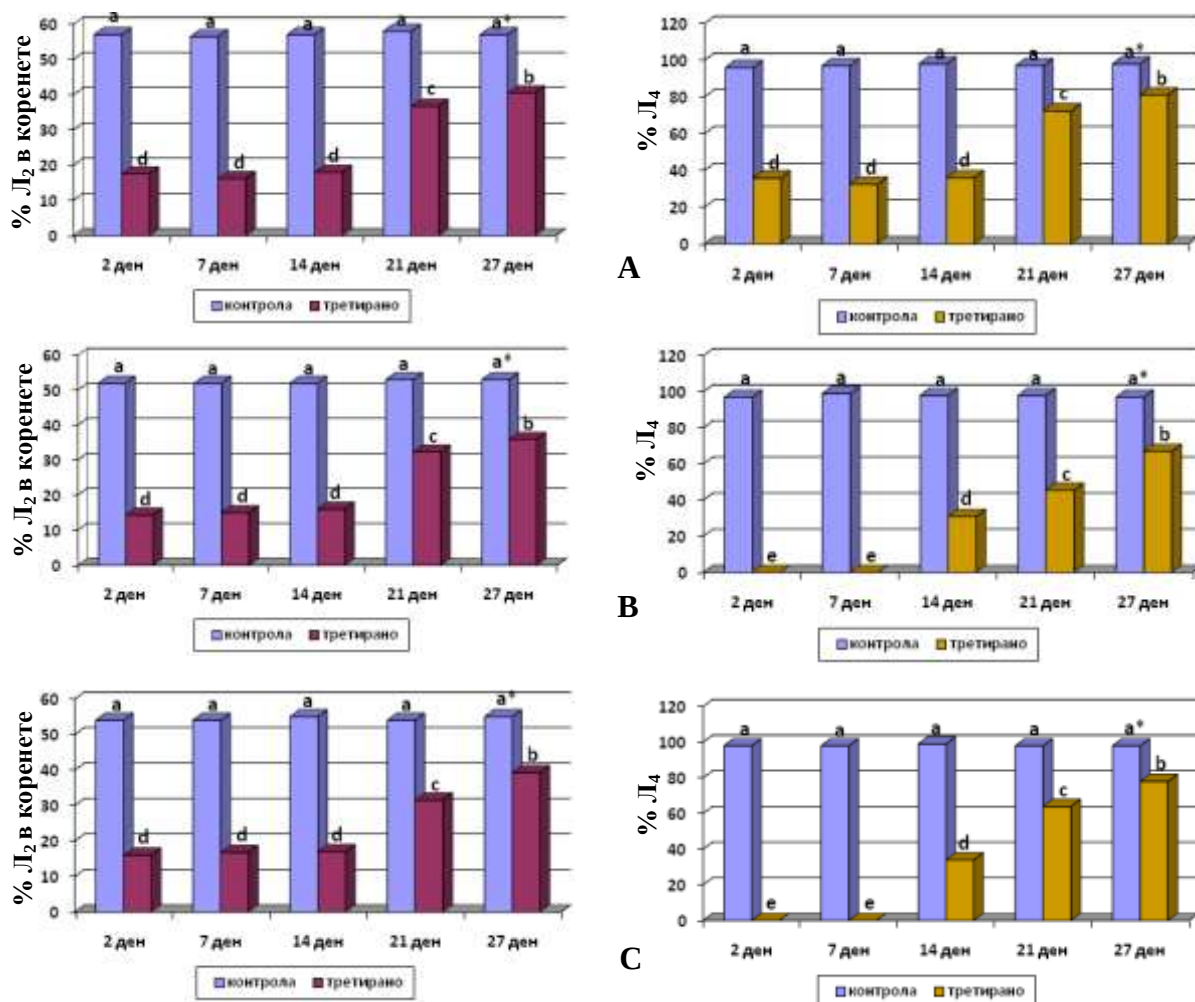
Резултатите на фигура 7 (С) от тестваната БС на *S. plymuthica* изолат 72 при температура 24 ± 1 , показват че намаляват инвазията на L_2 в корените на картофените растения спрямо контролите при всички варианти. Най-виска ефикасност на БС спрямо инвазията на L_2 в корените, е отчетен при заразяване на растенията на седмият ден след внасяне на БС в ризосферата на растенията, като е отчетено 16.90% проникнали L_2 , а при контролата, значително повече – 52.00% (фиг. 7 /С/). Най-ниска ефикасност на БС спрямо инвазията на L_2 е отчетен при заразяване на растенията на двадесет и седмият ден след внасяне на БС в ризосферата на растенията, като е отчетено 37.75% проникнали L_2 , а при контролният вариант съответно 53.00% (фиг. 7 /С/). При варианти, когато растенията са заразявани с L_2 до 14 и 7 дни след апликиране на БС на *S. plymuthica* изолат 72, не е отчетен процент нематоди достигнали стадий на развитие L_4 (фиг. 7 /С/).

При третиране на растенията с БС на *S. plymuthica*, ефикасността на бактерията е по-силно изразена до 14-я ден. Това дава възможност на бактерията да се развие в ризосферата на растенията, с цел оптималната им превенция от инвазия на L_2 в корените. На 21-я и 27-я ден на заразяване на третираните растения, БС на *S. plymuthica* изолат 72 нематоцидното действие намалява. Също така получените резултати показват, че отделените вторични метаболити от бактерията по време на своя растеж в почвата, действат срещу L_2 , като директно ги убиват, или засягат нормалното им движение и предотвратяват навлизането им в корените на картофените растения. Подобно на получените резултати в нашият експеримент, Mochamedova et al., (2016), съобщават за значително редуциране на броя проникнали L_2 на други видове нематоди (*M. javanica*) в корените на растения от патладжан третиран с ризобактерията *B. subtilis*.

4.4.1.2. Влияние на безклетъчен филтрат (БФ) *S. plymuthica* изолат 72 при различна температура върху инвазията на L_2 на *G. pallida* в корените на растенията

Резултатите от проведените експерименти показаха, че безклетъчният филтрат (БФ) на *S. plymuthica* изолат 72, също намалява броя на проникналите L_2 на *G. pallida* в корените на картофените растения и при трите експериментални температури (14 ± 1 , 19 ± 1 и $24 \pm 1^\circ\text{C}$) (фиг. 8 /А, В, С/). Резултатите представени на фигура 8 (А) от тестваният БФ на *S. plymuthica*, състоящ се само от метаболити на бактерията, при температура 14 ± 1 , показват че също значително намалява инвазията на

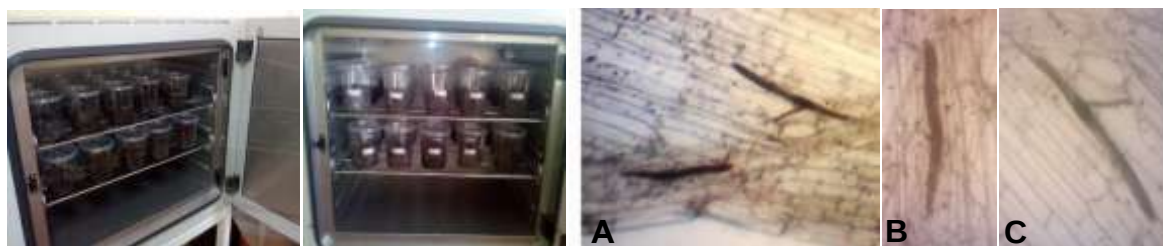
L_2 в корените на картофените растения спрямо контролите при всички варианти. За разлика от БС, ефикасността на безклетъчният филтрат на *S. plymuthica* е по-добре изразена в сравнение с бактериалната суспензия при същите температурни условия. Най-висока ефикасност на БФ спрямо инвазията на L_2 в корените, е отчетен при заразяване на растенията на седмият ден след внасяне на БФ в ризосферата на растенията, като процентът проникнали L_2 е 16.20%, а при контролата – 56.50% (фиг. 8 /А/). Най-ниска ефикасност на БФ спрямо инвазията на L_2 е отчетен при заразяване на растенията на двадесет и седмият ден след внасяне на БФ в ризосферата на растенията, като процентът проникнали L_2 е 40.50 %, а при контролният вариант съответно 57.00% (фиг. 9). Процентът на L_4 (женски и мъжки), развиващ се в третираните растения, е значително по-нисък в сравнение с нетретираните варианти. Действието БФ на *S. plymuthica* изолат 72 е сходен с този на проникналите L_2 в корените на картофените растения (фиг. 8 /А/).



Фигура 8. Процент L_2 и L_4 на *G. pallida* проникнали в корените на кортофите при: **А** 14±1°C; **В** 19±1°C; **С** 24±1°C 65, 31 и 21 дни след заразяване с 1000 ларви-втора възраст след различни периоди на експозиция с безклетъчен филтрат *S. plymuthica* изолат 72 (концентрация 5 %). Процентът L_4 е изчислен като % от проникналите нематоди; a,b,c,... степен на доказаност при $P_{0.05}$ по Duncan's Multiple Range Test

Резултатите представни на фигура 8 (В) от тестваният БФ на *S. plymuthica*, при температура $19\pm 1^{\circ}\text{C}$ показват, че значително намаляват инвазията на L_2 в корените на картофените растения спрямо контролите при всички варианти. Действието на безклетъчният филтрат на *S. plymuthica* се характеризира със сходен инициален ефект на БС, което се потвърждава с редуциране на инвазията на L_2 (проникнали L_2 – 14.33%) в корените при вариант – заразяване с L_2 на вторият ден след внасяне на БФ в ризосферата на растенията. Най-висока ефикасност на БФ спрямо инвазията на L_2 в корените, е отчетен при заразяване на растенията на вторият ден след внасяне на БФ в ризосферата на растенията, като процентът проникнали L_2 е 14.33%, а при контролата – 52.00% (фиг. 8 /В/). Най-ниска ефикасност на БФ спрямо инвазията на L_2 е отчетен при заразяване на растенията на двадесет и седмият ден след внасяне на БФ в ризосферата на растенията, като процентът проникнали L_2 е 36.00%, а при контролният вариант съответно 53.00% (фиг. 8 /В/). Процентът на L_4 (женски и мъжки), развиващ се в третираните растения, е значително по-нисък в сравнение с нетретираните варианти. При варианти, когато растенията са заразявани с L_2 до 14 и 7 дни след апликиране на БФ на *S. plymuthica* изолат 72 не е отчетен процент нематоди достигнали стадий на развитие L_4 (фиг. 8 /В/).

Резултатите представни на фигура 8 (С) от тестваният БФ на *S. plymuthica*, при температура $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ показват, че намаляват инвазията на L_2 в корените на картофените растения спрямо контролите при всички варианти. Най-висока ефикасност на БФ спрямо инвазията на L_2 в корените, е отчетен при заразяване на растенията на вторият ден след внасяне на БФ в ризосферата на растенията, като процентът проникнали L_2 е 16.00%, а при контролата – 54.00%. Най-ниска ефикасност на БФ спрямо инвазията на L_2 е отчетен при заразяване на растенията на двадесет и седмият ден след внасяне на БФ в ризосферата на растенията, като процентът проникнали L_2 е 39.25%, а при контролният вариант съответно 55.00% (фиг. 8 /С/). При варианти, когато растенията са заразявани с L_2 до 14 и 7 дни след апликиране на БФ на *S. plymuthica* изолат 72, не е отчетен процент нематоди достигнали стадий на развитие L_4 (фиг.8 /С/ и фиг. 9).



Фигура 9. Експеримент за установяване влиянието на БС/БФ на *S. plymuthica* изолат 72 върху инвазията на L_2 на *G. pallida* в корените на растенията при различна температура в термостат; **А, В, С** – инвазионни ларви втора възраст на *G. pallida* в тъканите на корените, ориг.

4.4.2. Влияние на бактериална суспензия (БС)/безклетъчен филтрат (БФ) *S. plymuthica* изолат 72 върху развитието на *G. pallida* в корените на растенията

Влиянието и ефективността на БС/БФ на *S. plymuthica* изолат 72 върху развитието и репродукцията на *G. pallida* по корените на картофените растения са представени в таблица 22. На 6-ия и 12-ия ден след заразяване на растенията и внасяне на БС/БФ *S. plymuthica* изолат 72, в корените са отчетени само проникнали L_2 . При контролния вариант на 12-ия ден, 44.8% от проникналите ларви са преминали в стадий L_3 . С напредване на експеримента ефективността на БС/БФ на *S. plymuthica* изолат 72 намалява, като броят на различните стадии на развитие се увеличава постепенно след 18-ия и 24-ия ден от третирането на растенията. На 18-ия ден от заразяване и третиране на растенията, 25.0% (за БС на *S. plymuthica* изолат 72) и 21.0% (за БФ на *S. plymuthica* изолат 72) от проникналите ларви са преминали в стадий L_3 (табл. 22). На 24-ия ден от инокулацията и внасянето на бактериалните препарати в ризосферата, само 9.2% (за БС на *S. plymuthica* изолат 72) и 9.5% (за БФ на *S. plymuthica* изолат 72) от проникналите ларви достигат до стадий L_4 , в сравнение с 76.2% при контролата (табл. 22, фиг. 12).

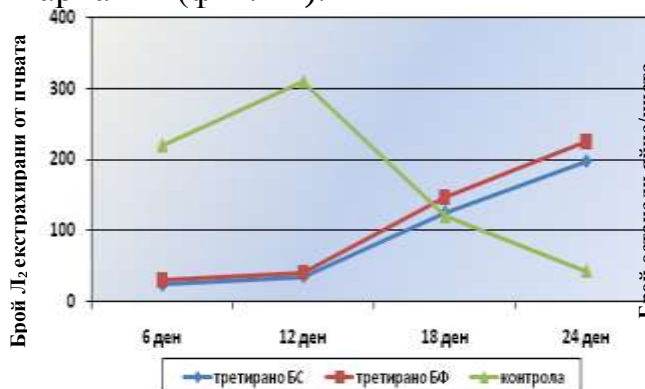
Таблица 22. Ефект на *S. plymuthica* изолат 72 върху развитието на *G. pallida* в корените на картофите по различно време след инокулация с 9 цисти (Пк ~ 3 яйца/g почва) и приложение на 20 ml БС *S. plymuthica* (1.7×10^8 клетки/ml) и 20 ml БФ *S. plymuthica* (концентрация 5%).

Третирания	Период на отчитане (дни)	Стадий на развитие на <i>G. pallida</i> (%)*			
		L_2	L_3	L_4	
				женски	мъжки
<i>S. plymuthica</i> БС	6	100a**	0f	0d	0d
<i>S. plymuthica</i> БФ		100a	0f	0d	0d
Контрола		100a	0f	0d	0d
<i>S. plymuthica</i> БС	12	100a	0f	0d	0d
<i>S. plymuthica</i> БФ		100a	0f	0d	0d
Контрола		55.2f	44.8a	0d	0d
<i>S. plymuthica</i> БС	18	75.0c	25.0c	0d	0d
<i>S. plymuthica</i> БФ		79.0b	21.0d	0d	0d
Контрола		18.9g	45.6a	24.5b	11b
<i>S. plymuthica</i> БС	24	61.3e	29.5b	5.7c	3.5c
<i>S. plymuthica</i> БФ		69.5d	21.0d	6.3c	3.2c
Контрола		10.5h	13.3e	47.5a	28.7a

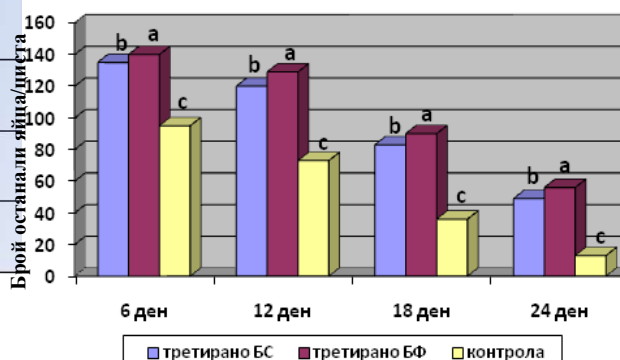
*изчислени като% от проникнали нематоди в корените; **a,b,c...стойности, последвани от различни букви в колоните, се различават значително според Duncan's Multiple Range Test ($P < 0.05$).

Излюпените L_2 в почвата, определени за всяка дата за вземане на проби, изчислена от данните за броя на цистите (фиг. 11), се забавя значително ($P < 0.05$) в саксиите, третирани с БС/БФ на *S. plymuthica* спрямо контролните варианти. Забавянето, наблюдавано при излюпването, се отразява и в броя на L_2 , екстрахирани от почвата, най-вече през 6-ия и 12-ия ден, когато са отчетени с 89.5% (6 ден след третирани с БС), 86.3% (6

ден след третиране с БФ) и 88.7% (12 ден след третиране с БС), 86.7% (12 ден след третиране с БФ), по-малко на брой L_2 спрямо контролните варианти (фиг. 11).



Фигура 10. Брой останали яйца/циста на *G. pallida* по различно време след заразяване с 9 цисти (Пк ~ 3 яйца/g почва) и приложение на 20 ml БС *S. plymuthica* (1.7×10^8 клетки/ml) и 20 ml БФ *S. plymuthica* (концентрация 5%); *a,b,c...стойности, последвани от различни букви за всеки вариант, се различават значително според Duncan's Multiple Range Test ($P < 0.05$).



Фигура 11. Брой L_2 на *G. pallida*, екстрахирани от почвата по различно време след заразяване с 9 цисти (Пк ~ 3 яйца/g почва) и приложение на 20 ml БС *S. plymuthica* (1.7×10^8 клетки/ml) и 20 ml БФ *S. plymuthica* (концентрация 5%).

Екстрахираните от почвата L_2 за варианти 18 и 24 ден след третиране с БС/БФ на *S. plymuthica* силно се увеличава, което показва че бактерията притежава само инхибиращо действие спрямо яйцата и потиска излюпването на L_2 (фиг. 10 и 11). Получените резултати от проведените експерименти за влияние на БС/БФ *Serratia plymuthica* изолат 72 върху развитието на *G. pallida* по корените на растенията най-силно засягат L_2 и по-слабо L_3 . Третиране на картофените растения с БС/БФ на *S. plymuthica* изолат 72, намалява броя на проникналите инвазионни ларви втора възраст в корените и възпрепятства развитието им до L_4 (мъжки и женски индивиди) за около 2 седмици. Това показва, че бактерията отделя вторични метаболити, а безклетъчният филтрат състоящ се само от вторични метаболити, засяга нормалното движение на част от излюпените L_2 , а останалите директно ги убива. Третирането на растенията с БС/БФ на *S. plymuthica* изолат 72, потиска излюпването на инвазионните ларви втора възраст, което намалява броят им в почвата, определен след екстрахиране през първите 6 до 12 дни.



Фигура 12. L_4 млади женски на *Globodera pallida* формирани по корените на картофените растения⁴, ориг.

⁴ Фотографиите са направени със стереомикроскоп Zeiss Stemi 2000-C, снабден с камера Zeiss Axio Cam ERc 5s

S. plymuthica изолат 72 проявява ефикасност за предотвратяване на инвазия и намаляването на броя на нематодите в корените на растението и съответно влияе значително върху крайния брой на установените цисти/саксия (табл. 24, $P < 0.05$). Имаше ясни доказателства, че забавената поява е повлияла на инвазията на L_2 в корените, тъй като броят на различните стадии на ларвите се увеличава постепенно с напредването на експеримента (табл. 22). Двадесет и четири дни след инокулацията само 9.2 до 9.5% (съответно за БС и БФ) от L_2 в корените на растенията достигат до L_4 (млади женски/мъжки нематоди) в третираните растения в сравнение с 76.2% при нетретираните. Въпреки, че една част от инвазионните ларви 2-ра възраст могат да се развият до зрели индивиди (9.2-9.5%), *S. plymuthica* изолат 72 потиска плодовитостта на женските, като намалява броя на яйцата установени в цистите с 40-32% (съответно при варианта с БС и БФ) в сравнение с тези от нетретираните варианти ($P < 0.05$) (табл. 24). Въпреки, че крайната популационна плътност на нематодите (Пк) в третираните с бактерията варианти (13.0 и 13.6 яйца/g почва, съответно с БС и БФ) е с 91.0 и 90.3% по-ниска, отколкото в нетретираната контрола (141.5 яйца/g почва).

Двадесет и четири дни след инокулацията теглото вегетативната част на растенията, третирани с БС и БФ на *S. plymuthica*, е подобно на тези от контролата без нематодна инфекция, но теглото на корените им е с ~11% по-малко (табл. 23). Теглото на вегетативната част и корените на третираните растения обаче е значително по-високо от необработените с нематоди, съответно с 16.7 и 13.3% ($P < 0.05$). Положителните резултати от растежа на растенията през първия месец, когато те са най-уязвими, се отразяват положително и върху добива на картофи (114 дни след засаждането), който е съответно 1.34 и 1.31 пъти по-висок при третираните с бактерията растения в сравнение с нетретираната контрола (табл. 24). Не се наблюдават значителни разлики в теглото на клубените между растения, третирани с БС и БФ на *S. plymuthica* и нетретираните растения без нематодна инфекция (съответно 27.4, 27.0 и 27.6 g).

Таблица 23. Тегло на вегетативната част и корена на картофи сорт Надежда, 24 дни след инокулиране с цисти на *G. pallida* (Пн ~ 3 яйца/g почва) и апликиране на 20 ml БС на *S. plymuthica* (~ 10^8 клетки / ml) или БФ на бактерията (5 %).

Варианти	Тегло на вегетативната част (g)	Тегло на корена (g)
<i>S. plymuthica</i> (БС)	12.6a*	11.1a
<i>S. plymuthica</i> (БФ)	12.1a	11.0a
Контрола 1	10.5b	7.2b
Контрола 2	12.8a	12.5a

Контрола 1 – с *G. pallida*; Контрола 2 – без нематодна инфекция от *G. pallida*; *a,b,c...стойности, последвани от различни букви в колоните, се различават значително според Duncan's Multiple Range Test ($P < 0.05$).

Таблица 24. Тегло на клубените, брой цисти, брой яйца / циста, брой яйца/g почва, Пк (яйца/g) и размножаване (Пк/Пн) на *G. pallida* 114 дни след инокулация с цисти на *G. pallida* (Пн ~ 3 яйца/g почва) и апликирате на 20 ml БС на *S. plymuthica* (~ 10⁸ клетки / ml) или БФ на бактерията (5%).

Варианти	Тегло на клубена (g)	Цисти/саксия	Яйца/циста	Яйца/g почва	Репродукция Пк (%)	Пк/Пн
<i>S. plymuthica</i> (БС)	27.4a*	60a	130a	13.0a	91.0	4.3
<i>S. plymuthica</i> (БФ)	27.0a	55a	148a	13.6a	90.3	4.5
Контрола 1	20.4b	393b	216b	141.5b		47.2
Контрола 2	27.6a	-	-	-		

Контрола 1 – с *G. pallida*; Контрола 2 – без нематодна инфекция от *G. pallida*; *a,b,c...стойности, последвани от различни букви в колоните, се различават значително според Duncan's Multiple Range Test (P < 0.05).

Въз основа на проведените за първи път изследвания за влиянието на *S. plymuthica* върху развитието и репродуктивността на *G. pallida* в корените на растенията, беше установено, че от всички стадии на развитието на *G. pallida* инвазионната ларва 2-ра възраст и ларва 3-та възраст са най-чувствителни на бактерията. *S. plymuthica* потиска развитието на Л₄ (женски/мъжки екземпляри в корените на растенията) и намалява репродуктивната способност на КЦН.

Поучените резултати от „*in vitro*” и „*in vivo*” експериментите дават основание да се препоръча прилагането на *S. plymuthica* да става през периода на активната вегетация на растенията, като моментът на внасянето се съобразява с развитието на КЦН, което до голяма степен зависи от температурата на почвата. Най-добри резултати могат да се очакват, ако апликирането на *S. plymuthica* стане не по-късно от настъпването на 3-та ларвна възраст.

Еднократното внасяне на *S. plymuthica* (x10⁸ клетки/ml) в доза 20 ml/растение предпазва корените от инвазията на КЦН през първите 24 дни и увеличава добива с около 1.9 пъти в сравнение с нетретирани растения.

Употребата на бактериалната суспензия на *S. plymuthica* трябва да се ограничи до температури над 14°C. При по-ниски температури, като алтернатива, може да се апликира БФ на *S. plymuthica*.

5. ИЗВОДИ

1. Обследването на площите на картофените насаждения в областите – Софийска, Пазарджишка, Смолянска и Бургаска, през периода 2017- 2019 година потвърждават повсеместното разпространение на картофените цистообразуващи нематоди от род *Globodera*.

2. Най-висока популационна плътност от изследваните райони е установена в с. Равногор (610 брой цисти/100 g почва), а най-ниска в с. Везенково (3.5 брой цисти/100 g почва).

3. Морфологично установени и молекулярно доказани са два вида нематоди от род *Globodera* – *Globodera rostochiensis* (златиста картофена

цистообразуваща нематода) и *Globodera pallida* (бледа картофена цистообразуваща нематода). Преобладаващ вид е *G. pallida*. Видът се среща в 86.6% в изследваните картофопроизводителни площи.

4. Четири сорта (Cronos, Cekin, Gawin, Ovacij) и седем линии (Е 1789, Е 606, Е 1096, Е 1809, Д 344, Д497, Д 348) *Solanum tuberosum* проявяват устойчивост към *G. rostochiensis* (индекс на устойчивост 6-8). Два сорта (Gandawa и Ivetta) проявяват силна устойчивост (индекс на устойчивост 9) към *G. rostochiensis*. Два от тестваните сорта Cronoss и Ivetta, както и линия Е 1096, Е 1809 и Е 606 са с установена толерантност към *G. pallida* (индекс на устойчивост 4-5).

5. Всички 8 тествани растителни екстракти проявяват нематоцидно действие срещу L_2 на *G. rostochiensis* и *G. pallida*, като с най-висока ефикасност са три от тях – *Juglans regia* 80.00 и 78.00%, *Ruta graveolens* 69.00 и 67.00% и *Plantago major* 47.00 и 42.00%.

6. Проведените „in vitro” експериментите при различни температури с растителните екстракти показват, че тя не оказва съществено влияние на инхибиращият ефект върху цистите и токсичното им действие спрямо L_2 на *G. pallida*.

7. ГХ-МС анализа на растителни екстракти от *J. regia* *R. graveolens* *P. major* с отчетена висока ефикасност срещу *G. pallida*, определи състава на част от съединенията (главно неполярни) в тях.

8. Дванадесет изолата ризобактерии, проявиха ларвицидно действие срещу *G. rostochiensis* и *G. pallida*. Най-голяма ефикасност показва - *Serratia plymuthica* изолат 72.

9. Най-висока степен на инхибиране на излюпването на ларви 2-ра възраст (L_2) при *G. pallida* (94.50 - 95.75 и 100.00%), БС и БФ на *S. plymuthica* изолат 72 причинява в концентрация, съответно $\times 10^8$ клетки/ml и 10.0 % при експозиция 3 и 6 седмици. При същите дози *S. plymuthica* проявява най-добър ларвицидна ефикасност при експозиция 72 часа – съответно 86.75 % и 86.50%.

10. В интервала 19-24°C ефикасността на БС и БФ на *S. plymuthica* изолат 72 срещу L_2 на *G. pallida*, съответно в концентрации $\times 10^8$ клетки/ml и 5.0% при експозиция 72 часа, причиняват най – висока смъртност на L_2 и има най-добре изразено инхибиращо действие върху излюпването на ларвите от цистите при експозиция 3 и 6 седмици.

11. При 14°C ефикасността на БФ на *S. plymuthica* върху *G. pallida* е по-добре изразена.

12. Нематоцидното действие на *S. plymuthica* изолат 72 срещу инвазията на ларва 2-ра възраст по корените на картофените растения, продължава до 14-я ден, а нематостатичното – до 21-я ден.

13. Бактерията потиска развитието на женските екземпляри в корените и намалява плодовитостта на нематодите. Инвазионните ларви 2-

ра възраст и ларви 3-та възраст са най-чувствителни на *S. plymuthica* изолат 72.

14. Прилагането на *S. plymuthica* да става през периода на активната вегетация на растенията, като моментът на внасянето се съобразява с развитието на КЦН. Най-добри резултати могат да се очакват, ако апликирането на *S. plymuthica* стане не по-късно от настъпването на 3-та ларвна възраст.

15. Еднократното внасяне на *S. plymuthica* ($\times 10^8$ клетки/ml) – БС в доза 20 ml/растение/БФ (5% разтвор с 20 ml/растение), предпазва корените от инвазията на КЦН през първите 24 дни и увеличава добива с около 1.9 пъти в сравнение с нетретирани растения. Употребата на БС на *S. plymuthica* трябва да се ограничи до температури над 14°C. При по-ниски температури, като алтернатива, може да се апликира БФ на *S. plymuthica*.

6. ПРИНОСИ

1. Оригинални приноси

1. Проучено е разпространението на картофените цистообразуващи нематоди (КЦН) от род *Globodera* в Софийска, Пазарджишка, Смолянска и Бургаска картофопроизводителни области на България. За периода 2017-2019 година, за всеки от установените 15 района заразени с тези паразити, са определени: *Globodera* spp. и популационната им плътност.

2. Създадена е генетична банка на разпространените в картофопроизводителни района в страната два вида КЦН: *Globodera rostochiensis* и *Globodera pallida*.

3. При идентифицирането на *G. rostochiensis* и *G. pallida* за първи път у нас е приложен метода на полимеразната верижна реакция (PCR), като са използвани ген-специфични праймери.

4. Проучени са растителни екстракти и изолати на ризобактерии като агенти за биологична борба срещу КЦН от род *Globodera*.

5. За първи път в страната са установени оптималните концентрации и температури, при които растителните екстракти *Juglans regia*, *Ruta graveolens* и *Plantago major* проявяват най-висока нематоцидна активност срещу *G. pallida*.

6. Определени са метаболитните профили на *J. regia*, *R. graveolens* и *P. major* анализирани чрез газ хроматография – мас спектрометрия (ГХ-МС).

7. За първи път са установени оптималните параметри (концентрация и температура), при които ризобактерията *Serratia plymuthica* проявява най-висока ефикасност срещу *G. pallida*.

8. Установен е периода на нематоцидното и превантивното действие на *S. plymuthica* срещу инвазията на ларви 2-ра възраст на *G. pallida* по корените на картофените растения.

9. Определено е действието на ризобактерията *S. plymuthica* върху развитието и размножаването на *G. pallida* в корените на растенията.

10. Апликирането на *S. plymuthica*, за борба с КЦН по зеленчуковите култури – картофи, да става през периода на активна вегетация, съобразено с развитието на ларви 2-ра възраст – не по-късно от настъпване на 3-та ларвна възраст на паразита.

II. С потвърдителен характер

1. Изследванията върху морфологичните и морфометрични характеристики на идентифицираните два вида КЦН от род *Globodera* са с потвърдителен характер.

7. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ПО ДИСЕРТАЦИЯТА

1. **Kostadin Trayanov**, Harry Samaliev, Silvia Valcheva, Strahil Berkov, Milena Nikolova, (2018). The effect of plant extracts on egg hatching and second-stage juvenile motility of potato cyst nematode *Globodera pallida*. *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans*, 2018, 21 (2), 257-273

2. **Kostadin Trayanov**, Dima Markova, Ivanka Tringovska, Harry Samaliev, (2019). Influence of the Temperature and the Time of Exposure on the Inhibitory Effect of *Serratia plymuthica* on the Potato Cyst Nematode *Globodera pallida*. *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans*, 2019, 22 (1), 348-357

3. **Trayanov, K.**, Samaliev, H., Kostova, M., Bojinov, B. and Besheva, A. (2020). Morphological and molecular identification of potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida* in Bulgaria. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 26 (No 2) 2020, 416–422

4. **Kostadin Trayanov** and Milena Kostova, (2020). ISSR molecular markers for the study of the genetic diversity in bulgarian populations of PCN from genus *Globodera*. *Agricultural Sciences*, Volume 12 Issue 27 2020, 25-28

PLANT PARASITIC NEMATODES OF THE GENUS *GLOBODERA* SKARBILOVICH, 1959 ON POTATOES IN BULGARIA

Summary

Kostadin Kirilov Trayanov

Soil samples from 15 areas located in Sofia, Pazardzhik, Smolyan and Burgas potato-producing regions in Bulgaria have been investigated and in all of them have been identified potato cyst nematodes (PCN) from genus *Globodera*, namely: *G. rostochiensis* and *G. pallida*. Morphological and molecular data of the two identified species of PCN have been presented.

Studies have been performed to establish the resistance of different varieties and lines (Bulgarian selection) of potatoes to location population of the two parasites. The lines *Solanum tuberosum* - E 1096, E 1809 and E 606 have a resistance to *G. rostochiensis* and partial resistance to *G. pallida*.

The influence of the rhizobacterium *Serratia plymuthica* and three plant extracts *Juglans regia*, *Ruta graveolens* and *Plantago major* on the potato cyst nematode *G. pallida* was investigated. *In vitro*, exposure of cysts of *G. pallida* to bacteria resulted in reduced hatching of second stage juveniles (J₂) and J₂ exposed to the bacteria or plant extracts were paralyzed or even killed as the dosage and time of exposure increased. The effect was more expressed at 24 and 19°C than at 14°C. However, cell-free filtrate of the bacterium irreversibly prevented hatching even at 14°C. In *in vivo* experiments, in closed containers and in pots, *S. plymuthica* delayed hatching of *G. pallida* J₂ and preventing their invasion in potato roots. The application of *S. plymuthica* at the beginning of the growing season, before the formation of third stage juveniles (J₃) was increased the potato yield with 26%, in comparison with the control.