

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

**ИНСТИТУТ ПО ФИЗИОЛОГИЯ НА РАСТЕНИЯТА И ГЕНЕТИКА
ЛАБОРАТОРИЯ “ПРИЛОЖНА ГЕНЕТИКА И РАСТИТЕЛНИ БИОТЕХНОЛОГИИ”**

ЗОРНИЦА БОГДАНОВА СТОЯНОВА

**Гъбни патогени от род *Colletotrichum*, причинители
на антракноза и кореново гниене по зеленчукови
култури от семейство Solanaceae в България**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД

**ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНАТА И НАУЧНА СТЕПЕН
„ДОКТОР”**

НАУЧНО НАПРАВЛЕНИЕ 4.3. Биологични науки

НАУЧНА СПЕЦИАЛНОСТ Генетика, шифър 01.06.06

Научни консултанти:

ДОЦ. Д-Р РОСИЦА РОДЕВА

ГЛ. АС. Д-Р ВАСИЛИСА МАНОВА

София

2021

Дисертационният труд се състои от общо 143 страници, в т.ч. 22 таблици и 67 фигури. Библиографската справка включва 276 заглавия, от които 20 на кирилица и 256 на латиница. Експерименталната работа е извършена в Институт по физиология на растенията и генетика – БАН.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на заседание на разширен научен съвет на Лаборатория “Приложна генетика и растителни биотехнологии” към Институт по физиология на растенията и генетика – БАН, проведено на 26.05.2021 г. със заповед No РД-10-05/17.05.2021 г. на Директора на ИФРГ.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на от.....часа в Заседателната зала на ИФРГ – БАН, ул. „Акад. Георги Бончев“, бл. 21, ет. 2, гр. София на открито заседание на Научно жури, назначено от Директора на ИФРГ със заповед No РД-10-07/30.06.2021 г. в състав:

Вътрешни членове

Проф. д-р Светлана Мишева – ИФРГ, БАН

Доц. д-р Росица Родева – ИФРГ, БАН

Външни членове

проф. дбн Мария Ангелова – ИМ, БАН

проф., дсн Йорданка Станчева – ЛТУ

доц. д-р Славчо Славов – ЛТУ

Материалите по защитата са на разположение на интересующите се в библиотеката на ИФРГ, БАН, ст. 225, ул. „Акад. Георги Бончев“, бл. 21, ет. 2, гр. София и на Web страницата на ИФРГ <http://www.bio21.bas.bg.ippg>

УВОД

Ботаническото семейство Solanaceae (Картофови) включва няколко важни зеленчукови култури като картоф, домати, пипер и патладжан. Голямото им стопанско значение се определя от високата им хранителна стойност. Те често са общи гостоприемници на различни патогени, сред които тези от род *Colletotrichum*. През последните години този род е поставен на осмо място сред десетте най-важни фитопатогенни гъби в света въз основа на научната и икономическа значимост на неговите видове. Те причиняват болести, най-често наричани антракнози, които водят до значителни икономически загуби при различни култури. Тази група патогени, както и болестите, които причиняват, са сравнително слабо изучени у нас.

Видовете *C. coccodes*, *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* и *C. truncatum* (в някои статии публикуван като синонима *C. capsici*) са най-често съобщаваните причинители на антракноза по гостоприемници от семейство Solanaceae в различни страни на света. В България не са правени задълбочени проучвания върху видовете участващи в популацията и етиологията на причиняваните от тях болести. Данните са оскъдни и в повечето случаи неточни. Използват се остарели синоними на патогените. В продължение на повече от 30 години като причинител на болестта по картофа е посочван *C. atramentarium*, по пипера *C. capsici*, по домата *C. phomoides*, а по патладжана *C. melongenae* или *C. atramentarium*. Едва наскоро е направено първо съобщение за поява на *C. acutatum* по домати и пипер.

За патосистемите на *Colletotrichum* е характерно, че няколко вида могат да нападат един и същ гостоприемник, както и че един вид може да заразява широк кръг гостоприемници, разкривайки голям потенциал за кръстосани инфекции.

Точното таксономично идентифициране на видовете *Colletotrichum*, патогенни за пипера, домата, патладжана и картофа, определянето на тяхната вариабилност, както и разкриването на евентуални източници на устойчивост е необходима предпоставка за разработването на най-ефективни средства за борба и селекцията на устойчивост при тези важни зеленчукови култури.

1. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на дисертационния труд е идентифициране и характеризирание на видовете *Colletotrichum*, причиняващи болести по важни зеленчукови култури от семейство Solanaceae (пипер, домати, картоф, патладжан) и търсене на потенциални източници на устойчивост.

За постигане на тази цел са набелязани следните задачи:

- Описание на характерни симптоми по надземни и подземни растителни органи;
- Изолиране на видове *Colletotrichum* от заразени растителни тъкани;
- Фенотипна, генотипна и патогенна характеристика на избрани изолати;
- Оценка на реакцията на образци пипер към антракноза по плодовете при естествено и изкуствено заразяване.

2. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

2.1. Събиране на изходен инфекциозен материал и изолиране на патогените

Материалът за проучването е събиран в периода 2006 - 2017 г. и е осигурен от три основни източника: болни растения и растителни части от производствени насаждения; от стационарни полски опити и плодове със симптоми, закупени от търговската мрежа. Проведени са маршрутни обследвания в производствени масиви. В опитното поле на Института по физиология на растенията и генетика (ИФРГ), София, ежегодно са залагани стационарни полски опити с изследваните зеленчукови култури от семейство Solanaceae. През 2011 и 2012 г. във връзка с изпълнението на проект SEE-ERA.Net PLUS 226/01 освен обследвания по пипера в България са осъществени и съвместни международни експедиции в производствени полета и полиетиленови оранжерии в Северна Македония и Сърбия.

Изолирането и идентифицирането на гъбите е осъществено в Лаборатория „Приложна генетика и растителни биотехнологии” на ИФРГ. Изолациите от пипер, домати и патладжан са направени от болни плодове с типичните симптоми на антракноза, както и от корени с микросклерозии на преждевременно загиващи растения от същите гостоприемници, а от картоф – от различни части на растението, по които е наблюдавано напътняване и наличие на микросклерозии (основа на стъблото, клубени, столони, корени). Изоляции са правени директно от различни структури на гъбните патогени – микросклерозии или асервули със спорово желе или индиректно чрез отрязване на малки късчета (около 4 x 4 mm) от заразени растителни органи на границата между болната и здравата тъкан, повърхностното им стерилизиране, изплакване със стерилна дестилирана вода, подсушаване върху стерилна филтърна хартия и поставяне в петриеви блюда, съдържащи хранителна среда.

2.2. Хранителни среди

За първични изоляции и размножаване на културите за получаване на инокулум е използван пряко приготвен **картофено-декстрозен агар (КДА)**. Един литър съдържа

отвара от 200 g картофи, 20 g декстроза (D-глюкоза) и 20 g агар. Моноконидални култури са получени чрез разреждане на спорова суспензия от изходните изолати и посевка върху 2% **воден агар** (ВА). Всички изолати са поддържани върху скосен КДА в епруветки при 4 °С в хладилник. За опитите по растеж и морфолого-културална характеристика на изолатите са използвани няколко различни хранителни среди: **КДА**; **ВА**; **Sucrose soy protein agar** (SSPA). Един литър от средата съдържа 20,0 g захароза, 5,0 g соев протеин, 5,0 g KNO₃, 5,0 g KH₂PO₄, 2,0 g MgSO₄, 0,5 g CaCl₂, 0,05 g CuSO₄ и 20,0 g агар; **Mung bean agar** (МБА). 40 g семена от папуда (*Vigna radiata* L.) се поставят в 1 l вряща дестилирана вода за около 20 min, когато се разпуква перикарпът на приблизително 50 % от семената; отварата се прецежда през два пласта тензух, добавят се 20 g агар и се долива до 1 l; **Малцов екстракт агар** (МЕА). Един литър от средата съдържа 20,0 g малцов екстракт, 5,0 g пептон и 20,0 g агар; **Овесен агар** (ОА). 70 g овесено брашно се вари в 1 l дестилирана вода за около 20 min, след което се прецежда през два пласта тензух, добавят се 20 g агар и се долива до 1 l.

Необходимата за молекулярно-генетичните изследвания гъбна биомаса е получавана чрез култивиране в течни хранителни среди: **картофено-декстрозен бульон** (1 l съдържа отвара от 200 g картофи и 20 g декстроза) или **глюкозо-казеинов бульон** (1 l съдържа 15,0 g глюкоза; 1,0 g KH₂PO₄; 0,5 g MgSO₄; 4,6 g казеин хидролизат и 2 ml разтвор със следи от елементи, чийто изходен разтвор е подготвен от 26 mg FeSO₄.7H₂O; 4 mg CuSO₄.5H₂O; 22 mg ZnSO₄.7H₂O и 2 mg MnSO₄.4H₂O в 100 ml дестилирана вода).

Хранителните среди са стерилизирани чрез автоклавиране за 30 min при 121 °С.

2.3. Идентифициране на патогените и описание на причинените от тях симптоми

2.3.1. Фенотипна характеристика на избрани изолати

Основен метод за определяне на видовия състав на изследваните патогени е сравнително-морфологичният. Симптомите са описани по естествено и изкуствено заразени растения или растителни органи от съответните гостоприемници.

Идентифицирането на видовете *Colletotrichum* е направено посредством пряко наблюдение на структурите, образувани върху заразени растителни части и при култивиране в хранителни среди. Изучаването на морфологията е извършено чрез микроскопиране на временни препарати. Взети са под внимание признаците с най-висока таксономична стойност: морфология и размери на конидиите, морфология на

колониите, наличие на сети, полов морф и микросклероции, образуване на пигмент, скорост на растежа и особености на апресориите.

Инокулумът за изучаване на растежа и спороношението на гъбите е получен върху КДА при 25 °С на тъмно. Морфолого-културалните характеристики на избрани изолати от всеки вид *Colletotrichum* са изследвани върху различни хранителни среди. От периферията на активно растящи колонии са отрязани дискове с диаметър 6 mm и са поставени в центъра на петриеви блюда (d = 90 mm), всяко съдържащо 25 ml от съответната хранителна среда по 5 повторения за вариант. Изолатите са инкубирани при 25 °С и светлинен режим 12 часа ден/12 часа нощ. Формата, профилът, периферията и цветът на колониите, както и образуването на пигмент и микросклероции са определяни визуално; контурите и структурата – при малко увеличение на бинокулярната лупа, а наличието на безполов и полов морф, сети и апресории – чрез микроскопиране. За оценка на мицелния растеж са измервани два взаимно перпендикулярни диаметра на колониите 7 и 14 дни след инокулирането. Проследена е способността на изолатите да образуват спороношение върху естествен субстрат и хранителна среда. Измерени са най-малко по 100 конидии и аскоспори и по 30 микросклероции върху дигитални снимки, направени с камера Canon PowerShot A95, използвайки програма Carnoy. Част от снимките и измерванията са направени на микроскоп Olympus BX41 със софтуер Cell[^]F for Imaging Life Science Microscopy. Размахът на варирането в размерите на конидиите, аскоспорите и микросклероциите е представен под формата на: (най-ниска стойност –) средна аритметична стойност ± средна грешка на средната аритметична (– най-висока стойност). Всички стойности за конидиите и аскоспорите са закръглени до първия знак след десетичния, а за микросклероциите – до цяло число. Цветът на колониите е описан по Rauger.

За фенотипната характеристика на *C. coccodes* от пипер са избрани 12 изолата, разделени в три групи. В първите две групи са включени изолати, получени от болни растения в България. Група А е представена от 4 изолата от корени (B8-2, B12-9, B12-13 и K18-1, последният е от ранна коренова инфекция); група Б – 4 от плодове (B12-33, B12-45, B12-46 и B12-47). Изолатите от група В произхождат от заразени плодове от Северна Македония (MK7-1, MK7-2, MK26-1 и MK26-2). За изследване на морфолого-културалните характеристики на гъбните изолати са подбрани 3 хранителни среди: КДА, SSPA и BA.

За разграничаване на изолатите на *C. coccodes* от корени на пипер от тези на образуващия микросклероции почвен патоген *Macrophomina phaseolina* (Tassi)

Goidanich допълнително е приложена техника, разработена от Ostazeski. Върху петриеве блюда ($d = 90 \text{ mm}$), съдържащи по 25 ml ВА, се поставят по 4 диска ($d = 12 \text{ mm}$) от листа на люцерна, предварително стерилизирани с $0,05\% \text{ NaClO}$, трикратно изплакнати със стерилна дестилирана вода и подсушени върху стерилна филтърна хартия. От активно растяща върху КДА колония на *C. coccodes* са отрязани кръгчета с диаметър 6 mm . Върху края на всеки люцернов диск се поставя по едно кръгче от гъбната култура, обърнато с мицела към листа, така че половината от агаровото блокче да лежи върху листната тъкан, а другата – върху повърхността на водния агар. Всеки изолат е представен от 5 петриеве блюда, които са инкубирани при $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

За фенотипната характеристика на *C. coccodes* от картоф са изследвани изолати от различни части на болни растения (P5-4, P13-1, P13-2 и P13-2-3). За сравнение са включени два изолата от корени на пипер (K18-1 и B12-13) и един референтен изолат от корени на домати (CBS 527.77), обозначен като CcCBS. За изучаване на морфологичните и културални особености на гъбните изолати са избрани три хранителни среди: КДА, SSPA и MBA.

За провеждане на сравнително морфологично проучване на два вида *Colletotrichum* са избрани пет изолата от *C. acutatum sensu lato* (Ca3₃, Ca13₁, Ca37₂, Ca44₁ и Ca48₂) и два от *C. coccodes* (Cc38₂ и Cc32₃). Диаметърът на колониите е измерен след 3-, 5-, 7- и 9-дневно култивиране върху КДА и е изчислена площта им (mm^2).

За фенотипната характеристика на *C. gloeosporioides sensu lato* са включени пет избрани изолата, получени от плодове на пипер със симптоми на антракноза: три от България (B1, B27 и B29) и два от Сърбия (S2 и S3). Макро- и микроскопското идентифициране е направено върху КДА, MEA и OA.

За сравнение на изследваните изолати от пипер, отнасящи се към клон *kahawae* на комплекса *gloeosporioides* са включени изолати от банан, принадлежащи към клон *musae* на същия комплекс. Видът *C. musae* е получен от плодове, закупени от търговската мрежа в София – внос от Еквадор (Cm13) и Камерун (Cm15). Фенотипната характеристика на изолатите е направена върху КДА. За изследване на вегетативното взаимодействие между изолати от *C. musae* (Cm) и други видове *Colletotrichum*: *C. kahawae* subsp. *ciggaro* (Ckc) (от комплекса *gloeosporioides*) и *C. coccodes* (Cc) (самостоятелен вид) е проведен *in vitro* тест по метода на двойните култури. Мицелни дискове с диаметър 5 mm са отрязани от периферията на активно растящи колонии и са поставени по двойки на разстояние $3,5 \text{ cm}$ помежду им в центъра на петриеве блюда ($d = 9 \text{ mm}$) с КДА. Опитът е проведен при $25 \text{ }^\circ\text{C}$ на тъмно. Отчитането е направено на

деветия ден след инокулирането. Взаимодействието е оценено като съвместимо, когато колонии растат една към друга и се сливат без видима граница. Несъвместимостта се проявява в образуването на тъмна ивица в зоната на контакт на двете колонии или в пълно прекратяване на мицелния растеж между тях.

Изследваният материал от *C. truncatum* е изолиран от плодове на пипер със симптоми на антракноза, закупени от търговската мрежа в София – внос от Северна Македония. Направена е морфологична и културална характеристика на изолат С14/14 върху КДА.

2.3.2. Молекулярна диагностика и генотипна характеристика на избрани изолати

Молекулярната диагностика и генотипната характеристика на избрани моноконидиални изолати от род *Colletotrichum* е проведена в лаборатория „Геномна динамика и стабилност” на ИФРГ. Използван е ITS регионът на рибозомалната ДНК.

За получаване на гъбна биомаса изолатите са отгледани за 7-10 дни при 24 ± 2 °C чрез непрекъснато разклащане на орбитална клатачка (125 rpm) в Ерленмайерови колби (300 ml), всяка съдържаща по 100 ml течна хранителна среда: картофено-декстروزен или глюкозо-казеинов бульон. Инокулумът за една колба се състои от 3 диска ($d = 4$ mm) от периферията на активно растящи колонии върху КДА. Мицелът е събран чрез филтруване. Изплакнат е няколкократно със стерилна дестилирана вода. Подсушен е върху стерилна филтърна хартия, замразен в течен азот и съхранен при -65 °C.

ДНК е изолирана от гъбния мицел, използвайки DNeasy Plant mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) според инструкциите на производителя. Интактността на ДНК е определяна чрез неутрална гел-електрофореза в 0,8% агарозен гел с молекулни ДНК стандарти (λ ДНК, Thermo Scientific). ДНК концентрацията и чистотата на всяка проба са определяни спектрофотометрично (BioSpec-nano, Shimadzu, Japan).

Използвани са универсалните праймери ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') и ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), както и създадените за всеки вид специфични праймери. За молекулярната диагностика и характеризиране на изолатите от *C. acutatum* е приложен специфичния праймер CaInt2 (5'-GGGGAAGCCTCTCGCGG-3'), а за *C. gloeosporioides* – CgInt (5'-GGCCTCCCTCCGCCGGGCGG-3') в комбинация с праймер ITS4. За *C. coccodes* са използвани две двойки праймери: родово-специфични Cc1F1 (5'-ACCTAACTGTTGCTTCGGCG-3') / Cc2R1 (5'-AAATTTGGGGGTTTTACGGC-3') и

видово-специфични Cc1NF1 (5'-TGCCGCCTGCGGACCCCCCT-3') / Cc2NR1 (5'-GGCTCCGAGAGGGTCCGCCA-3').

PCR амплификацията е осъществена в градиентен PCR апарат (Thermal cycler QB-96 Server, LKB Vertriebs GmbH). Реакциите са приготвяни в обем 20 µl, съдържащ 25-50 ng тотална геномна ДНК, 1x реакционен буфер (Thermo Scientific; Eurx), 200 µM dNTPs, 0,4 µM праймери, 1,5-2,5 mM MgCl₂ и 0,75-1,25 U Taq (Thermo Scientific; Eurx).

PCR продуктите са подложени на разделяне посредством агарозна гел-електрофореза в 1xTAE буфер(40 mM Tris (Carl Roth), 20 mM ледена оцетна киселина (Carl Roth) и 1 mM EDTA), с концентрация на агарозния гел 1-2% (SERVA) в зависимост от размера на фрагментите, на 60 V за най-малко 2,5 часа. Гелове са визуализирани и фотографирани под ултравиолетова светлина със система за фотодокументация (ImageQuant 150 imager, GE Healthcare Bio-Sciences AB) с дигитална камера (Canon PowerShot A640, Canon Inc) и анализирани денситометрично с ImageQuantTL7 софтуер (GE Healthcare), за да се определи приблизителната дължина на намножените PCR продукти.

ДНК секвенирането на част от изследваните изолати е проведено от Microsynth AG, Швейцария.

2.4. Патогенни свойства на изолатите

2.4.1. Тест за патогенност върху плодове от зелена ябълка

Патогенните свойства на избрани изолати са изследвани върху зелени плодове от ябълка по метода на Talhinas et al. Плодовете предварително са стерилизирани повърхностно с 0,05% NaClO, изплакнати трикратно със стерилна дестилирана вода и оставени да изсъхнат на въздуха за няколко минути. Върху тях са направени отвори с диаметър и дълбочина 0,5 cm, където са поставени мицелни дискове със същия диаметър. Върху всяка ябълка са разположени по четири инокулационни отвора. Гъбният инокулум е произведен чрез отглеждане на моноконидиални култури от съответните видове *Colletotrichum* върху КДА на тъмно при 25 °C. Мицелните дискове са изрязани от периферията на активно растящи колонии на изолатите. За контрола са използвани стерилни дискове от КДА. Изолатите и контролата са подредени по напълно произволна схема в 4 повторения, т.е. по 16 инокулационни отвора за всеки вариант на опита. Плодовете са инкубирани 13 дни при 100% относителна влажност и 25 °C. Реакциите са отчетени като тип на петното и диаметър (mm), образуване на мицел и спороношение.

2.4.2. Тест за патогенност върху откъснати плодове от изследваните гостоприемници

Проведен е предварителен тест върху откъснати плодове от силно чувствителния образец пипер (линия 85/8) за установяване на най-подходящата опитна постановка за изследване на патогенните свойства на изолатите и реакцията на изследваните гостоприемници към *Colletotrichum* spp. Откъснати здрави плодове са подготвени чрез повърхностно стерилизиране с 0,05% NaClO и трикратно изплакване със стерилна дестилирана вода, след което са оставени да изсъхнат на въздуха за няколко минути. За инокулум са използвани мицелни дискове с диаметър 8 mm или 20 µl конидиална суспензия (концентрация 1 x 10⁵ конидии/ml). Половината от плодовете са наранени чрез набождане и тогава са инокулирани. Останалите са инокулирани без нараняване като мястото на нанасяне на инокулума е маркирано предварително. Контролните плодове са третираны с 20 µl стерилна дестилирана вода или със стерилни дискове КДА. Всички плодове са поставени при 100% относителна влажност и 25 °C за 7 дни като са наблюдавани ежедневно за развитие на симптоми.

Проведени са тестове върху откъснати здрави плодове от пипер, домати и патладжан, подготвени по гореописания начин. След набождане с тънка стерилна игла плодовете са инокулирани с агарови дискове (d = 8 mm), съдържащи мицел на съответните изолати. Контролите са инокулирани със стерилни дискове от КДА. Плодовете са инкубирани за 7 дни при 25 °C и 100% относителна влажност като са наблюдавани ежедневно за развитие на симптоми. Направени са реизолации от заразените тъкани.

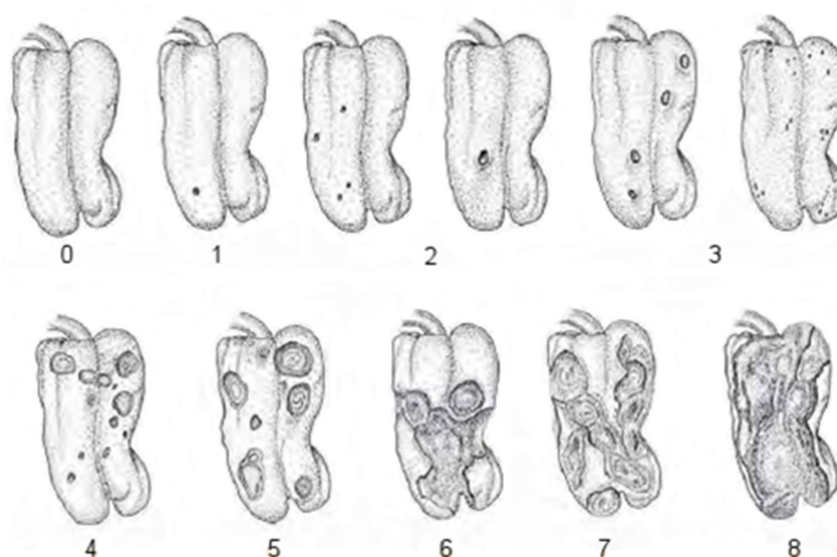
2.5. Реакция на образци пипер към *Colletotrichum* spp. в полски и лабораторни експерименти

2.5.1. Оценка на естественото нападение от *Colletotrichum* spp. по плодове на пипер при полски условия

Оценката на естественото нападение, причинено от *Colletotrichum* spp. по плодовете на пипера, е направена в периода 2007 - 2010 г. при полски условия. В проучването е включена част от поддържаната в ИФРГ колекция от пипер, създадена от доц. д-р Румяна Пъндева. Изследвани са 36 сорта от *Capsicum annuum* (19 български и 17 чуждестранни) и образци от *C. baccatum* var. *pendulum* (10), както и междувидови хибриди на различни етапи на стабилизиране, повечето от които произлизат от хибридни комбинации на *C. annuum* var. *annuum* с *C. chinense* (25) и *C. frutescens* (5). За отчитането е използвана скалата на Pedrozo et al. (2007) (Табл. 1, Фиг. 1).

Таблица 1. Скала за отчитане степента на нападение от антракноза по пипера при полски условия (Pedrozo et al., 2007)

Засегната площ	Тип на петната	Степен
0%	Здрави плодове	0
1 – 20%	Плодове с 1 петно ($d \leq 0.5$ cm)	1
	Плодове с 1 петно ($d > 0.5$ cm) или 2-4 единични или сливащи се петна ($d \leq 0.5$ cm)	2
	2-4 единични или сливащи се петна ($d > 0.5$ cm) или повече от 5 единични петна ($d \leq 0.5$ cm)	3
повече от 20 %	Повече от 5 единични или сливащи се петна ($d > 0.5$ cm)	4
	≥ 1 единични или сливащи се петна с площ между 21% и 40%	5
	≥ 1 единични или сливащи се петна с площ между 41% и 60%	6
	≥ 1 единични или сливащи се петна с площ между 61% и 80%	7
	≥ 1 единични или сливащи се петна с площ по-голяма от 80%	8



Фиг. 1. Схематична скала за отчитане степента на нападение от антракноза по пипера при полски условия (Pedrozo et al., 2007)

2.5.2. Опит с откъснати плодове от пипер, инокулирани с изолати от *Colletotrichum acutatum sensu lato*

Откъснати здрави плодове от пипер в технологична и ботаническа зрялост са подготвени, както е описано по-горе, наранени са чрез набождане и инокулирани с агарови дискове ($d = 8$ mm), съдържащи мицел на най-агресивния изолат от *C. acutatum* (3₃). За контрола са използвани стерилни дискове от КДА. Всички плодове са поставени за 7 дни при 100% относителна влажност и 25 °C. За отчитане на болестта е използвана 0-4 скала, където 0 означава плодове без симптоми; 1 – начало на образуване на малки кафяви петна на мястото на нараняване; 2 – по-добре изразени петна, кафяви, повърхностни с воднисти ръбове; 3 – петна с $d = 2-3$ cm с воднисти

ръбове и по-тъмен център; 4 – петна вдлъбнати, тъмни, с $d > 3$ cm и интензивно спороношение.

В експеримента са включени 23 сорта *S. annuum*, от които 17 български (Сиврия, Златен медал 7, Албена, Пазарджишка капия, Куртовска капия 1619, Бяла капия, Софийска капия, Оранжева капия, Вибо, Калинков, Гороглед, Пазарджишки едър, Български ратунд, Стряма, Фитостоп, Пирин и Хебър), 4 сръбски (Palanačka kapiya, Duga bela, Župska rana и Mačvanka) и 2 унгарски (Fehérëson and Fehérëson synthetic). Като устойчива контрола е използван *S. baccatum* var. *pendulum* (образец № 4). Опитът е проведен двукратно в 3 повторения, всяко от които се състои от 6 зелени и 6 червени плода. Направени са реизолации и получените култури са сравнени с изходните.

2.6. Статистически анализ на резултатите

Статистическият анализ е извършен по общоприети статистически методи с помощта на компютърен софтуер SPSS за Windows. Изчислени са широко използваните в биологичните изследвания обобщени показатели – средна аритметична стойност (M) и средна грешка на средната аритметична (m). За определяне достоверността на разликите при изучаваните признаци е извършен дисперсионен анализ. Най-малката значима разлика (LSD) е изчислена при три нива на достоверност. За оценяване на вариабилността на някои признаци е изчислен вариационният коефициент (VC, %).

3. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

За идентифициране и характеризиране на патогените от род *Colletotrichum* по гостоприемници от семейство Solanaceae е приложен комплексен многофазен подход, включващ фитопатологични, микологични, молекулярно-генетични и статистически методи. След получаването на всички експериментални данни и установяването на видовата принадлежност на изследваните изолати резултатите са представени по реда на набелязаните в дисертационния труд задачи: описание на характерни симптоми; фенотипна, генотипна и патогенна характеристика; оценка на реакцията на образци пипер към антракноза по плодовете при естествено и изкуствено заразяване.

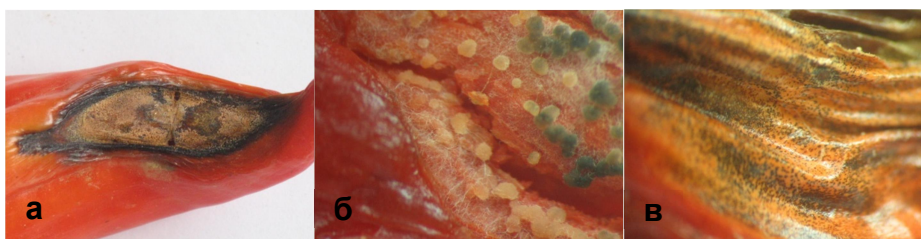
3.1. Характерни симптоми по надземни и подземни растителни органи на гостоприемници от семейство Solanaceae причинени от видове *Colletotrichum*

3.1.1. *Colletotrichum coccodes* – причинител на антракноза и кореново гниене

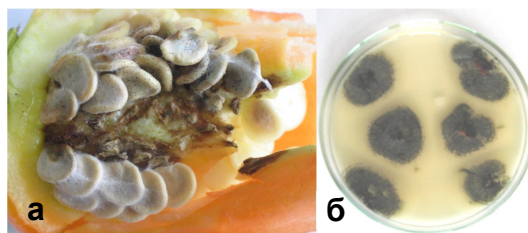
В резултат от направените проучвания е установено, че видът *C. coccodes* е причинител на болести по всички избрани гостоприемници от семейство Solanaceae. Първите изолации на този патоген са направени през 2006 г. Наблюденията, проведени

през периода 2006 – 2017 г., показват, че антракнозата по плодовете, дължаща се на нападение от *C. coccodes*, е най-често срещаното заболяване по пипера, домата и патладжана, както по време на вегетацията, така и при съхранение, макар че патогенът напада и други части на растенията. По картофа инфекцията се проявява като напетняване по клубените, кореново и базично гниене и преждевременно загиване на нападнатите растения.

Напетняването по зрели плодове е най-типичното проявление на нападението от *C. coccodes* по пипера. Отначало се появяват малки, кръгли, воднисти петна, които стават меки и леко вдлъбнати. Броят им върху един плод нараства. Те се сливат и образуват обширни лезии, които покриват голяма част от повърхността на плода. Напълно развитите петна обикновено са кръгли или леко удължени, вдлъбнати и варират по цвят от тъмночервени до жълтокафяви и черни (Фиг. 2а). Отвън и отвътре на заразните плодове се появяват плодни тела (асервули), които отделят желеподобна конидийна маса (Фиг. 2б). Заразените плодове служат като източник на инокулум, позволявайки на болестта да се разпространи от растение към растение в насаждението. При топло и влажно време конидиите се разпространяват чрез дъждовни капки или поливна вода от заразните към здрави плодове. Върху петната се образуват дребни, тъмни, сферични микросклероции (Фиг. 2в). Семената и плацентата на заразните плодове също са засегнати. Микросклероции се наблюдават върху семенната обвивка и гъбата може да бъде изолирана от тях (Фиг. 3а,б).

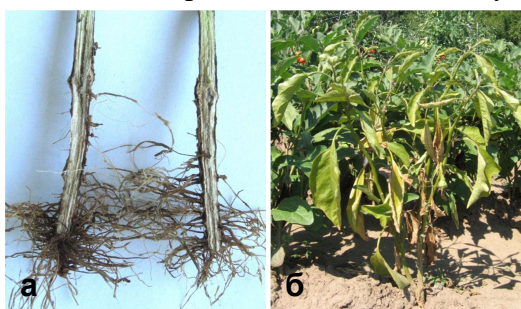


Фиг. 2. Антракноза по плодовете на пипер, причинена от естествено заразяване с *Colletotrichum coccodes*: **а.** Петно със спороносещи асервули по повърхността (х 6,1); **б.** от вътрешната страна на плода (х 16); **в.** Напреднал стадий на инфекцията с микросклероции по повърхността (х 16)



Фиг. 3. Семенна инфекция от *Colletotrichum coccodes*: **а.** Мицел и микросклероции върху семенната обвивка; **б.** Колонии на гъбата, развили се от заразните семена

При нападение на корените на пипера от *C. coccodes* по тях се забелязват обширни кафяви до сиви лезии, напукване и лющене на кората, наличие на микросклероции (Фиг. 4а.). Симптомите на кореновото гниене по надземните части се проявяват като жълтееща листна маса, увяхване и преждевременно загиване на засегнатите растения (Фиг. 4б). По корените на пипера *C. coccodes* е откриван самостоятелно или в комплекс с други коренови патогени като *V. dahliae*, *R. solani*, *F. solani* и *M. phaseolina*. През вегетацията първите успешни изолации на *C. coccodes* от корени и плодове са осъществени най-рано в началото на август.



Фиг. 4. Симптоми на кореново гниене по пипера причинено от *Colletotrichum coccodes*: **а.** По подземната част; **б.** По надземната част

При домата антракнозата се проявява само по зрели плодове. Ранните симптоми се състоят в появата на малки, леко вдлъбнати, воднисти, кръгли петна (Фиг. 5а). С развитието на болестта те се разширяват, стават по-вдлъбнати, централната им част потъмнява и там се появяват микросклероции (Фиг. 5б). С разпространението на гъбата в плода настъпва меко гниене. Антракнозните петна се сливат и образуват големи гниещи зони. Често в тези петна проникват вторични патогени и плодът изгнива напълно. На полето при силно нападение на листната маса от *Septoria lycopersici* плодовете остават открити и лесно се заразяват с *C. coccodes* (Фиг. 5в). Гъбата може да проникне и в зелени плодове, но остава в латентно състояние, докато те започнат да узряват. Върху зрелите плодове петната стават видими 5 – 6 дни след заразяването. Затова болестта е важна, както на полето, така и след прибирането на продукцията, съкращавайки до голяма степен периода на съхранението ѝ.



Фиг. 5. Антракноза по плодовете на доमत, причинена от естествено заразяване с *Colletotrichum coccodes*: **а.** Ранни симптоми; **б.** Микросклероции в централната част на петното; **в.** По плодове на домати растения, обезлистени от силно нападение на гъбния патоген *Septoria lycopersici* при полски условия

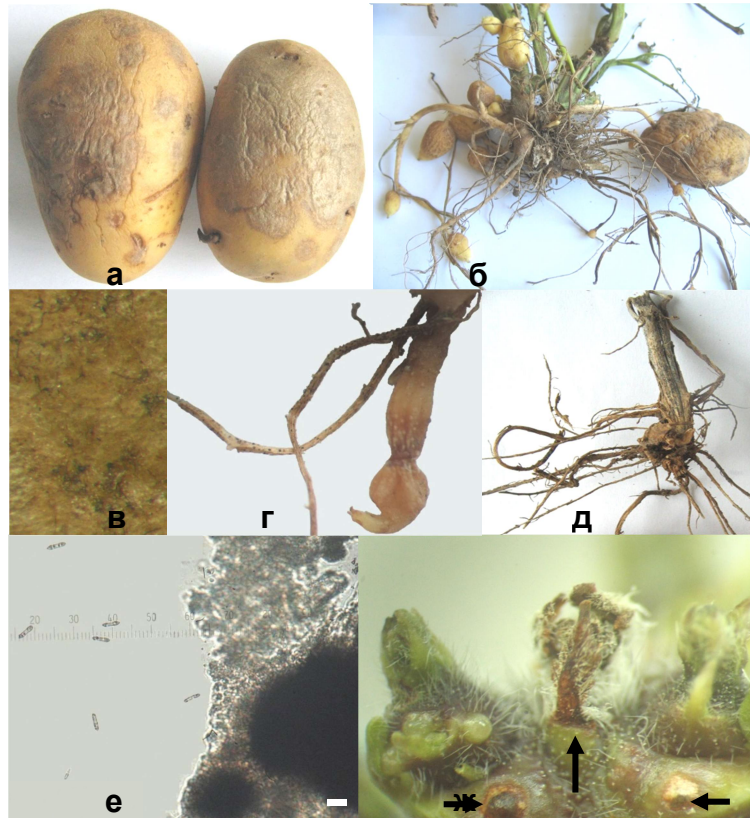
През вегетацията първите инфекции по корените на домати са наблюдавани по време на цъфтежа и степента на нападение нараства с образуването и зреенето на плодовете. Симптомите по подземните части се проявяват като кафяви петна, които се разрастват в големи кафяви лезии. Кората на корените се напуква и разкъсва. Засегнатите сектори се покриват с голям брой дребни тъмни микросклероции. Симптомите са особено ясно изразени върху по-стари корени, където тъканите стават сиви до кафяви на цвят.

Петната по плодовете на патладжана варират по размер. Тъканта под тях е вдлъбната. При влажно време върху петната се образува спорово желе, а по-късно – микросклероции. Когато върху един плод се образуват повече петна, те могат да се слеят и да покрият голяма част от повърхността му (Фиг. 6а). Силно нападнатите плодове изсъхват и почерняват, откъсват се от плодната дръжка и падат на земята. Нападат се предимно зазряващи плодове или тези по отслабени растения (Фиг. 6б). Често в тях проникват гнилостни бактерии, които причиняват мокро гниене.



Фиг. 6. Естествено нападение от *Colletotrichum coccodes* по плодове на патладжан: **а.** Първи симптоми; **б.** Развитие на болестта

Инфекцията по клубените на картофа се проявява като кафяви до сиви кръгли петна, които се сливат и промяната на цвета обхваща голяма част от повърхността им (Фиг. 7а). Наблюдавана е също некроза на основата на стъблото. Един от признаците за инфекция е, че столоните остават трайно свързани с клубените. Типичните симптоми по корените са потиснат растеж, големи кафяви до сиви петна и люцение на кората (Фиг. 7б). Върху заразените тъкани на клубените, столоните, корените и особено на стъблото се образува огромен брой дребни черни телца – микросклероциите на гъбата (Фиг. 7в,г,д). Установени са също асервули със сети, отделящи конидии (Фиг. 7е). Болестта причинява повреди по вегетативните пъпки и кълновете на клубените при съхраняване и на полето след засаждане. Засегнатите тъкани променят цвета си. Заразените пъпки и кълнове не могат да се развият, което води до слабо поникване (Фиг. 7ж). Надземните симптоми са много сходни с причинените от други патогени като фузариено и вертицилийно увяхване. Засегнатите от *C. coccodes* растения увяхват, листната маса пожълтява и може да настъпи преждевременното им загиване.



Фиг. 11. Симптоми, причинени от *Colletotrichum coccodes* по картоф: **а.** Напетняване по клубените; **б.** Базично гниене; **в, г, д.** Склероции върху заразените тъкани на клубените, корените и стъблото; **е.** Микросклероции и асервули с конидии по корените; **ж.** Повреди по пъпките на клубените (лява и дясна стрелка) и кълновете (централната стрелка); Скала = 20 μm

3.1.2. Други видове *Colletotrichum*, причинители на антракноза по плодовете на пипер и домати

В хода на изследванията е установено, че болестта антракноза по плодовете на пипер и домати може да бъде причинена от няколко вида *Colletotrichum*. Идентифицирани са видове от комплексите *acutatum* (*C. acutatum sensu lato*) и *gloeosporioides* (*C. gloeosporioides sensu lato*).

Симптоми на антракноза по пипера, причинени от *C. acutatum sensu lato*, са наблюдавани по зрели (червени, жълти или оранжеви) или незрели (зелени) плодове. Първоначално започват като воднисти петна, които омекват и леко се вдлъбват. Броят им постепенно нараства, те се сливат и бързо покриват по-голямата част от повърхността на плодовете (Фиг. 12а). Напълно развитите петна обикновено са кръгли или леко удължени, вдлъбнати, жълтокафяви до кафяви на цвят. Спороношение се

появява бързо и е много обилно. Повърхността на петната се покрива с розово-оранжева, влажна, желеподобна маса от многобройни конидии, отделящи се от гъбните плодни тела (асервули) (Фиг. 12б). Семената на болните плодове също са носители на инфекцията (Фиг. 12в).



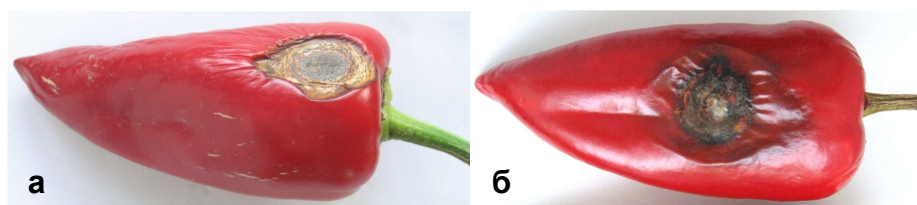
Фиг. 12. *Colletotrichum acutatum sensu lato* – причинител на антракноза по плодовете на пипер: **а.** Симптоми; **б.** Асервули с конидии; **в.** Семенна инфекция

По нападнатите от *C. acutatum sensu lato* плодове на домати се образуват кръгли, вдлъбнати петна (Фиг. 13а), които бързо се покриват със заоблени асервули, обилно произвеждащи конидии (Фиг. 13б). По асервулите не са забелязани сети.



Фиг. 13. *Colletotrichum acutatum sensu lato* – причинител на антракноза по плодовете на домати: **а.** Симптоми; **б.** Асервули с конидии

Симптомите на антракноза по пипера, причинени от *C. gloeosporioides sensu lato*, се проявяват под формата на сравнително сухи, кожести петна, нарастващи по-бързо на дължина, отколкото на ширина, затова по форма те са овални до удължени. Върху тях в концентрични кръгове са подредени тъмни на цвят асервули. На границата между здравата и болната тъкан се образува ясно изразен некротичен пръстен от загинали клетки. Засегнатата част е силно вдлъбната и започва бързо да некротира, вследствие на което прилежащата здрава е леко набръчкана (Фиг. 14а).

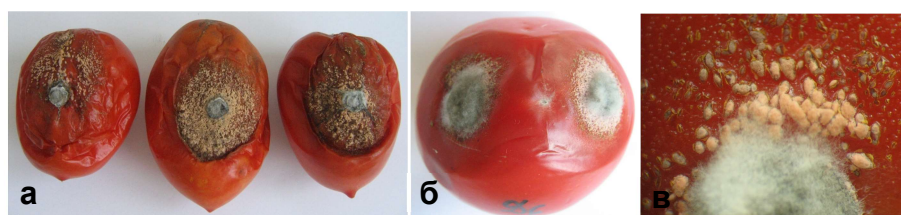


Фиг. 14. Симптоми по плод на пипер, причинени от *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato*: **а.** Естествено заразяване; **б.** Изкуствено заразяване

При влажни условия от тях се отделя розово-оранжева маса, съдържаща конидии. При изкуствено заразяване се образуват бързо разрастващи се овални петна, при което болната тъкан почернява, набръчква се и на места се разкъсва (Фиг. 14б). От центъра към периферията се появяват гъсто разположени дребни асервули, подредени в

концентрични кръгове. Те се намират под кутикулата, която се разпуква от растежа на конидиофорите и се появява розово-оранжева слизеста маса с конидиите на гъбата.

При домата нападението води до появата на кръгли, бързо разрастващи се петна. При консервните сортове, които са с по-високо съдържание на сухо вещество, гнието е полусухо. Повърхността на плодовете силно се набръчква, те започват да се мумифицират и се образуват голям брой асервули с обилно спороношение (Фиг. 15а). При едроплодните салатни сортове петната са по-воднисти. Около инокулационната точка се развива сив памуковиден мицел и спороношение (Фиг. 15б,в).



Фиг. 15. Симптоми по плодове на домати след изкуствено заразяване с *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato*: **а.** Консервни сортове; **б.** Салатни сортове; **в.** Споронение

3.1.3. *Colletotrichum truncatum* – причинител на антракноза по плодовете на пипер

Симптоми, причинени от *C. truncatum*, са наблюдавани за пръв път през есента на 2014 г. по червени плодове на пипер, тип капия, закупени от търговската мрежа внос от Северна Македония. Изразяват се в развитието на множество дребни, вдлъбнати, елиптически до кръгли петна, които се разширяват и сливат. В петната се образуват черни асервули. Те са подредени в концентрични кръгове с най-голяма плътност в центъра и се разпространяват радиално към периферията (Фиг. 16а). Върху тях се наблюдава белезникавосиво засъхнало конидиално желе (Фиг. 16б). Асервулите са покрити с голям брой тъмнокафяви, заострени към върха сети с дължина от 80 до 130 μm (Фиг. 16в).



Фиг. 16. *Colletotrichum truncatum* – причинител на антракноза по плодовете на пипер: **а.** Симптоми; **б.** Антракнозно петно с асервули и спорово желе; **в.** Асервули със сети

3.2. Изолиране на патогените и фенотипна характеристика на избрани изолати

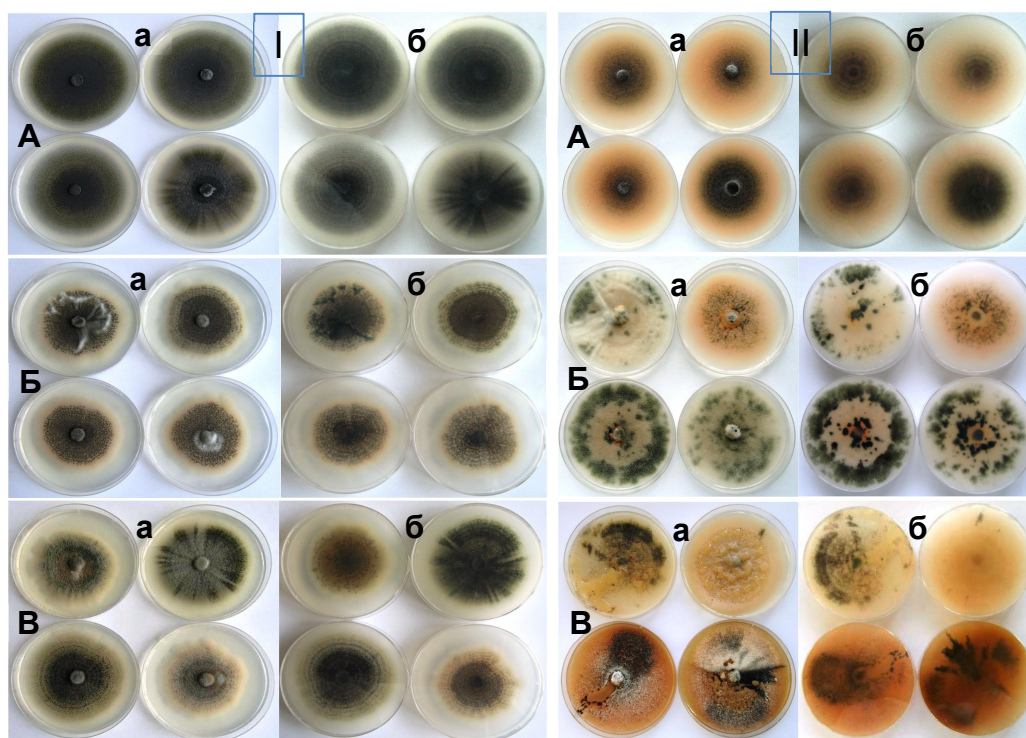
Симптомите на антракнозата, причинени от *Colletotrichum* spp. по плодовете на пипер и домати, са сходни и за идентифициране на видовете са необходими изолации и

по-нататъшно фенотипно и генотипно характеризиране. Изолати от различни видове *Colletotrichum* са получени по индиректен метод чрез култивиране на късчета от нападнатата тъкан или директно от изобилното конидиално спороношение в асервулите. Избрани моноконидиални изолати са включени в експерименти за тяхното фенотипиране.

3.2.1. Фенотипна характеристика на изолати *Colletotrichum coccodes* от пипер

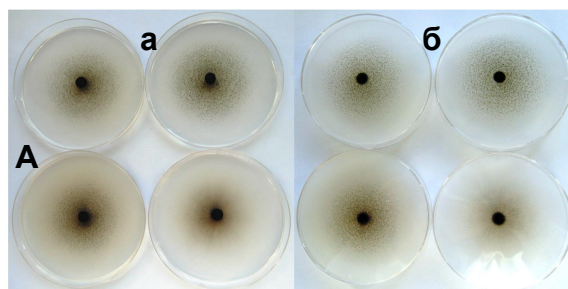
Върху КДА (Фиг. 17 I) колонииите от група А (от корени с произход България) са тъмносиви с бледорозова периферия, а от долната страна – тъмносиви. Мицелът е оскъден. Образуват се голям брой дребни сетозни микросклероции, подредени в концентрични кръгове, по-тъмни в центъра на колониите. При изолата К18-1 се наблюдават добре изразени радиални ивици. Растежът на колониите от група Б (от плодове с произход България) върху КДА е по-бавен. Колониите са тъмносиви с розова периферия и добре изразени концентрични зони. Повърхността им е покрита от сив пълзящ мицел с неправилно разпределени туфи от сив до бял памуковиден мицел (изолати В12-33 и В12-47). Колониите от група В (от плодове с произход Северна Македония) имат сходен темп на растеж с тези от група Б. Изолатите варират по морфология. Изолат МК7-1 образува зеленикаво-сиви, плътни колонии със слабо изразени концентрични и радиални зони и бледорозова неправилна периферия; обратната страна е светлокафява с разпръснати агрегати от микросклероции. При изолат МК7-2 се наблюдават добре забележими концентрични и радиални ивици, както при изолат К18-1. Голямата централна част е покрита от сив гладък мицел; обратната страна е тъмносива. Изолат МК26-2 е подобен на изолатите от група Б.

Върху SSPA (Фиг. 17 II) изолатите от всяка група се характеризират с различен фенотип. Колониите от група А имат тъмна зеленикаво-сива централна част с микросклероции в концентрични кръгове, следвани от обширна розова активно спорулираща зона; обратната страна е същата. Колониите от група Б са с по-плътна текстура и се наблюдават разпръснати сектори от по-светъл или по-тъмен сив мицел. Сред мицела главно в центъра на колониите се забелязват големи розови капки, съдържащи конидии. Колониите от група В образуват оскъден мицел и малко количество микросклероции, разположени в по-тъмни сектори с неправилна форма. Те произвеждат изключително голямо количество конидии, които се появяват като кремаво желе на огромни капки или изливащо се върху повърхността на колониите, придавайки странна морфология на колонията, подобна на замърсена с бактерии.



Фиг. 17. Морфология на колониите на изолати от *Colletotrichum coccodes* от група А, Б и В след 14-дневно култивиране върху 2 хранителни среди: **I.** КДА; **II.** SSPA; **а.** От горната страна; **б.** От долната страна

Върху ВА всички колонии са с по-малка плътност и много сходна морфология. Те са прозрачни и се състоят главно от микросклероции, разпръснати дълбоко в средата. Наличие на конидии не е установено. На Фиг. 18 са представени колониите на изолатите от група А. Изолатите от група Б и В са фенотипно неразличими от тях, затова не са показани на фигурата.



Фиг. 18. Морфология на колониите на изолати от *Colletotrichum coccodes* от група А върху ВА след 14-дневно култивиране: **а.** От горната страна; **б.** От долната страна

След 7-дневно култивиране всички изследвани изолати на гъбата показват най-добър растеж върху SSPA и КДА (Табл. 2). Най-слаб е растежът върху ВА. Колониите на изолати В8-2 и В12-9 от група А имат най-голям среден диаметър.

Тази тенденция се запазва и след 14-дневно култивиране. Всички изолати растат много бързо върху SSPA, заемайки цялата повърхност на петриевите блюда. Най-голям среден диаметър на колониите е отчетен при изолатите от група А.

Таблица 2. Среден диаметър на колониите (mm) на изолати *Colletotrichum coccodes* от пипер след 7-дневно култивиране върху три хранителни среди (КДА, SSPA и ВА)

Изолат Фактор А	Група	Хранителна среда – Фактор В			Средно за изолат
		КДА	SSPA	ВА	
B8-2	А	50,0±0,7	54,0±0,4	31,6±1,9	45,2
B12-9		49,6±0,6	54,6±0,8	33,4±1,2	45,9
B12-13		48,0±0,6	52,8±0,4	29,2±0,5	43,3
K18-1		49,8±0,2	51,0±0,4	31,0±1,1	43,9
B12-33	Б	36,2±2,0	58,4±2,8	28,2±1,0	40,9
B12-45		38,6±1,4	52,4±0,3	32,4±0,4	41,1
B12-46		37,4±1,8	60,8±1,0	28,8±0,5	42,3
B12-47		36,4±2,4	53,2±1,2	34,6±0,4	41,4
MK7-1	В	35,0±1,1	48,6±1,0	31,2±1,4	38,3
MK7-2		47,4±0,8	54,4±1,2	29,4±0,7	43,7
MK26-1		45,6±2,2	54,4±0,7	32,0±1,4	44,0
MK26-2		35,2±0,5	50,2±0,7	30,2±0,9	38,5
Средно за среда		42,4	53,7	31,0	
LSD		А	В	А x В	
0,05		1,7	0,9	3,0	
0,01		2,3	1,2	3,9	
0,001		2,9	1,5	5,0	

Върху КДА всички изолати от групи Б и В образуват хиалинни, прави, едноклетъчни, цилиндрични до вретеновидни конидии със среден размер 15,0 x 4,7 µm (Табл. 3). Те се появяват като желеобразна маса главно в периферията на колониите, където гъбата е активно растяща. При изолатите от група А конидии не са измерени в края на експеримента, тъй като колониите растат бързо. След 14 дни те почти изпълват петриевите блюда и се образуват микросклероции, но липсва спороносяща периферна зона. Върху SSPA изолатите произвеждат голямо количество конидии, които се натрупват в едри капки като кремаво желе (групи Б и В). Средният размер на конидиите е 13,3 x 4,7 µm (Табл. 4). Върху ВА конидии не са установени.

Всички изолати образуват микросклероции върху трите хранителни среди (Табл. 5). Това са малки тъмни сферични телца, покрити със сети, които се появяват в центъра колониите и се разпространяват в агаровата пластина. Хранителната среда влияе върху размера им. Върху КДА те са агрегирани и с по-голям размер. Върху SSPA имат среден размер при всички изолати с изключение на K18-1 и MK7-1. Колонии върху ВА се състоят от многобройни дребни микросклероции, потопени в агаровата пластина. Изолатите от група А имат най-малки микросклероции, а от група Б – най-големи.

Таблица 3. Размери на конидиите на *Colletotrichum coccodes* (μm) върху КДА

Изолат	Група	Дължина	Ширина
В8-2		-	-
В12-9	А	-	-
В12-13		-	-
К18-1		-	-
В12-33		(11,0-) 14,9\pm0,6 (-19,2)	(4,2-) 4,8\pm0,1 (-6,1)
В12-45	Б	(11,9-) 17,5\pm0,5 (-23,0)	(3,2-) 4,8\pm0,1 (-6,6)
В12-46		(10,3-) 12,0\pm0,3 (-14,3)	(4,0-) 4,6\pm0,1 (-5,3)
В12-47		(11,2-) 14,0\pm0,4 (-18,6)	(3,8-) 4,9\pm0,2 (-6,2)
МК7-1		(9,4-) 15,8\pm1,0 (-25,7)	(3,4-) 4,2\pm0,1 (-5,0)
МК7-2	В	(8,0-) 13,7\pm0,5 (-21,2)	(3,4-) 4,7\pm0,1 (-5,9)
МК26-1		(15,0-) 16,8\pm1,1 (-18,8)	(4,0-) 4,9\pm0,4 (-6,1)
МК26-2		(10,8) 15,0\pm0,6 (-19,2)	(3,6-) 4,7\pm0,2 (-5,8)
Средно		15,0	4,7

Таблица 4. Размери на конидиите на *Colletotrichum coccodes* (μm) върху SSPA

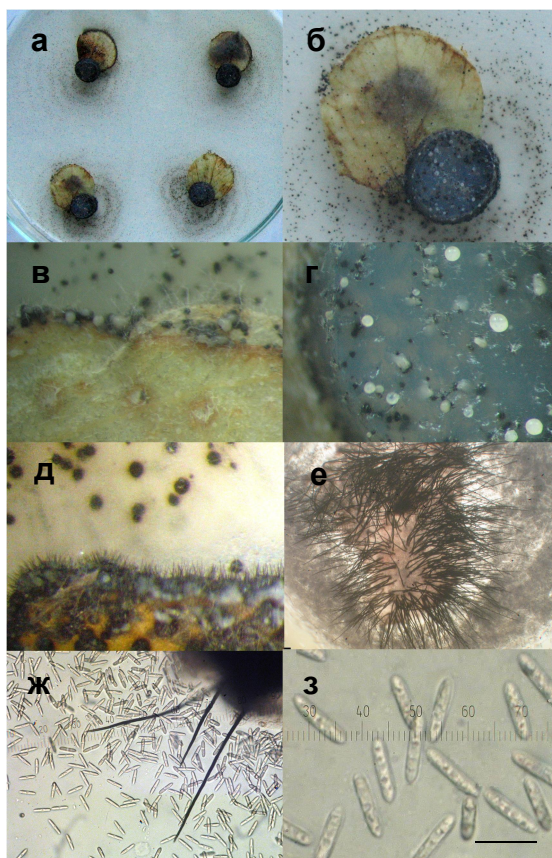
Изолат	Група	Дължина	Ширина
В8-2		(9,0-) 14,8\pm0,3 (-19,8)	(4,0-) 5,1\pm0,1 (-6,4)
В12-9	А	(10,7-) 15,0\pm0,7 (-16,6)	(4,5-) 5,4\pm0,1 (-5,9)
В12-13		(11,8-) 14,7\pm0,6 (-22,2)	(4,6-) 5,6\pm0,1 (-7,4)
К18-1		(9,1-) 13,9\pm0,4 (-25,9)	(3,6-) 4,9\pm0,1 (-6,1)
В12-33		(8,5-) 11,3\pm0,4 (-20,7)	(3,6-) 4,5\pm0,1 (-5,4)
В12-45	Б	(10,6-) 13,7\pm0,4 (-16,3)	(3,5-) 4,4\pm0,1 (-5,4)
В12-46		(8,3-) 14,6\pm0,3 (-22,0)	(3,7-) 4,9\pm0,1 (-6,1)
В12-47		(7,6-) 11,6\pm0,2 (-18,6)	(3,2-) 4,4\pm0,1 (-6,3)
МК7-1		(7,2-) 12,7\pm0,4 (-24,8)	(3,3-) 4,5\pm0,1 (-6,0)
МК7-2	В	(8,8-) 12,9\pm0,5 (-19,2)	(2,9-) 4,3\pm0,1 (-5,4)
МК26-1		(8,4-) 12,0\pm0,3 (-16,5)	(2,9-) 4,2\pm0,1 (-5,5)
МК26-2		(9,5-) 12,4\pm0,3 (-20,0)	(3,2-) 4,3\pm0,1 (-6,0)
Средно		13,3	4,7

Таблица 5. Размери на микросклероциите на *Colletotrichum coccodes* (μm) върху три хранителни среди (КДА, SSPA и ВА)

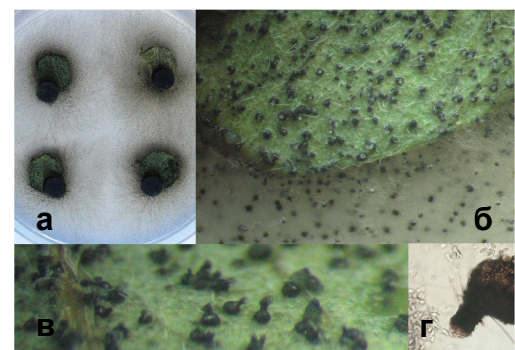
Изолат	КДА	SSPA	ВА	Средно за изолат
В8-2	(128-) 175\pm4 (-237)	(72-) 107\pm2 (-139)	(35-) 58\pm2 (-85)	113
В12-9	(63-) 100\pm2 (-134)	(58-) 95\pm3 (-154)	(44-) 67\pm3 (-96)	87
В12-13	(64-) 96\pm2 (-145)	(63-) 92\pm3 (-140)	(43-) 72\pm3 (-100)	87
К18-1	(38-) 58\pm2 (-100)	(44-) 84\pm5 (-131)	(13-) 21\pm2 (-39)	54
В12-33	(248-) 307\pm8 (-412)	(58-) 105\pm6 (-173)	(48-) 79\pm4 (-117)	164
В12-45	(134-) 223\pm10 (-296)	(113-) 148\pm6 (-197)	(57-) 98\pm5 (-133)	156
В12-46	(102-) 137\pm4 (-174)	(73-) 108\pm4 (-176)	(55-) 84\pm3 (-120)	110
В12-47	(114-) 150\pm5 (-205)	(83-) 114\pm6 (-161)	(49-) 92\pm7 (-125)	119
МК7-1	(153-) 215\pm11 (-309)	(46-) 66\pm4 (-113)	(45-) 73\pm5 (-129)	118
МК7-2	(113-) 159\pm7 (-239)	(40-) 65\pm4 (-107)	(35-) 50\pm3 (-70)	91
МК26-1	(218-) 283\pm10 (-393)	(67-) 102\pm4 (-174)	(38-) 74\pm4 (-123)	153
МК26-2	(164-) 192\pm8 (-272)	(58-) 73\pm1 (-110)	(64-) 94\pm4 (-138)	120
Средно за среда	175	97	72	

3.2.2. Разграничаване на изолати *Colletotrichum coccodes* и *Macrophomina phaseolina* от корени

За разграничаване на изолатите на *C. coccodes*, получени от корени, от тези на *M. phaseolina*, допълнително е приложена техниката на Ostazeski. Поставянето на дискове от люцернови листа върху воден агар стимулира образуването на голямо количество сетозни асервули от *C. coccodes*, които отделят желеобразна маса от хиалинни, едноклетъчни, прави, вретеновидни конидии (Фиг. 19а-з). Същата техника, приложена към изолатите на *M. phaseolina*, води до образуването на микросклероции и голям брой пикнидии, отделящи едноклетъчни конидии (Фиг. 20а-г).



Фиг. 19. Спороношение на *Colletotrichum coccodes* върху листни дискове от люцерна: **а.** Опитна постановка върху 2% воден агар; **б.** Асервули и микросклероции около и върху листния диск; **в.** Периферията на листен диск с асервули и конидийна маса; **г.** Обратната страна на агарово блокче с капки конидийно желе; **д.** Голям брой асервули и сети върху листен диск; **е.** Асервул с голям брой тъмноцветени сети; **ж.** Асервул, сети и конидии, х 160; **з.** Конидии, х 400, скала = 20 µm



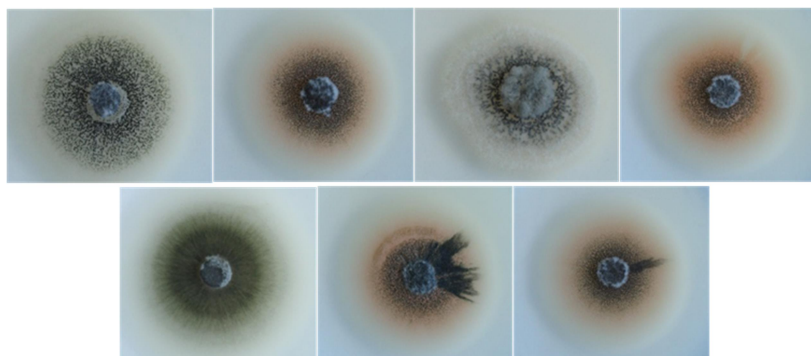
Фиг. 20. Спороношение на *Macrophomina phaseolina* върху листни дискове от люцерна: **а.** Опитна постановка върху 2% воден агар; **б.** Микросклероции и пикнидии, отделящи спорово желе, около и върху листния диск; **в.** Пикнидии с къси шийки и остиоли; **г.** Пикнидия, отделяща конидии

3.2.3. Фенотипна характеристика на изолати *Colletotrichum coccodes* от картоф

Средният диаметър на колонииите на изследваните изолати върху КДА и МВА е почти еднакъв след 7-дневно култивиране (Табл. 6). Най-добър растеж върху всички хранителни среди показва СсСBS. P13-2 расте по-бавно от другите изолати върху КДА и SSPA. Морфологията на колонииите на P13-1 и P13-2-3 е сходна с тази на изолатите от пипер K18-1 и B12-13 върху КДА след 7-дневно култивиране (Фиг. 21). Колонииите са тъмносиви с розова периферия; от долната страна със сивкава централна част и охрена до розова периферия. Мицелът е оскъден. Голям брой микросклероции се подреждат в концентрични кръгове, по-тъмни в центъра на колонията. По-силно или по-слабо изразени радиални ивици с по-голяма плътност на склероциите са забелязани в колонииите на P13-2-3, K18-1 и B12-13. Растежът на P5-4 и особено на P13-2 е по-бавен върху КДА, отчетен на 7-я ден. Колонииите са тъмни с бледорозова периферия; обратната страна е сива. Микросклероциите са с по-големи размери и са агрегирани. Колонииите на СсСBS се състоят от фин тъмносив мицел, растящ бързо в радиални ивици, но също така могат да бъдат забелязани няколко концентрични кръга с различна плътност на дребни микросклероции.

На 14-я ден повечето от изолатите почти са изпълнили петриевите блюда с изключение на P13-2 върху КДА и SSPA и P13-1 и P13-2-3 върху MDA. Изолатите имат сходна морфология върху КДА. Колонииите са тъмнозеленикаво-сиви от горната и от долната страна, с по-силно или по-слабо изразени концентрични и/или радиални зони. Малко по-различен фенотип е наблюдаван за колонииите на P13-2, които са по-светли на цвят. Концентричните кръгове започват от центъра на колонията и съдържат относително повече и по-агрегирани склероции, между които цветът е розов. Периферията е с неправилни контури, белезникава до бледорозова. Повече различия между изолатите са установени върху SSPA след 14-дневно култивиране. Колонииите на P13-1, P13-2-3, K18-1 и B12-13 са по-тъмни, всички са с концентрични кръгове и радиални ивици, най-добре изразени при P13-2-3. Колонииите на P5-4 се състоят от по-тъмен център, съдържащ разпръснати микросклероции, следван от зона с обилно спороношение и светла периферия. Колонииите на P13-2 имат сходна морфология с P5-4, но показват по-бавен и неправилен радиален растеж. СсСBS образува по-малко микросклероции и по-оскъден мицел, разположен главно в центъра на колонииите, но произвежда голямо количество конидии. Колонииите са кремави с радиални и концентрични набраздявания. Колонииите на всички изолати имат сходна морфология

върху МВА и се състоят от много оскъден мицел и много микросклероции. Най-голямо количество микросклероции в концентрични кръгове образува P5-4.



Фиг. 21. Морфологични особености на изолати *Colletotrichum coccodes* след 7-дневно култивиране върху КДА: горе от ляво на дясно P5-4, P13-1, P13-2, P13-2-3; долу от ляво на дясно CcCBS, K18-1, B12-13

Таблица 6. Среден диаметър на колониите (mm) на изолати *Colletotrichum coccodes* от картоф върху три хранителни среди (КДА, SSPA и МВА) след 7-дневно култивиране

Изолат Фактор А	Хранителна среда – Фактор В			Средно за изолат
	КДА	SSPA	МВА	
P5-4	49,0 ± 0,7	44,4 ± 1,4	53,6 ± 0,3	49,0
P13-1	54,8 ± 0,4	32,8 ± 0,4	50,4 ± 0,6	46,0
P13-2	34,0 ± 1,0	15,2 ± 1,9	50,0 ± 0,4	33,1
P13-2-3	55,4 ± 0,4	33,0 ± 0,5	51,8 ± 0,4	46,7
CcCBS	65,4 ± 0,4	56,6 ± 0,4	57,4 ± 0,3	59,8
K18-1	55,4 ± 0,7	32,8 ± 0,6	51,8 ± 0,7	46,7
B12-13	55,6 ± 0,4	34,0 ± 0,3	52,4 ± 0,4	47,3
Средно за среда	52,8	35,5	52,5	
LSD	A	B	A x B	
0,05	1,1	0,7	1,9	
0,01	1,5	1,0	2,5	
0,001	1,9	1,2	3,2	

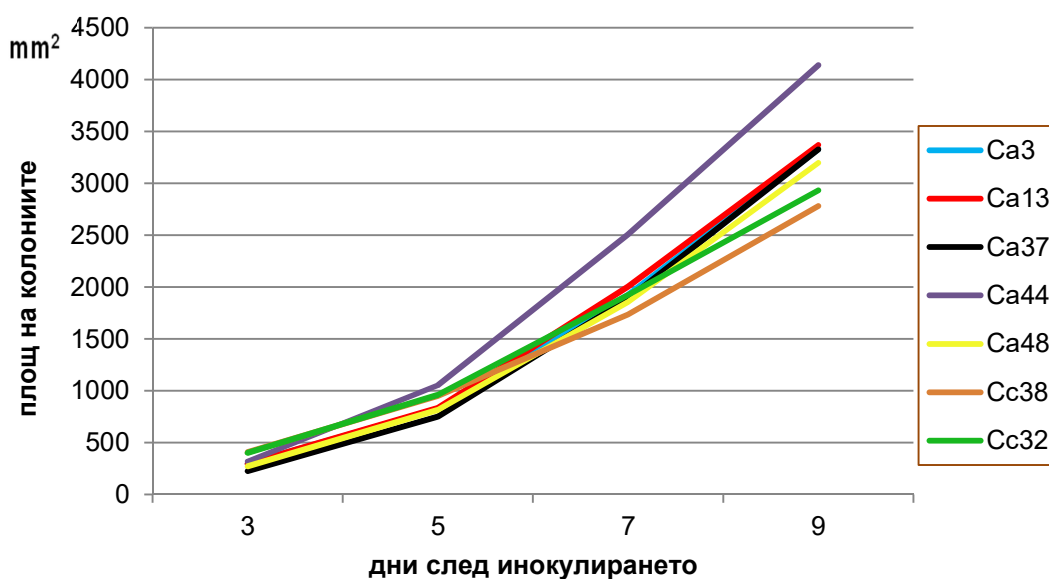
Всички изолати образуват хиалинни, прави, едноклетъчни конидии със среден размер върху КДА 19,5 x 4,7 μm. Те се появяват като желеобразна маса в периферия на колониите, където гъбата расте активно и цветът е розов (P13-1, P13-2-3, K18-1 и B12-13) или бледорозов (P5-4 и P13-2). Конидиите на всички изолати са цилиндрични със съотношение дължина : ширина повече от 4, а само тези на P13-2 са вретеновидни, по-къси и по-широки със съотношение дължина : ширина по-малко от 3. Изолатите спороносят изключително добре върху SSPA, образувайки вретеновидни или цилиндрични конидии, които са къси и широки със среден размер 13,2 x 4,6 μm и

съотношение дължина : ширина по-малко от 3 дори по-малко от 2. Върху МВА е намерено малко количество конидии със среден размер 21,8 x 4,3 μm , разпръснати между микросклероциите. Ширината на конидиите е най-стабилният признак.

Микросклероции са образувани от всички изолати върху използваните хранителни среди. Появяват се най-напред в центъра на колонииите и се разпространяват към периферията.

3.2.4. Фенотипна характеристика на изолати от *Colletotrichum coccodes* и *C. acutatum sensu lato*

В периода от 2006 до 2009 г. от плодове на пипер и домати са изолирани два вида от род *Colletotrichum*. По тази причина е проведено сравнително морфологично изследване на 7 избрани изолати от тези видове: *C. coccodes* (Cc38₂ и Cc32₃) и *C. acutatum* (Ca3₃, Ca13₁, Ca37₂, Ca44₁ и Ca48₂). Данните за растежа на колонииите на изолатите след 3-, 5-, 7- и 9-дневно култивиране върху КДА са обобщени чрез изчисляване на средния диаметър и средната грешка (Табл. 7). Различията са оценени, използвайки анализ на варианса и най-малката доказана разлика. През първите три дни темповете на растеж са сходни, като *C. coccodes* показва по-бърз растеж. След петия ден и до края на отчитането колонииите на изолат Ca44₁ са с най-голям диаметър. След 9-дневно култивиране най-малък среден диаметър имат изолатите на *C. coccodes*. Площта на колонииите на изолат Ca44₁ нараства бързо след петия ден (Фиг. 22). Колонииите на всички изследвани изолати изпълват петриевите блюда след 14 дни.



Фиг. 22. Динамика на растежа на изследваните изолати, изразена като площ на колонииите (mm^2) след 3-, 5-, 7- и 9-дневно култивиране върху КДА

Таблица 7. Среден диаметър на колонии (mm) на изследваните изолати от комплекса *acutatum* и вида *Colletotrichum coccodes* след 3, 5, 7 и 9 дни култивиране върху КДА

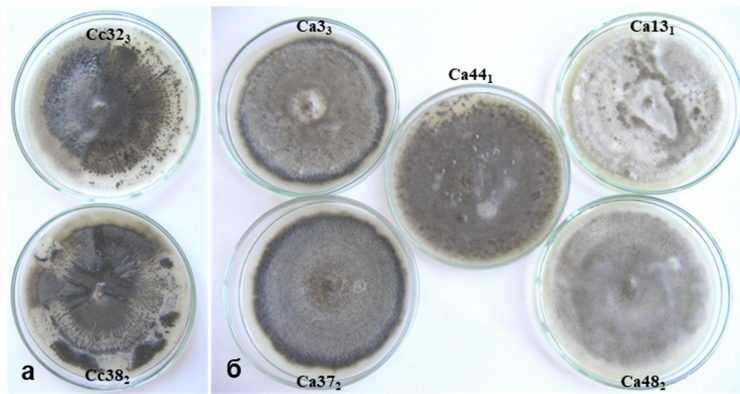
Изолат	3 дни	5 дни	7 дни	9 дни
Ca3 ₃	19,6±0,4	32,4±0,6	49,5±0,9	65,1±1,2
Ca13 ₁	19,5±0,7	32,6±0,7	50,5±0,7	65,5±0,9
Ca37 ₂	17,0±0,4	30,9±0,4	49,0±0,9	65,1±0,7
Ca44 ₁	20,2±0,3	36,6±0,4	56,5±0,7	72,6±1,0
Ca48 ₂	18,6±0,4	32,2±0,6	48,6±2,0	63,8±1,9
Cc38 ₂	22,8±0,6	34,8±1,3	47,0±1,9	59,5±2,9
Cc32 ₃	22,6±0,6	35,0±0,9	49,5±2,2	61,1±2,9
Доказаност				
LSD 0,5	1,4	1,9	4,1	4,7
LSD 0,01	1,9	2,5	5,0	6,3
LSD 0,001	2,4	3,3	6,6	8,2

При всички изследвани изолати се образуват апресории (Фиг. 23). Те представляват кафяви, дебелостенни подутини в края на хифи или растежни тръбички (прорастъци), които лесно се развиват в култура, т.е. и при отсъствие на гостоприемника.



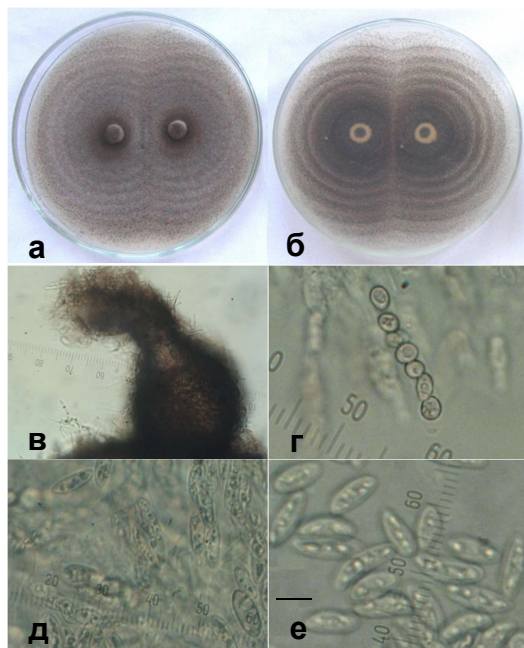
Фиг. 23. Апресории на изолат Ca44₁, отнасящ се към комплекса *acutatum*; скала = 10 μm

В първите дни от култивирането *C. coccodes* образува колонии с по-плътен и по-тъмен център, съдържащ микросклероции, а останалата част е розово-бяла и с по-малка плътност. В периферията, където колонията нараства активно, са наблюдавани асервули със сети и многобройни конидии. Сетите са тъмнооцветени, неразклонени, дебелостенни стерилни хифи, иглообразно заострени на върха, с размери от 80 до 350 μm. Изолатите на *C. acutatum* първоначално са бели, компактни, с обилен въздушен мицел, а от долната страна само централната част е тъмносиво-зелена. Микросклероции не се образуват. След петия ден са установени някои изменения. При *C. coccodes* централната част на колонии се разширява и там нараства количеството на микросклероциите, разположени в радиални лъчи, а в отделни сектори се появява оскъден сив мицел (Фиг. 24а). При изолатите, отнасящи се към комплекса *acutatum*, цветът на колонии от горната страна се променя до светлосиво или тъмносиво-зелен и се запазва такъв до края на експеримента. Четири от изолатите (Ca3₃, Ca13₁, Ca37₂ и Ca48₂) са получени от плодове на пипер и имат много сходни морфолого-културални признаци. Изолат Ca44₁ е получен от плод на домати. В колонии се забелязва добре изразена концентрична зоналност, която съвпада с образуването на перитеции, потопени в хранителната среда. В центъра на колонии се наблюдават уплътнения от памуковиден мицел (Фиг. 24б).



Фиг. 24. Морфология на колониите върху КДА на изолати от: **а.** *Colletotrichum coccodes* (Cc38₂ и Cc32₃); **б.** Комплекса *acutatum* (Ca3₃, Ca13₁, Ca37₂, Ca44₁ и Ca48₂)

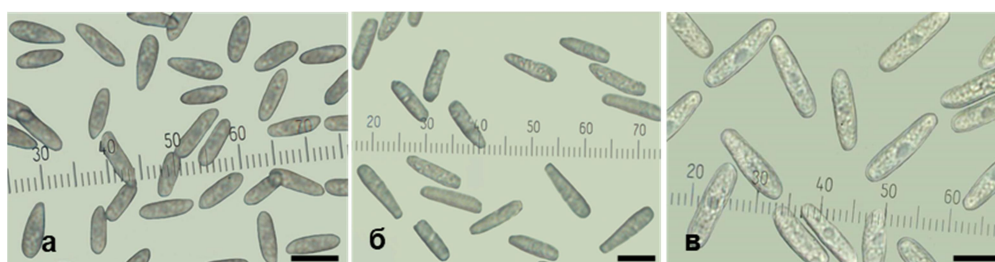
Изолат Ca44₁ при самостоятелно култивиране образува предимно стерилни перитеции, които могат погрешно да бъдат сметени за микросклероции. Фертилни структури на половия морф (перитеции, асци и аскоспори) са установени само при по-стари култури или при отглеждането им по двойки в комбинация със същия или с други изолати (Фиг. 25а,б). Перитециите са тъмнооцветени, закръглени или бутилковидни, с диаметър 100 – 250 μm и с добре развити клюновидни остии (Фиг. 25в). В перитециите са разположени тънкостенни цилиндрични аскуси, които съдържат 8 аскоспори (Фиг. 25г,д). Аскоспорите са едноклетъчни, хиалинни, вретеновидни, с размери (12,2-) 14,0 \pm 0,2 (-17,0) x (4,1-) 5,3 \pm 0,1 (-6,5) μm (Фиг. 25е).



Фиг. 25. Полов морф на изолат Ca44₁ от комплекса *acutatum*: **а.** Перитеции в култура, отгоре; **б.** Същата култура отдолу; **в.** Перитеций; **г.** Незрели аскоспори по време на деление; **д.** Аскуси с аскоспори; **е.** Свободни зрели аскоспори; скала = 10 μm

Конидиите на изследваните изолати са едноклетъчни, нецветени. При повечето изолати от комплекса *acutatum* (Ca3₃, Ca13₁, Ca37₂, и Ca48₂) те са вретеновидни до

елипсовидни със заострени краища или цилиндрични с един заострен край (Ca44₁), а при *C. coccodes* (Cc38₂ и Cc32₃) са цилиндрични със заоблени краища (Фиг. 26а,б,в). Размерът им варира при отделните изолати (Табл. 8). Изолатите на *C. acutatum* се отличават с най-малка средна дължина на конидиите (10,5 - 12,1 μm), а тези на *C. coccodes* – с най-голяма (16,31 - 18,68 μm). По дължина на конидиите изолатът Ca44₁ заема междинна позиция между останалите изолати от комплекса *acutatum* и тези на *C. coccodes*. Най-голямо вариране, определено чрез вариационния коефициент VC в проценти, е установено за изолатите на *C. coccodes*. Общата тенденция е по-голямо вариране на ширината на спорите в сравнение с тяхната дължина.



Фиг. 26. Конидии на три изолата: **а.** Ca3₃ от комплекс *acutatum*; **б.** Ca44₁ от комплекс *acutatum*; **в.** Cc38₂ от *Colletotrichum coccodes*; скала = 10μm

Таблица 8. Размери на конидиите (μm) на изолати от *Colletotrichum acutatum* и *C. coccodes* върху КДА

Изолат	дължина (μm)	VC (%)	ширина (μm)	VC (%)
Ca3 ₃	(9,2-) 12,1 ± 0,1 (-15,8)	8,71	(3,6-) 4,7 ± 0,1 (-5,9)	10,44
Ca13 ₁	(8,1-) 10,8 ± 0,1 (-13,4)	9,18	(3,3-) 4,2 ± 0,1 (-5,5)	9,57
Ca37 ₂	(7,2-) 10,5 ± 0,1 (-13,5)	11,59	(3,0-) 4,2 ± 0,1 (-5,3)	12,60
Ca44 ₁	(12,0-) 15,5 ± 0,2 (-21,5)	12,12	(3,5-) 4,5 ± 0,1 (-5,8)	11,19
Ca48 ₂	(8,3-) 10,9 ± 0,1 (-12,9)	9,23	(2,7-) 3,9 ± 0,1 (-4,9)	10,02
Cc38 ₂	(10,8-) 18,7 ± 0,4 (-27,5)	19,13	(3,8-) 5,8 ± 0,1 (-8,6)	16,52
Cc32 ₃	(11,3-) 16,3 ± 0,2 (-20,6)	14,39	(2,9-) 4,6 ± 0,1 (-6,8)	14,78
Средно	13,5		4,6	
Доказаност				
LSD 0,5	1,3		0,4	
LSD 0,01	1,7		0,5	
LSD 0,001	2,2		0,6	

3.2.5. Фенотипна характеристика на изолати от *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato*

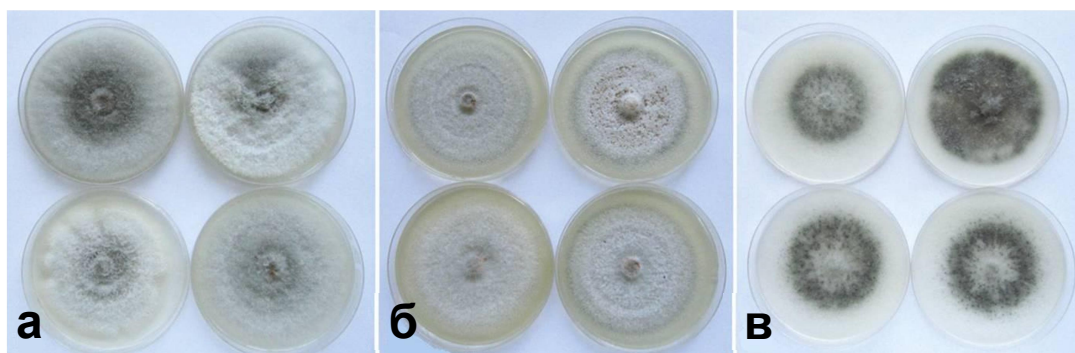
Изолати от комплекса *gloeosporioides* са получени за пръв път от естествено заразени плодове на пипер през 2010 г. в България, а през 2011 г. и в Сърбия. По плодове на домати болестта е забелязана през 2012 г. и през целия период е наблюдавана само у нас, затова изследваните изолати са само от български произход.

Най-добър растеж на изолатите е отчетен върху КДА (Табл. 9, Фиг. 27а). Образува се обилен сив мицел, по-тъмен в центъра на колонииите. Сред мицела се появява розово-оранжево конидийно желе. Долната страна на агаровата пластина е с розово-охрен цвят, осеяна с разпръснати черни плодни тела из нея. Най-обилно спороношение се наблюдава по ръба на отрезите, направени върху КДА при подготовката на инокулум. Върху МЕА колонииите са светлосиви с голям брой плодни тела, подредени в концентрични зони и лесно забележими капки от розово-оранжева конидийна маса (Фиг. 27б). Долната страна е охрена с розови нюанси. Колонииите върху ОА се състоят от прозрачна периферия и тъмна сивозелена централна част с голям брой потопени плодни тела, подредени в концентрични зони и отделящи спорово желе (Фиг. 27в).

В култура сети не са наблюдавани, но върху естествено и изкуствено заразени плодове се образуват асервули със сети.

Таблица 9. Среден диаметър на колонииите (mm) на изолати от комплекс *gloeosporioides* след 7-дневно култивиране КДА, МЕА и ОА

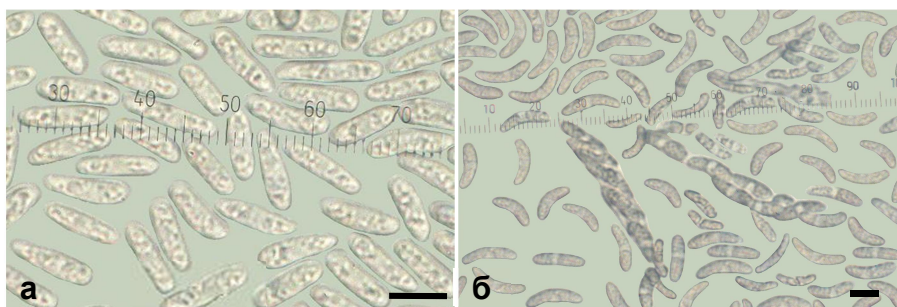
Изолат Фактор А	Хранителна среда – Фактор В			Средно за изолат
	КДА	МЕА	ОА	
B1	58,2±0,8	51,7±0,7	50,9±1,5	53,6
B29	45,0±0,7	41,2±2,0	45,6±0,6	43,9
S2	58,0±0,7	51,4±0,6	53,1±0,8	54,2
S3	60,9±0,7	53,6±0,6	56,9±1,1	57,1
Средно за среда	55,5	49,5	51,6	
LSD	A	B	A x B	
0,05	1,5	1,3	2,5	
0,01	2,0	1,7	3,4	
0,001	2,6	2,2	4,4	



Фиг. 27. Морфология на колонииите на изолати от комплекс *gloeosporioides* след 10-дневно култивиране върху три хранителни среди: **а.** КДА; **б.** МЕА и **в.** ОА; на горния ред два сръбски, а на долния – два български изолата, получени от пипер

При всички изолати конидииите са хиалинни, едноклетъчни, прави, цилиндрични, с две до седем маслени капки и размери (12,8-) 15,5±1,1 (-17,6) x (3,7-) 4,7±0,4 (-6,2) μm.

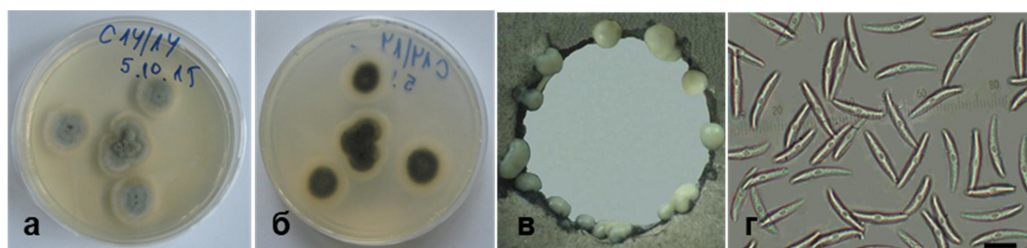
Някои от тях са заострени в единия край и заоблени – в другия, или заоблени и в двата края (Фиг. 28а). Установено е, че черните плодни тела, които се появяват в голямо количество в или между конидийната маса, представляват перитеции с тесни бухалковидни аскуси, достигащи следните размери (50,8-) 61,7±8,7 (-75,4) μm . Аскусите съдържат 8 аскоспори, които са хиалинни, едноклетъчни, леко извити или сърповидни, елипсоидни, слабостеснени към краищата, с размери (15,9-) 19,5±1,4 (-21,8) x (3,3-) 4,2±0,6 (-5,5) μm (Фиг. 28б).



Фиг. 28. Спороношение на изолати от комплекс *gloeosporioides*: **а.** Конидии; **б.** Аскоспори; скала **а** и **б** = 10 μm

3.2.6. Фенотипна характеристика на изолати от *Colletotrichum truncatum*

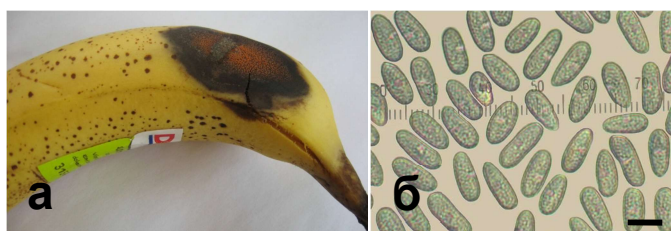
Колониите на изолатите от *C. truncatum* върху КДА отначало са бели, а с възрастта стават сиво-зеленикави с периферия от пухкав бял мицел; долната страна на агаровата пластина е с тъмносиво-зеленикав цвят (Фиг. 29а,б). Въздушният мицел е сиво-бял. Асервулите са тъмнокафяви до черни, добре забележими поради многобройните тъмни сети. Конидиите се отделят във вид на сферични, сиво-белезникави капки сред мицела. Най-обилно спороношение се наблюдава по ръба на отрезите, направени върху КДА при подготовката на инокулум (Фиг. 29в). Конидиите са едноклетъчни, хиалинни, вретеновидни, понякога извити, скосени към двата края, заострени на върха, с размери (17,7-) 19,6±2,4 (-22,8) x (2,9-) 3,6±0,3 (-4,1) μm (Фиг. 29г). Полов морф не е наблюдаван върху естествен субстрат или в култура.



Фиг. 29. *Colletotrichum truncatum*: Колонии на след 4-дневно культивиране върху КДА от горната и долната страна (**а, б**); Спорово желе (**в**); Конидии (**г**); скала = 10 μm

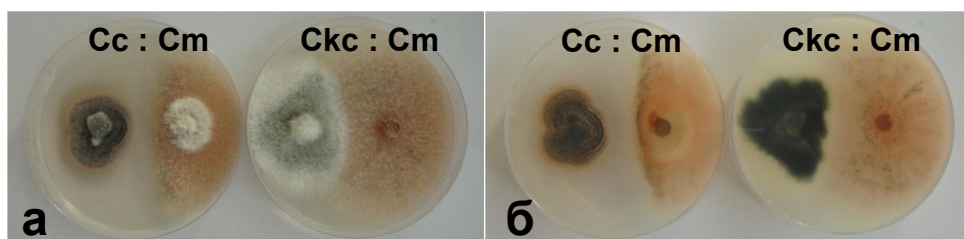
3.2.7. *Colletotrichum musae*

За сравнение с изолатите от пипер и домати от комплекса *gloeosporioides* в изследването са включени изолати от вида *C. musae*, принадлежащ към същия комплекс. Патогенът причинява антракноза по плодовете на банан (*Musa* sp.), една от най-важните болести при тази култура. Симптомите включват тъмнокафяви до черни, хлътнали петна с асервули и спорова маса в тях (Фиг. 30а). Конидиите на гъбата са едноклетъчни, хиалинни, цилиндрични, със заоблени краища и размери $(11,4-13,3 \pm 0,2)$ $(-16,1) \times (5,4-6,1 \pm 0,1)$ $(-7,1) \mu\text{m}$ (Фиг. 30б). Полов морф не е наблюдаван върху естествен субстрат или в култура.



Фиг. 30. *Colletotrichum musae* по плод на банан: **а.** Симптоми; **б.** Конидии; скала = 10 μm

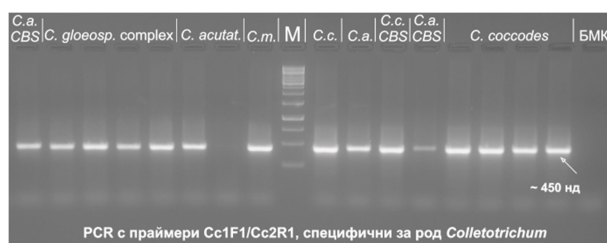
C. musae има добър растеж върху КДА. В двойни култури е изследвано вегетативното взаимодействие между изолати, отнасящи се към *C. musae* (Cm) (клон *musae* от комплекса *gloeosporioides*), и други видове *Colletotrichum*: *C. kahawae* subsp. *ciggaro* (Ckc) (клон *kahawae* от комплекса *gloeosporioides*) и *C. coccodes* (Cc) (самостоятелен вид) (Фиг. 31а,б). В двойката Cc : Cm е установена реакция на вегетативна несъвместимост със зона на подтискане около 4 mm, в която мицел въобще не се развива. В периферията на колонията на Cm към Cc растежът на мицела е прекратен и се образува некротична ивица с по-тъмен цвят, добре забележима от долната страна на колониите (Фиг. 31б). Това показва, че част от мицелните клетки на Cm са загинали под въздействието на метаболити, отделени от Cc и дифундирали в средата, тъй като двете гъби не са в пряк контакт. В двойката Ckc : Cm е установена вегетативна съвместимост. Колониите на двата изолата растат една към друга и се сливат без видима зона на взаимодействие (Фиг. 31а,б), което потвърждава генетичното родство между тях (изолати от *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato*).



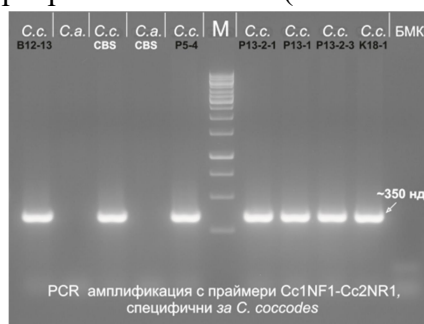
Фиг. 31. Вегетативно взаимодействие на изолати от *Colletotrichum musae* (Cm) с изолати от *C. coccodes* (Cc) и *C. kahawae* subsp. *ciggaro* (Ckc) в двойни култури: **а.** От горната страна; **б.** От долната страна

3.3. Генотипна характеристика на изолати от изследваните видове *Colletotrichum*

За молекулярната диагностика и характеризиране на изолатите от *C. coccodes* са използвани две двойки праймери, разработени от Cullen et al. С външните (родово-специфични – Cc1F1/Cc2R1) е амплифициран продукт с дължина ~ 450 нд (Фиг. 32), а с вътрешните (nested) праймери (видовоспецифични – Cc1NF1/Cc2NR1) – ~350 нд (Фиг. 33). Размерите на получените ампликони са близки до очакваните.

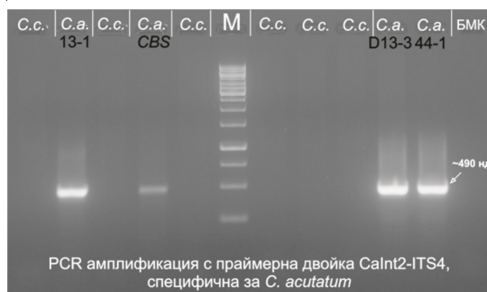


Фиг. 32. PCR продукт с дължина около 450 нд, получен при всички изследвани изолати от род *Colletotrichum*, в резултат от амплификация с външните (родово-специфични – Cc1F1/Cc2R1) праймери; БМК – безматрична контрола (PCR реакция без ДНК матрица); М – ДНК маркер GeneRuler 1 kb (Thermo Scientific)



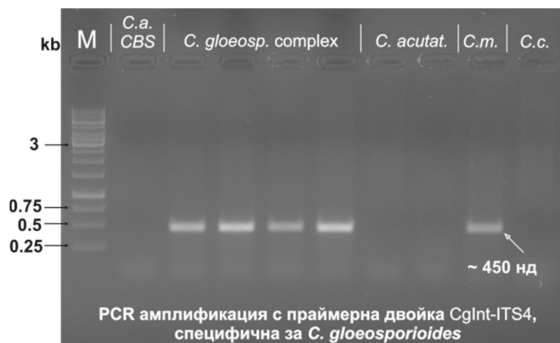
Фиг. 33. PCR продукт с дължина около 350 нд, получен само при изолатите, които фенотипно и генотипно са охарактеризирани като *Colletotrichum coccodes*, в резултат от амплификация с вътрешните (nested) праймери (видовоспецифични – Cc1NF1/Cc2NR1); БМК – безматрична контрола; М – ДНК маркер GeneRuler 1 kb (Thermo Scientific)

Специфичните за *C. acutatum* праймери (*CaInt2/ITS4*) дават амплификационен продукт с размер ~ 490 нд за изолатите от комплекса *acutatum* (Фиг. 34).



Фиг. 34. PCR продукт с дължина около 490 нд, получен само при изолатите, които се отнасят към комплекса *acutatum*, в резултат от амплификация с праймерната двойка *CaInt2/ITS4*; БМК – безматрична контрола; М – ДНК маркер GeneRuler 1 kb (Thermo Scientific).

Със специфичните за *C. gloeosporioides* праймери (CgInt/ITS4) амплифицират продукт с дължина ~ 450 нд за изолатите от плодове на пипер и домати от комплекса *gloeosporioides* (клон *kahawae*) и изолатите *C. musae* от банан (клон *musae*), включени в изследването за сравнение (Фиг. 35).



Фиг. 35. PCR продукт с дължина около 450 нд, получен в резултат от амплификация с праймерната двойка CgInt/ITS4 само при изолатите, които се отнасят към комплекса *gloeosporioides*; М – ДНК маркер GeneRuler 1 kb (Thermo Scientific)

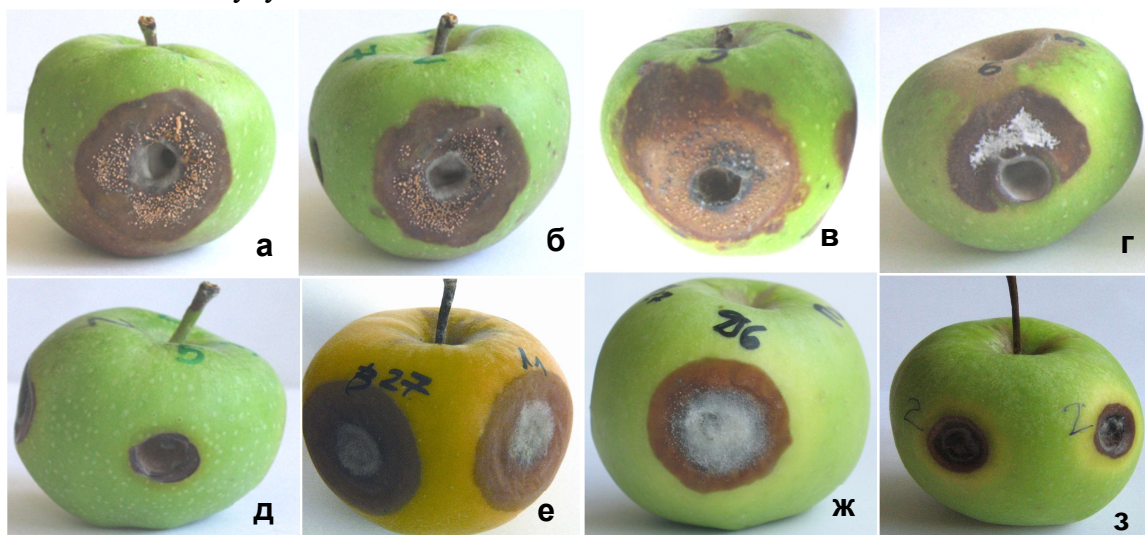
PCR продукти от 5 изолата (3 от пипер и 2 от домати), отнесени към комплекса *gloeosporioides*, са намножени с праймерите ITS1/ITS4, подложени на електрофореза в агарозен гел, изрязани от гела и пречистени, след което получените фрагменти са секвенирани в двете посоки, използвайки търговски доставчик на услугата ДНК-секвениране (Microsynth AG, Швейцария). Резултатите от секвенирането показват 100% идентичност с *C. kahawae* subsp. *ciggaro*, с което таксономичната принадлежност на изследваните изолати към този подвид е безспорно доказана.

3.4. Патогенна характеристика на изолати, принадлежащи към различни видове *Colletotrichum*

3.4.1. Тест за патогенност върху зелени плодове от ябълка

Резултатите от теста показват, че инокулирането с изолати, отнасящи се към различни видове *Colletotrichum*, водят до развитие на специфичен тип на нападение при всеки от тях. След инокулиране с изолати Ca3₃, Ca13₁ и Ca37₂, определени като *C. acutatum sensu lato*, се развиват големи кафяви петна с разпръснати асервули, разкъсващи кожицата на плода и отделящи изобилно розово-оранжева конидиална маса (Фиг. 36а,б,в). Изолат Ca44₁, който също принадлежи към комплекса *acutatum*, но е отнесен към вида *C. salicis*, предизвиква образуването на големи кафяви до тъмнокафяви петна, леко вдлъбнати и частично покрити със светлосив мицел (Фиг. 36г). Изолатите, образуващи микросклероции и определени като *C. coccodes*, проявяват най-слаба вирулентност. Некрозата се ограничава само около инокулационния отвор, в

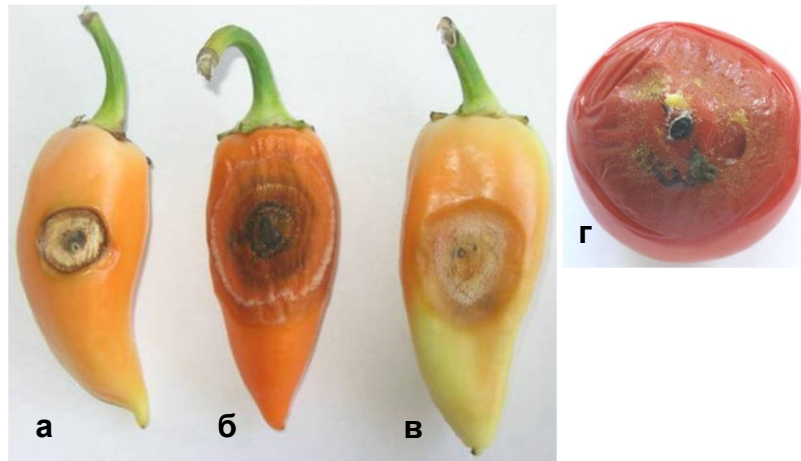
който се забелязва оскъден сив мицел. Асервули и микросклероции не се образуват (Фиг. 36д). Инокулирането с изолати B27 от пипер и D6 от домати, определени като вида *C. kahawae* subsp. *ciggaro* от комплекса *gloeosporioides* води до появата на обширни некрози с плътен светлосив мицел в центъра и конидийна маса, появяваща се от гъсто разположени малки асервули (Фиг. 36е,ж). Изолатите на *C. truncatum* причиняват развитието на червеникаво-кафяви некротични петна с широк светъл ореол. В инокулационния отвор се появява светлосив мицел, а около него се образуват дребни черни асервули, подредени в концентрични кръгове (Фиг. 36з). Успешни реизолации са направени от петната около инокулационните отвори, а при *C. acutatum* *sensu lato* и *C. gloeosporioides sensu lato* и директно от споровото желе на асервулите. Колониите, които се развиват при реизолациите, са фенотипно идентични с изходните, използвани за инокулум.



Фиг. 36. Тест за патогенност върху зелени ябълки проведен с изолати от: **а-г.** комплекса *acutatum*; **д.** *Colletotrichum coccodes*; **е, ж.** комплекса *gloeosporioides*; **з.** *Colletotrichum truncatum*

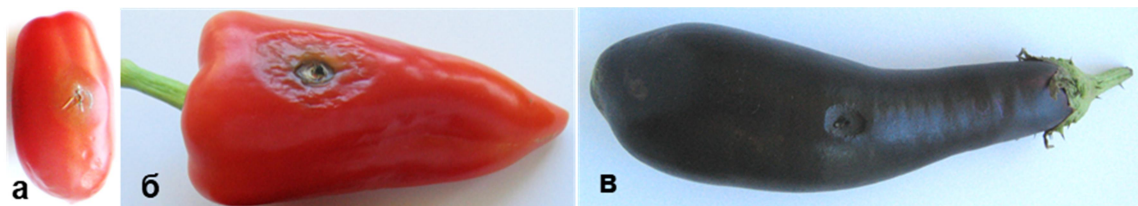
3.4.2. Тест за патогенност върху откъснати плодове от изследваните гостоприемници

Предварителният тест за патогенност, проведен с агресивния изолат Са3₃ на *C. acutatum* върху откъснати плодове от силно чувствителния образец пипер (линия 85/8) показва, че всички инокулации водят до развитието на антракнозни петна особено във вариантите с нараняване на плодовете, независимо от приложения инокулум (мицелен диск или суспензия) (Фиг. 37а,б,в). Изкуственото инокулиране на плодове от домати с *C. acutatum* предизвиква типичните за антракноза признаци – голям брой асервули и розово-оранжева маса от конидии (Фиг. 37г). Реизолации са направени успешно от заразените плодове, но не и от контролите.



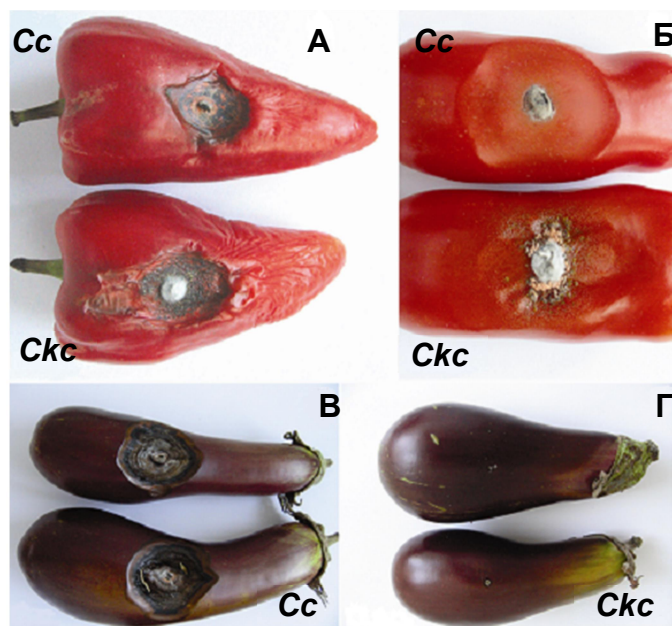
Фиг. 37. Тест за патогенност проведен върху откъснати плодове от домати и пипер от чувствителния образец (линия 85/8): **а.** без набождане с диск; **б.** с набождане и суспензия; **в-г.** С набождане и диск

Тестът, проведен с *C. coccodes*, изолиран от картоф, показва, че всички изолати са патогенни за домати, пипер и патладжан (Фиг. 38). Те причиняват симптоми на антракноза върху откъснати плодове, най-силно проявени по плодовете на домати и пипер. Реизолациите са успешни.



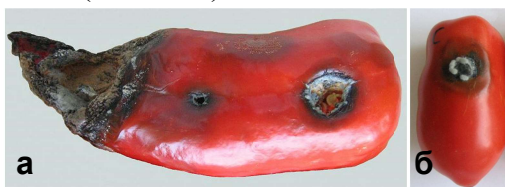
Фиг. 38. Тест за патогенност, проведен с изолати на *Colletotrichum coccodes* от картоф, върху откъснати плодове от домати (а), пипер (б) и патладжан (в)

За сравнение в тестовете за патогенност на изолатите, принадлежащи към вида *C. kahawae* subsp. *ciggaro* от комплекса *gloeosporioides*, са включени и изолати от *C. coccodes* (Фиг. 39). Инокулирането и с двата вида причинява до известна степен сходни симптоми по плодове на пипер и домати. Три дни след инокулирането се появяват воднисти петна, които стават меки и леко вдлъбнати. След около 10 дни централната част потъмнява, където се образуват асервули с оранжева конидийна маса (*C. kahawae* subsp. *ciggaro*) или микросклероции (*C. coccodes*) (Фиг. 39 А, Б). С развитието на болестта заразените с *C. kahawae* subsp. *ciggaro* плодове се набръчкват и мумифицират. Плодовете на патладжан се заразяват само от *C. coccodes* (Фиг. 39 В), а инокулираните с *C. kahawae* subsp. *ciggaro* остават здрави (Фиг. 39 Г).



Фиг. 39. Тест за патогенност върху откъснати плодове от пипер (А), домати (Б) и патладжан (В, Г), проведен с изолати от *Colletotrichum coccodes* (Cc) и *C. kahawae* subsp. *ciggaro* (Ckc)

Тестът за патогенност с изолати от *C. truncatum*, проведен с откъснати плодове от пипер, показва, че патогенът се развива сравнително бавно около инокулационните точки от горната страна на плода (Фиг. 40а). Но се разпространява от вътрешната страна по тъканите на перикарпа. След продължителен латентен период по повърхността се появява обилно спороношение с белезникав цвят. Седем дни след инокулирането на откъснати плодове от домати (сорт San Marzano) с изолати на *C. truncatum* от пипер се проявяват типичните за антракнозата симптоми с голям брой черни асервули и спорово желе (Фиг. 40б).



Фиг. 40. Тест за патогенност, проведен с изолати на *Colletotrichum truncatum* от пипер: а. Плод от пипер с две инокулационни точки; б. Плод от домати (сорт San Marzano)

3.5. Реакция на образци пипер към *Colletotrichum* spp. в полски и лабораторни експерименти

При полски условия най-важните симптоми на антракнозата са наблюдавани по плодовете на пипера, въпреки че болестта може да засегне и други органи на растението. Използваната скала на Pedrozo et al. (2007) позволява разделянето на образците в 3 групи според повредената площ (Табл. 10):

1. плодове, изглеждащи здрави, без симптоми (0% повредена площ);
2. плодове с 1 до 5 петна ($d < 0,5\text{cm}$) и повредена площ, варираща от 1% до 20%;
3. плодове с 1 до 5 петна ($d > 0,5\text{cm}$) и повече от 20% повредена площ.

Таблица 10. Оценка на образци пипер към антракноза, причинена от *Colletotrichum* spp. по плодовете, при полски условия и естествен инфекциозен фон

Засегнатата площ	Степен ¹	Сортове
0%	0	<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i> (образци 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 65), <i>C. annuum</i> x <i>C. frutescens</i> (хибридни линии 3 ₁ /4 ₇ 1, 3 ₁ /4 ₇ 2, 3 ₁ /4 ₁₂ 4, 3 ₂ /7 ₁ 3)
1-20%	1-4	Royal purple, Fiesta, Minito, Zulu, Mulato, Rouge Long Ordinaire, Rino, Clovis, Doux Long des Landes, Хебър, Фитостоп, Златен медал 7, Албена, Пазарджишка капия, Куртовска капия 1619, Бяла капия, Софийска капия, Калинков, Вибо, Гороглед, Оранжева капия, Сиврия, Чорбаджийски, Кози рог, Palanačka karija, Duga bela, Župska rana, <i>C. annuum</i> x <i>C. chinense</i> (хибридни линии 4/1, 4/2, 4/2 ₁ , 4/3, 4/3 ₁ , 6/1, 6/2, 6/3, 7/2 ₂ , 85/3 ₁ , 85/4 ₁ , 85/9 ₁ , 85/9 ₂ , 35/2 ₁ , 35/2 ₁ 4, 35/2 ₆ 4, 35/3 ₆ , XII 3, XII 11, XII 24, XII 25, XII 26)
повече от 20%	5-8	Пирин, Български ратунд, Fehërëson, Fehërëson synthetic, Стряма, Маčvanka, Пазарджишки едър, <i>C. annuum</i> x <i>C. chinense</i> (хибридни линии 85/8, 94/2 и 35/26 2)

¹ Въз основа на 0-8 скала (Pedrozo et al., 2007)

Появата и степента на нападение от *Colletotrichum* spp. по плодовете на пипера варира. Всички изследвани образци на *C. baccatum* var. *pendulum* и хибридните линии на *C. annuum* x *C. frutescens* показват най-висока полска устойчивост. Нито един сорт не попада в тази група. Повечето от тях са причислени към втората група. Най-чувствителни са сортовете Пазарджишки едър, Маčvanka и някои от хибридните линии на *C. annuum* x *C. chinense* (85/8, 94/2 и 35/26 2).

Откъснати плодове от сортове пипер (*C. annuum*) са инокулирани с най-агресивния изолат 3₃ на *C. acutatum*. Върху плодовете се развиват кръгли и вдлъбнати петна. Техният размер варира в зависимост от устойчивостта, респективно чувствителността на изследваните сортове. Най-устойчиви към *C. acutatum* са сортовете Сиврия, Пазарджишка капия, Куртовска капия 1619, Гороглед и Оранжева капия. Най-голяма чувствителност показват сортовете Пазарджишки едър, Fehërëson synthetic, Стряма, Златен медал 7 и Фитостоп. Наблюдавана е обща тенденция, че инокулирането на червените плодове предизвиква развитието на по-големи петна, отколкото върху зелените (Табл. 11).

Таблица 11. Реакция на сортове пипер (*Capsicum annuum*) към *Colletotrichum acutatum sensu lato* (изолат 3₃) след инокулиране на откъснати зелени и червени плодове

Сорт (фактор А)	Степен на нападение ¹		
	зелени плодове	червени плодове	средно
мм	(фактор В)		
мм			
Български сортове			
Сиврия	0,33±0,02	0,17±0,02	0,25
Златен медал 7	1,50±0,05	2,50±0,05	2,00
Албена	1,50±0,07	2,00±0,07	1,75
Пазарджишка капия	0,17±0,02	0,50±0,02	0,34
Куртовска капия 1619	0,50±0,02	0,33±0,03	0,42
Бяла капия	1,83±0,05	1,67±0,05	1,75
Софийска капия	1,67±0,07	0,83±0,03	1,25
Калинков	1,17±0,04	1,17±0,05	1,17
Гороглед	0,33±0,02	0,67±0,04	0,50
Вибо	0,33±0,02	2,33±0,54	1,33
Пазарджишки едър	2,00±0,07	3,17±0,03	2,59
Оранжева капия	1,17±0,05	0,33±0,02	0,75
Български ратунд	1,33±0,05	2,17±0,05	1,75
Стряма	0,83±0,03	3,33±0,05	2,08
Фитостоп	1,50±0,05	2,50±0,07	2,00
Пирин	1,50±0,05	2,33±0,05	1,92
Хебър	0,67±0,05	1,67±0,07	1,17
Сръбски сортове			
Palanačka kapiya	0,83±0,03	1,50±0,05	1,17
Duga bela	0,83±0,03	1,67±0,05	1,25
Župska rana	1,67±0,05	2,00±0,06	1,84
Mačvanka	1,50±0,06	1,67±0,05	1,59
Унгарски сортове			
Fehérëson	1,42±0,05	2,0±0,06	1,71
Fehérëson synthetic	1,83±0,05	3,25±0,01	2,54
Устойчива контрола			
<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i> (№ 4)	0	0	0
Средно	1,10	1,66	
Доказаност	LSD 5%	LSD 1%	LSD 0,1%
Фактор А	0,84	1,10	1,42
Фактор В	0,24	0,32	0,40
Взаимодействие А х В	1,18	1,56	2,00

¹Бал по 0-4 скала (Andrade et al., 2007). Представените данни са средни стойности от два експеримента, включващи 6 зелени и 6 червени плода във всяко повторение

Петната, образувани по плодовете на чувствителните сортове, са с размери по-големи от 3 cm и бързо се покриват с розово-оранжева желатинова маса, съдържаща многобройни конидии (Фиг. 41a). Върху плодовете на устойчивите сортове се образуват петна с по-малки размери и по-слаба интензивност на спороношението, а върху тези на контролата *C. baccatum* var. *pendulum* (№ 4) – само локални некрози (Фиг. 41б).



Фиг. 41. Симптоми върху откъснати плодове от пипер след изкуствено заразяване с изолат 3₃ на *Colletotrichum acutatum sensu lato*: **а.** Чувствителния сорт Пазарджишки едър; **б.** Устойчивата контрола *Capsicum baccatum* var. *pendulum* (№ 4)

4. ИЗВОДИ

1. Изследваната популация от род *Colletotrichum* е генетично разнородна. Установени са пет вида, патогенни за зеленчукови култури от семейство Solanaceae в България: *C. coccodes*, *C. acutatum sensu lato* и *C. salicis*, *C. gloeosporioides sensu lato* (видът *C. kahawae* subsp. *ciggaro*) и *C. truncatum*.

2. Видът *C. coccodes* се среща най-често и е патогенен за всички изследвани гостоприемници от семейството (картоф, домати, пипер и патладжан). *C. coccodes* не е съобщаван досега в България като причинител на антракноза по пипер.

3. Антракнозата по плодовете на пипер и домати е комплексно заболяване със сложна етиология, тъй като се причинява от няколко вида от род *Colletotrichum*: *C. coccodes*, *C. acutatum sensu lato*, *C. gloeosporioides sensu lato* (*C. kahawae* subsp. *ciggaro*) и *C. truncatum*.

4. Изследваните изолати, отнесени към комплекса *acutatum*, се различават по фенотип и генотип и принадлежат към два различни вида, единият от които е *C. salicis*.

5. Изолатите, определени като *C. gloeosporioides sensu lato* са сходни по фенотип и генотип и са 100% идентични с вида *C. kahawae* subsp. *ciggaro*, който не е съобщаван като причинител на антракноза по плодовете на пипер и домати не само в България, но и по света.

6. Видът *C. truncatum* (синоним *C. capsici*) не е изолиран от пипер, отгледан при полски или оранжерийни условия в България, а само от плодове, закупени от търговската мрежа.

7. В предварителния тест за патогенност най-добри резултати са получени във вариантите с нараняване, независимо от приложения инокулум (мицелен диск или суспензия).

8. Появата и интензивността на антракнозата при полски условия на естествен инфекциозен фон варира. Всички изследвани образци на *C. baccatum* var. *pendulum* и хибридите на *C. annuum* x *C. frutescens* показват най-висока полска устойчивост и попадат в първата група (отсъствие на симптоми). Повечето от сортовете се отнасят към втора група (1-20 % засегната площ), сред които Хебър, Златен медал, Оранжева капия и Албена са с най-ниска степен на нападение.

9. При изкуствено заразяване на откъснати плодове пипер с *C. acutatum* най-устойчиви са сортовете Сиврия, Пазарджишка капия, Куртовска капия, Гороглед и Оранжева капия.

5. ПРИНОСИ

1. Проведено е първото комплексно и задълбочено проучване на болестите, причинени от видове *Colletotrichum* по гостоприемници от семейство Solanaceae.

2. Изолирани са патогени от род *Colletotrichum* и е определена тяхната видова принадлежност. На 37 избрани моноспорови изолати е направена фенотипна и генотипна характеристика въз основа на ITS региона – баркод за гъбите. Симптомите по надземни и подземни растителни органи са подробно описани и онагледени.

3. *C. coccodes* е преобладаващият вид в популацията и е патогенен за всички изследвани представители от семейство Solanaceae. За пръв път в България е установен като причинител на антракноза по плодовете на пипер.

4. За пръв път у нас и в света е доказано, че пипер и домати са нови гостоприемници на вида *C. kahawae* subsp. *ciggaro*, който предизвиква антракноза по плодовете им.

5. Информацията за видовия състав на гъбите от род *Colletotrichum*, които са патогенни за съответните гостоприемници от семейство Solanaceae, е ценен принос за биологичната безопасност на растителната продукция в България и за растителната карантина при търговия със селскостопански продукти.

6. Създадена е работна колекция от изолати, отнасящи се към различни видове *Colletotrichum*, която се съхранява в ИФРГ. Седем избрани изолати са депозиранни в Национална банка за промишлени микроорганизми и клетъчни култури.

Научни публикации по темата на дисертационния труд

1. Rodeva, R., **Z. Stoyanova**, R. Pandeva, N. Petrov. 2009. Field reaction to anthracnose caused by *Colletotrichum* spp. on pepper fruits. Acta Horticulturae (ISHS) 830, 557-562. ISSN 0567-7572; ISBN 978 90 6605 552 0 **SJR 0,223**
2. **Stoyanova, Z.B.**, R.M. Rodeva, I. Karov, B. Kovacevik, V.I. Manova, R.G. Georgieva. 2013. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum coccodes* isolated from pepper cultivated in Bulgaria and Macedonia. Jour. Nat. Sci, Matica Srpska, Novi Sad, 124, 249-262. YU ISSN 0352-4906 UDK 5/6 (05); DOI:10.2298/ZMSPN1324249S
3. Rodeva, R., **Z. Stoyanova**, V. Manova, R. Georgieva, L. Stoilov. 2014. Isolation and characterization of *Colletotrichum coccodes* from potato in Bulgaria. Acta Horticulturae (ISHS) 1142, 127-134. DOI: 10.17660/ActaHortic.2016.1142.20
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1142.20> **SJR 0,181**

Доклади и постери по темата на дисертационния труд, представени на международни научни форуми

А. Международни научни прояви в чужбина

1. Rodeva, R., **Z. Stoyanova**, E. Surviliene, P. Chavdarov. 2011. Fungi associated with seed and plant infection of pepper. XVIII Symposium of the Baltic Mycologists and Lichenologists. 19-23 September 2011, Dubingiai, Lithuania. Programme and Abstracts, p. 17 – доклад.
2. Rodeva, R., **Z. Stoyanova**, V. Manova, R. Georgieva, L. Stoilov. 2014. High Resolution Melting Analysis for identification of *Colletotrichum* species causing pepper anthracnose. 11th Conference of the European Foundation for Plant Pathology, 07-14 September 2014, Krakow, Poland – доклад.

Б. Международни научни прояви, проведени у нас

3. Rodeva, R., **Z. Stoyanova**, V. Manova, R. Georgieva, L. Stoilov. 2014. Combining morphological, cultural and molecular approaches in differentiation of *Colletotrichum* species on solanaceous hosts. Scientific Conference Plant Physiology and Genetics – Achievements and Challenges, 24-26 September 2014, Sofia, Bulgaria – постер.
4. **Stoyanova, Z.**, B. Mihailova, R. Pandeva. 2019. Phenotypic characteristics of Bulgarian local pepper (*Capsicum annuum* var. *annuum*) accessions. Third Seminar on Genetics with International Participation – SGIP, 2-4 October 2019, Sofia, Bulgaria (постер)
5. Стоянова, З., Р. Родева. 2019. Болести, причинени от гъбния патоген *Colletotrichum coccodes* по зеленчукови култури от семейство *Solanaceae* в България. Втори

интердисциплинарен докторантски форум, организиран от Център за обучение – БАН, 29-31 август 2019.

Забелязани цитати по темата на дисертационния труд

Rodeva, R., **Z. Stoyanova**, R. Pandeva, N. Petrov. 2009. Field reaction to anthracnose caused by *Colletotrichum* spp. on pepper fruits. Acta Horticulturae (ISHS) 830, 557-562. ISSN 0567-7572; ISBN 978 90 6605 552 0

1. Distribution Maps of Plant Diseases. 2011. *Colletotrichum coccodes* (Wallr.) S. Hughes Fungi: Ascomycota: Glomerellaceae. Map No. 190 Edition 5 Issued October 2011.

Stoyanova, Z.B., R.M. Rodeva, I. Karov, B. Kovacevik, V.I. Manova, R.G. Georgieva. 2013. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum coccodes* isolated from pepper cultivated in Bulgaria and Macedonia. Jour. Nat. Sci, Matica Srpska, Novi Sad, 124, 249-262. YU ISSN 0352-4906 UDK 5/6 (05); DOI:10.2298/ZMSPN1324249S

2. Jamiołkowska, A., B. Skwaryło-Bednarz, E. Patkowska. 2018. Morphological identity and population structure of hemibiotrophic fungus *Colletotrichum coccodes* colonizing pepper plants. Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus, 17, 4, 181-192. ISSN 1644-0692; e-ISSN 2545-1405; DOI: 10.24326/asphc.2018.4.16

http://www.hortorumcultus.actapol.net/pub/17_4_181.pdf

3. Tyvaert, L., E. Everaert, L. Lippens, W.J.M. Cuijpers, S.C. França, M. Höft. 2019. Interaction of *Colletotrichum coccodes* and *Verticillium dahliae* in pepper plants. European Journal of Plant Pathology, 155, 4, 1303-1317. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01857-1> **SJR 1,582**

4. Nieto-Angel, D., A. Almaraz-Sánchez, V. Ayala-Escobar, M. Orozco-Santos, F.M. Lara-Viveros. 2019. First report of *Colletotrichum coccodes* in fruits of tomato (*Solanum lycopersicum*) in Mexico. Revista Fitotecnia Mexicana, 42, 3, 195-200.

[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_issues&pid=0187-](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_issues&pid=0187-7380&lng=pt&nrm=iso)

[7380&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_issues&pid=0187-7380&lng=pt&nrm=iso) **SJR 0,258**

5. Ghaderi, F., A. Karbasi, B. Sharif-Nabi, A.-R. Javadi-Estahbanati. 2019. Morphological, molecular and pathogenicity characteristics of *Colletotrichum* species associated with potato and onion in Isfahan province. Applied Entomology and Phytopathology, 87, 1, 108, 13-26. DOI 10.22092/JAEP.2018.121074.1213 https://jaenph.areeo.ac.ir/article_120501_en.html

Rodeva, R., **Z. Stoyanova**, V. Manova, R. Georgieva, L. Stoilov. 2016. Isolation and characterization of *Colletotrichum coccodes* from potato in Bulgaria. Acta Horticulturae (ISHS) 1142, 127-134. DOI: 10.17660/ActaHortic.2016.1142.20 **SJR 0,181**

<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1142.20>

6. Karamnejadi, T., A. Solhizadeh, O. Shenavar, M.A. Tajick-Ghanbari. 2017. First report of leaf spot caused by *Colletotrichum coccodes* on *Viola tricolor* in Iran. Journal of Plant Pathology, 99, 2, DOI: 10.4454/jpp.v99i2.3858

<http://sipav.org/main/jpp/index.php/jpp/article/view/3858/2502>

Участие в научни проекти, по темата на дисертационния труд

1. ФНИ МОН Б-1515/05 “*Botrytis cinerea* и *Sclerotinia sclerotiorum* по пипера – източници и механизми на устойчивост” (2005 – 2009 г.)
2. SEE-ERA.NET Plus Joint Call, ERA 226/01 „Exploration of Balkan biodiversity of *Capsicum* spp. to extract biotic stress resistant germplasm” (Изследване на биоразнообразието при пипера (*Capsicum* spp.) на Балканите за получаване на устойчиви към биотичен стрес генетични ресурси) (2010 – 2012 г.)
3. Проект по ЕБР с Литва – Lithuanian Institute of Horticulturae, Vabtai, Kaunas district, Lithuania, “Development of pepper germplasm resistant to some fungal diseases” (Създаване на генетични ресурси от пипер, устойчив към някои гъбни болести) (2010 – 2012 г.)
4. Проект по ЕБР с Тайван – National Taiwan University, „Phenotypic and genotypic characterization of plant pathogens of tomato and pepper originated from Bulgaria and Taiwan and development of resistant germplasm“ (Фенотипна и генотипна характеристика на патогени по домати и пипера с произход от България и Тайван и създаване на устойчив генетичен материал) (2015 – 2016 г.)
5. Проект по ЕБР с Латвия – Latvian Plant Protection Research Centre, „Genotypic and phenotypic characterization of *Colletotrichum/Glomerella* species on cultivated host plants in Bulgaria and Latvia“ (Генотипна и фенотипна характеристика на видове *Colletotrichum/Glomerella* по културни растения гостоприемници в България и Латвия) (2015 – 2017 г.)

Fungal pathogens of the genus *Colletotrichum*, as causal agents of anthracnose and root rot in vegetable crops of Solanaceae family in Bulgaria

Zornitsa Stoyanova

SUMMARY

A comprehensive study of *Colletotrichum* species pathogenic for vegetable crops of Solanaceae family in Bulgaria has been carried out in the period 2006-2017. The pathogen population is genetically heterogeneous. It is composed of five different species: *C. coccodes*, *C. acutatum sensu lato* and *C. salicis*, *C. gloeosporioides sensu lato* (the species *C. kahawae* subsp. *ciggaro*) and *C. truncatum*.

C. coccodes is the predominant species and is pathogenic to all studied host plants. In potatoes, the symptoms appear on the roots, tubers, stolons and stem base. The pathogen causes anthracnose on the fruits of pepper, tomato and eggplant. In their underground parts it provokes root rot, wilting and premature death of infected plants. So far, this species has not been reported in Bulgaria as a causal agent of anthracnose on pepper fruits.

The studied isolates from the *acutatum* complex are referred to two different species: *C. acutatum sensu lato* and *C. salicis*. They all have gray colonies and form conidia directly on the aerial mycelium. Ca44₁ isolate originated from tomato fruit differs from the others in a set of phenotypic traits, but the most significant difference is the formation of fertile structures of the sexual morph (perithecia, asci and ascospores) in culture along with conidia. This isolate is most likely related to the species *C. salicis*. It is possible the remaining isolates identified as *C. acutatum sensu lato* to be different species of the *acutatum* complex.

Pepper and tomato fruit isolates identified as *C. gloeosporioides sensu lato* are characterized by the simultaneous development of asexual and sexual morphs in culture. The rDNA sequences showed 100% identity with *C. kahawae* subsp. *ciggaro*. For the first time in our country and in the world pepper and tomato have been established as new hosts of this species.

The species *C. truncatum* (synonym *C. capsici*) is not isolated from pepper plants grown under field or greenhouse conditions in Bulgaria, but only from fruits purchased from the local market in Sofia imported from Northern Macedonia.

The accurate diagnosis of *Colletotrichum* species requires a combined approach involving morphological and molecular techniques. The ITS region distinguishes well the main branches (complexes), but in many cases cannot differentiate the isolates at the species level and it is necessary to use other genetic markers individually or in combination.

The pathogenicity test performed on green apples provides valuable information on the pathogenic properties of the isolates and contributes to their differential diagnosis. Its advantages are the availability of fruit almost all year, the ability to test several isolates on one fruit and less susceptibility to saprophytic invasion.

The occurrence and intensity of anthracnose under field conditions on a natural infectious background varies. All tested *C. baccatum* var. *pendulum* accessions and *C. annuum* x *C. frutescens* hybrids show the highest field resistance and fall into the first group (absence of symptoms). Most of the varieties belong to the second group (1-20% of the affected area), among which Hebar, Zlaten medal, Oranzheva kapiya and Albena have the lowest disease degree.

The varieties Sivriya, Pazardzhishka kapiya, Kurtovska kapiya, Gorogled and Oranzheva kapiya are the most resistant to artificial infection of detached pepper fruits with *C. acutatum*.