

## РАЗВИТИЕ НА *Didymella rabiei* ВЪРХУ РАСТИТЕЛНИ ОСТАТЪЦИ ОТ НАХУТ

ЙОРДАНКА СТАНОЕВА

Добруджански земеделски институт, Генерал Тошево

E-mail: y\_zdravkova@abv.bg

### Development of *Didymella rabiei* on Chickpea Plant Residues

Y. Stanoeva

Dobroudja Agricultural Institute, General Toshevo, Bulgaria

#### Abstract

Ascochyta blight caused by *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labrousse is the economically most important disease on chick pea in many countries where the crop is grown. Under moist conditions the fungus *Asc. Rabiei* grows fast from the spots, covering the entire stems and pods with pycnidia and consecutively with perithecia as well. Main factors for the development and maturing of the perithecia are the high humidity and temperatures of 5 – 10 °C. The relative frequency of the formed perithecia was significantly lower than the frequency of pycnidia. The morphological characteristics of the perithecia, asci and ascospores confirmed the nature of *Didymella rabiei*. The investigation for sexual compatibility showed that *D. rabiei* was a heterothallic fungus. Based on crossing, the four isolates involved in the study were divided into two groups or mating types. Under field conditions in North-East Bulgaria, mature ascospores were observed at the beginning of March and the discharge of the majority of them continued for about two months.

**Key words:** chick pea, Ascochyta blight, *Didymella rabiei*, epidemiology

Аскохитозата с причинител *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labrousse е икономически най-важната болест по нахута в много страни, където той се отглежда (Nene and Reddy, 1987). Болестта се характеризира с формиране на некротични петна по всички надземни части на растението през цялата вегетация. При благоприятни условия загубите на добива могат да достигнат до 100% (Navas-Cortes et al., 1998b).

*Didymella rabiei* (Kovachevski) v. Arx (syn. *Mycosphaerella rabiei* Kovachevski), телеоморфна форма на *Ascochyta rabiei*, е хетероталична гъба с двуполусна, хомогенна *mating incompatibility* система и за формиране на фертилни перитеции е необходимо кръстосване на два полово съвместими типа (*mating-type*) (MAT1-1 и MAT1-2) (Wilson and Kaiser, 1995). При естествени условия *Didymella rabiei* се развива сапрофитно само по презимували върху повърхността на почвата заразени рас-

тителни остатъци и формира голям брой пикнидии и перитеции (Ковачевски, 1936; Navas-Cortes et al., 1995; 1998a; Trapero-Casas and Kaiser, 1992). Узрели аскоспори се образуват при подходящи климатични условия – температура от 5 – 10 °C и влага в продължение на 2 месеца (Trapero-Casas and Kaiser, 1987). Аскоспорите се разпръскват във въздуха рано на пролет в началото на вегетацията на нахута. Телеоморфната форма играе важна роля в епидемиологията на аскохитозата по нахута в Испания, САЩ, Австрия, Канада, Израел и Турция (Gamliel-Atinsky et al., 2005). Аскопорите имат значение за пренасяне на болестта на големи разстояния в началото на вегетацията и може да служи като първичен инокулум за развитието на болестта (Trapero-Casas et al., 1996; Trapero-Casas and Kaiser, 2007). За развитието и узряването на перитециите при лабораторни условия са необходими влага

и продължителен период при температура под 15 °С. При полски условия узряването на аскоспорите може да се забави от продължителен период на засушаване. Заравянето на растителните остатъци води до намаляване на формирането на аскоспори в сравнение с остатъците намиращи се на почвената повърхност (Navas-Cortes et al., 1995).

*Didymella rabiei* е описана за първи път в България (Ковачевски, 1936), а по-късно в Русия (Gorlenko and Bushkova, 1958), Гърция (Zachos et al., 1963), Сирия (Haware, 1987) и САЩ (Kaiser and Hannan, 1987). Условията, необходими за развитието на перитеции са много специфични, от което следва, че може би тя не се развива ежегодно в България.

Целта на проведеното изследване беше да се провери наличието на телеоморфната форма по естествено презимували растителни остатъци от нахут в Североизточна България, както и индуцирането ѝ при лабораторни условия.

#### **МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ**

Изследването е проведено през периода 2010 – 2011 година.

**Индуциране на перитеции при лабораторни условия.** За целта са използвани естествено заразени стъбла и бобове с *Asc. rabiei*, които след повърхностна дезинфекция с 1% р-р на NaOCl са поставяни в полиетиленови кесии между два пласта влажна филтърна хартия и инкубирани на тъмно в продължение на 12 седмици при температура 5°, 10° и 20 °С. В края на експеримента от всяка проба при различните температури са вземани по 4 стъблени части, които са изследвани за повърхностно колонизиране с пикнидии и перитеции върху тъканите, относителна честота на перитециите и наличие на зрели перитеции. Процентът на повърхностното колонизиране на патогена върху тъканите и относителната честота на перитециите в колонизираните тъкани са отчетени с помощта на 5-степенна скала (Trapero-Casas and Kaiser, 1992).

**Идентифициране на телеоморфната форма.** Първоначално перитециите са определяни с помощта на бинокуляр. След това отделни перитеции са наблюдавани под микроскоп, където се определяше фазата им на развитие. Измерени са диаметърът на перитеции-

те, дължината и ширината на асците, както и на аскоспорите. Аскоспорите са разпръсквани върху WA (воден агар) и след това поединично пренасяни върху CDA (нахутено-декстрозен агар) за потвърждаване на анаморфната форма.

Патогенността на аскоспорите е определяна по два метода (Trapero-Casas and Kaiser, 1992).

**Полово съвместими типове (*Mating type*).** За тестване на хомо- или хетероталичната същност на *D. rabiei* са използвани изкуствено заразени растения. За целта е използван сортът Балкан, който е инокулиран поотделно с четири моноспорови изолати (AR9719, AR9822, AR97M1 и AR085) (Станоева, 2006). Три седмици след инокулирането стъблата на растенията се нарязват на части с дължина 4 – 5 cm, като са подбирани участъци с петна и формиранни плодни тела в тях. Нарязаните стъблени части са поставяни в натронови кесии и съхранени в хладилник до използването им. Тестуването на хомо- или хетероталичната същност *D. rabiei* е осъществено в петриевы блюда по метода на Trapero-Casas and Kaiser (1992).

**Формиране на перитеции при полски условия.** След прибирането на нахута растителните остатъци от заразени растения са оставени на две купчинки директно върху почвената повърхност на разстояние 50 m една от друга. До всяка купчинка със заразени остатъци е поставена купчинка със здрави растителни остатъци, като разстоянието между тях е 1 m. Отначало, един път в месеца, а по-късно през 10 дни растителните остатъци са наблюдавани за наличие на сапрофитен растеж от *D. rabiei* и формиране на перитеции.

#### **РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ**

##### **Индуциране на перитеции при лабораторни условия**

Поставена при влажни условия гъбата *Asc. rabiei* се разраства бързо от петната и покрива изцяло стъблата и чушките с пикнидии, а в следствие и с перитеции. Резултатите от изследването показват, че при 5 и 10 °С не се наблюдават съществени различия при колонизирането на патогена, докато при 20 °С е малко по-слабо (табл. 1). Относителната честота на формираните перитеции е значително по-малка от тази на пикнидиите. Пикнидии се формираха при всички температури и през целия пе-

Таблица 1. Влияние на температурата върху формирането и узряването на перитециите на *Didymella rabiei* върху естествено инфектирани стъбла от нахут

Table 1. Influence of temperature on formation and maturation of perithecia of *Didymella rabiei* in naturally infested chickpea straw

Temperature	Straw colonization	Proportion of perithecia	Percent perithecia		
			imature	mature	aborted
5 °C	2.9*	1.6*	42.0	58.0	0
10 °C	3.1	2.0	4.3	88.5	7.2
20 °C	2.5	0.5	0	0	100

(0 – 4 rating scale).

Таблица 2. Формиране на перитеции при кръстосване на моноспорови изолати на *Didymella rabiei*

Table 2. Production of perithecia by *Didymella rabiei* in crosses between single-spore isolates

Isolate	Mating type	Isolate			
		AR9719	AR9822	AR085	AR97M1
AR9719	A1	–	–	–	+
AR9822	A1		–	–	+
AR085	A1			–	+
AR97M1	A2				–

(–) - perithecia did not form; (+) - mature perithecia formed.

Таблица 3. Климатична характеристика за периода септември 2010 – юни 2011 година

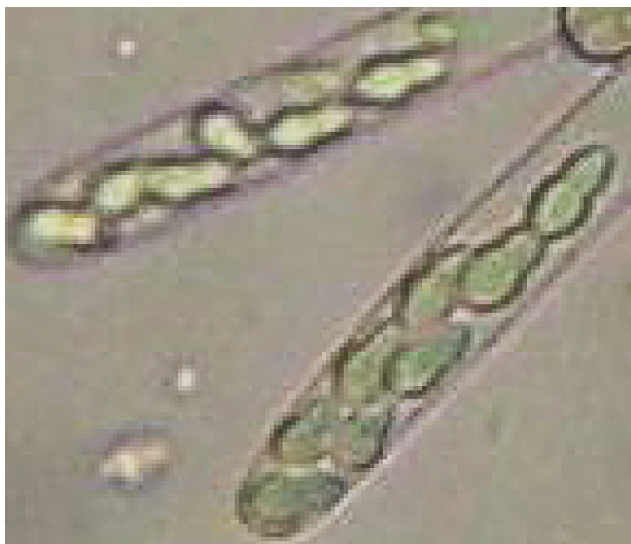
Table 3. Climatic characteristics during September 2010 – June 2011

Month	Date							
	1 – 10		11 – 20		21 – 30 (31)		total	
	precipitation	mean diurnal t°	precipitation	mean diurnal t°	precipitation	mean diurnal t°	precipitation	mean diurnal t°
September	4.6	18.2	0.4	18.5	16.0	16.7	<b>21.0</b>	<b>17.8</b>
October	29.4	8.8	22.2	12.3	5.6	7.4	<b>57.2</b>	<b>9.5</b>
November	0.0	13.8	7.2	13.2	20.2	10.0	<b>27.4</b>	<b>12.3</b>
December	19.1	6.4	13.9	1.7	17.0	3.1	<b>50.0</b>	<b>2.5</b>
January	15.7	-0.8	3.7	4.0	16.5	-2.9	<b>35.9</b>	<b>0.1</b>
February	0.0	0.7	0.6	0.1	14.7	-3.7	<b>15.3</b>	<b>-1.0</b>
March	1.5	-1.3	0.1	7.3	19.0	7.6	<b>20.6</b>	<b>4.5</b>
April	20.7	7.0	28.1	7.5	0.4	9.5	<b>49.2</b>	<b>8.0</b>
May	55.0	10.7	20.8	15.1	4.6	18.2	<b>80.4</b>	<b>14.7</b>
June	21.4	19.6	10.5	19.5	3.2	18.8	<b>35.1</b>	<b>19.3</b>

риод на експеримента продуцираха жизнени конидии. Въпреки че перитеции се формираха и при трите проучвани температури, зрели асци и аскоспори са наблюдавани след 12 седмици само при 5 и 10 °C (табл. 1). При 20 °C са наблюдавани малко на брой структури, наподобя-

ващи перитеции без асци и аскоспори.

Колонизирането на растителните тъкани от сапрофитни гъби и бактерии се увеличава с увеличаване на температурата. При 5 и 10 °C замърсяването е незначително, докато при 20 °C замърсяването е изобилно.



Фиг. 1. Зрели асци с аскоспори на *Didymella rabiei*  
 Fig. 1. Ascus and ascospores of *Didymella rabiei*



Фиг. 2. Перитеций с асци и аскоспори на *Didymella rabiei* продуцирани върху нахутени стъбла при естествени условия  
 Fig. 2. Perithecia with asci and ascospores of *Didymella rabiei* formed on chickpea residues under natural conditions

За сапрофитния растеж на *Asc. rabiei* и за формиране на перитеции съществено значение има високата влажност. Върху сухи стъбла не се наблюдава нито сапрофитен растеж, нито формиране на перитеции, а при вече формираните перитеции тяхното по нататъшно развитие спира.

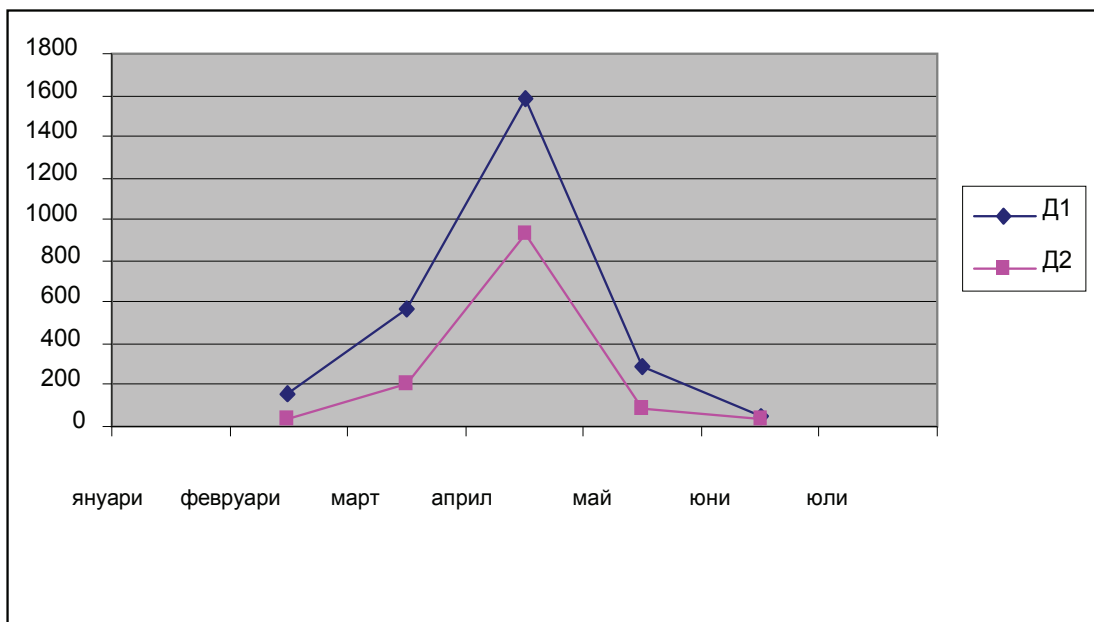
Формирането на перитеции при всички температури показва, че температурата има малка роля за индуциране на перитециите. Тя обаче има основна роля за узряването им.

#### Идентифициране на телеоморфната форма

Перитециите, формираните при лабораторни условия са подобни на тези, формираните при полски условия. По форма приличат на пикнидиите и първоначално се разграничават трудно при наблюдение под бинокулар. За разлика от пикнидиите те са по-тъмни, по-големи и в повечето случаи са сплеснато-кълбовидни, издуто-лещовидни и рядко са правилнокълбовидни. Остиолът е едва забележим или липсва, а при наличие на влажни условия в горната част на узрелите перитеции се наблюдава бял ексудат. Подобно на пикнидиите, перитециите се образуват под кората на стъблата и епидермиса на бобовите, а в последствие се показват на повърхността. Размерите им варират от 120 – 250  $\mu\text{m}$ . В узрелите перитеции липсват парафизии. Асците са цилиндрично-бухалковидни, хиалинни, средните изправени, а крайните повече или по-малко извити и в долната част с краче. Размерите им са 49,0 – 77,0  $\mu\text{m}$  x 9,0 – 13,5  $\mu\text{m}$ . След узряването асците се пукат и изхвърлят съдържащите се в тях аскоспори. Всеки аскус съдържа по 8 аскоспори (фиг. 1). Аскоспорите са наредени обикновено в един ред, наклонени към надлъжната ос на аскуса. Те са хиалинни, двуклетъчни, по форма са елипсоидни или яйцевидни, прищипнати при септата, в резултат на което горната клетка е значително по-голяма от долната. Размерите им са 12 – 19,5  $\mu\text{m}$  x 5,0 – 7,0  $\mu\text{m}$ . От единични аскоспори върху CDA се развиват типични култури на *Asc. rabiei*. Растения от нахут, инокулирани с аскоспори развиват симптоми типични за аскохитозата.

#### Полово съвместими типове (*Mating type*)

Резултатите от теста за полово съвместимост показват, че четирите изолати се разпределят в две групи или “mating type” (ПСТ) (табл. 2). Изолатите AR9719, AR9822 и AR085 принадлежат към един ПСТ, а изолат AR97M1 принадлежи към друг ПСТ. Тъй като не разполагаме с контролни (тестерни) изолати на двата полово съвместими типа – MAT1-1 и MAT1-2, установените от нас два типа изолати



Фиг. 3. Продължителност на освобождаване на аскоспорите от растителните остатъци  
 Fig. 3. Ascospore discharge over time from chickpea residues

ще бъдат означени условно с А1 и А2. Изолатите AR9719, AR9822 и AR085 принадлежат към един тип, което означава, че са полово несъвместими. Тези изолати сме означили с А1. При кръстосването им помежду си те не формират перитеции, а формират само пикнидии. При кръстосване на изолатите AR9719, AR9822 и AR085 с изолат AR97M1 се формират както пикнидии, така и много на брой перитеции с добре развити асци и аскоспори. Следователно изолат AR97M1 е полово съвместим с изолатите AR9719, AR9822 и AR085 и се отнася към друга група или друг ПСТ, който сме означили с А2. Резултатите от контролните кръстосвания показват, че всичките четири изолати са самостерилни и формират само пикнидии върху нахутените стъбла.

Перитеции на *D. rabiei* никога не се наблюдават върху инфектирани живи растения. Те обаче могат да се развиват върху растителни остатъци от здрави нахутени растения, когато бъдат инокулирани с аскоспори или със смес от моноаскоспорови или моноконидийни изолати (Trapero-Casas and Kaiser, 1992).

Изследването за половата съвместимост показва, че *Didymella rabiei* е хетероталична гъба. На основа на кръстосването включените в изследването 4 изолата се групират в две групи или ПСТ, което потвърждава изследването на Trapero-Casas and Kaiser (1992).

#### Формиране на перитеции при полски условия

Гъбата *Asc. rabiei* може да се развива сапрофитно при влажни условия, като покрива изцяло заразените растителни остатъци с пикнидии, а в последствие и с перитеции. Първото наблюдение на растителните остатъци за формиране на плодни тела е извършено през ноември, когато се наблюдават само пикнидии. При второто наблюдение през декември освен пикнидии са наблюдавани и единични, неузрели перитеции. При следващото наблюдение на растителните остатъци формираните перитеции имаха ясно изразени асци с аскоспори (фиг. 2 и 3). Зрели аскоспори са наблюдавани в началото на март и освобождаването (изхвърлянето) на мнозинството от тях продължи около два месеца. Максималното разпръскване на аскоспорите е през първата половина на април (фиг. 3). В края на май и началото на юни с повишаване на температурата и по-ниската влажност формирането и освобождаването на аскоспорите се преустановява и перитециите дегенерират.

По растителните остатъци от здрави растения разположени в близост до купчинките със заразените растителни остатъци не са наблюдавани пикнидии или перитеции.

Развитието на перитеции при полски условия е в тясна зависимост от климатичните условия в района на експеримента.

Времето, необходимо за узряване на перитециите и за продуциране на аскоспори, се определя от температурата и валежите през този период. Късното появяване на перитециите върху растителните остатъци се дължи на ниската влажност през есента (табл. 3). Развитието на перитеции при полски условия в района на Североизточна България показва, че телеоморфната форма може да играе съществена роля за развитието на аскохитозата по нахута в този район. Сеитбата на нахута в Североизточна България се осъществява през март, което означава, че втората половина от периода, през който се освобождават аскоспорите, съвпада с вегетацията на нахута и аскоспорите могат да служат като първичен инокулум за болестта.

### ИЗВОДИ

Изследването за половата съвместимост показва, че *Didymella rabiei* е хетероталична гъба.

Изолатите AR9719, AR9822, AR97M1 и AR085 се отнасят към два полови съвместими типа. Изолатите AR9719, AR9822 и AR085 се отнасят към тип A1, а изолат AR97M1 – към тип A2.

Развитието на перитециите е в тясна зависимост от влагата и температурата. Формирането на перитеции при всички температури показва, че температурата има малка роля за тяхното индуциране, но има основна роля за узряването им.

За условията на Североизточна България зрели аскоспори се наблюдават в началото на март и освобождаването на мнозинството от тях продължава около два месеца.

Изхвърлянето на аскоспорите съвпада с вегетацията на нахута и могат да служат като първичен инокулум за болестта.

### ЛИТЕРАТУРА

**Ковачевски, И.** 1936. Чернилката по нахута (*Mycosphaerella rabiei* n.sp.) Министерство на земеделието и държавните имоти, Институт за защита на растенията, София.

**Станоева, Й.** 2006. Проучване реакцията на линии и сортове нахут към причинителя на чернилката *Asc.rabiei*. *Растениевъдни науки*, 43, 454-457

**Gamliel-Atinsky, E., Shtienberg, D., Vintal, H., Nitzni, Y. and Dinoor, A.** 2005. Production of *Didymella rabiei* pseudothecia and dispersal of ascospores in a Mediterranean climate. *Phytopathology*, 95: 1279-1286

**Gorlenko, M. V. and L. N. Bushkova.** 1958. Perfect state of the causal agent of ascochytirosis of chickpea. *Rev. Appl. Mycol.*, 37: 695

**Haware, M. P.** 1987. Occurrence of the perfect state of *Ascochyta rabiei* in Syria. *Int. Chickpea Newsl.*, 17: 29-30

**Kaiser, W. J. and R. M. Hannan.** 1987. First report of *Mycosphaerella rabiei* on chickpeas in the Western Hemisphere. *Pl. Dis.*, 71: 192

**Navas-Cortes, J. A., Trapero-Casas, A. and Jimenez-Diaz, R. M.** 1995. Survival of *Didymella rabiei* in chickpea straw debris in Spain. *Plant Pathol.*, 44: 332-339

**Navas-Cortes, J. A., Trapero-Casas, A. and Jimenez-Diaz, R. M.** 1998a. Phenology of *Didymella rabiei* development on chickpea debris under field conditions in Spain. *Phytopathology*, 88: 983-991

**Navas-Cortes, J. A., Perez-Artès E., Jimenez-Diaz, R. M., Llobell A., Bainbridge B. W. and Heale J. B.** 1998b. Mating Type, Pathotype and RAPDs Analysis in *Didymella rabiei*, the Agent of Ascochyta Blight of Chickpea. *Phytoparasitica*, 26 (3): 199-212

**Nene, Y. L. and Reddy, M. V.** 1987. Chickpea disease and their control. p. 233-270. In: The Chickpea. M. C. Saxena and K. B. Singh, Eds. CAB International, Oxon, UK.

**Trapero-Casas, A. and Kaiser, W. J.** 1987. Factors influencing development of the teleomorph of *Ascochyta rabiei*. *Int. Chickpea Newsl.*, 17: 27-28

**Trapero-Casas, A. and Kaiser, W. J.** 1992. Development of *Didymella rabiei*, the teleomorph of *Ascochyta rabiei*, on chickpea straw. *Phytopathology*, 82: 1261-1266

**Trapero-Casas, A., Navas-Cortes, J. A. and Jimenez-Diaz, R. M.** 1996. Airborne ascospores of *Didymella rabiei* as a major primary inoculum for ascochyta blight epidemics in chickpea crops in southern Spain. *Eur. J. Plant Pathol.*, 102: 237-245

**Trapero-Casas, A. and Kaiser, W. J.** 2007. Differences between ascospores and conidia of *Didymella rabiei* in spor germination and infection of chickpea. *Phytopathology*, 97: 1600-1607

**Wilson, A. D. and Kaiser, W. J.** 1995. Cytology and genetics of sexual incompatibility in *Didymella rabiei*. *Mycologia*, 87: 795-804

**Zachos, D. G., C. G. Panagopoulos and S. A. Makris.** 1963. Recherches sur la biologie, l'épidémiologie et la lutte contre l'antracnose du pois-chiche. *Ann. Inst. Phytopathol. Benaki, N.S.* 5: 167-192