

Rozprawa doktorska pt.:

Charakterystyka wybranych populacji *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary i ocena odporności różnych typów odmian rzepaku ozimego (*Brassica napus* L.) na tego patogena.

Promotor: prof. dr hab. Zbigniew Weber
Promotor pomocniczy: dr Marcin Matuszczak

STRESZCZENIE

Sclerotinia sclerotiorum jest jednym z najgroźniejszych patogenów rzepaku, powodującym chorobę zwaną zgnilizną twardzikową. Grzyb ten poraża również około 400 innych gatunków roślin dwuliściennych i charakteryzuje się dużą zmiennością. Celem badań była charakterystyka populacji *S. sclerotiorum* występujących w trzech miejscowościach. Badania dotyczyły wytwarzania kwasu szczawiowego oraz molekularnej zmienności genetycznej tego patogena pochodzącego z rzepaku, a także oceny odporności na niego trzech typów odmian rzepaku ozimego.

Materiał badawczy stanowiły izolaty *S. sclerotiorum* zebrane w latach 2012 – 2014, z trzech lokalizacji: Małyszyna (województwo lubuskie), Borowa (województwo wielkopolskie) i Bąkowa (województwo opolskie) oraz dziesięciu różnych odmian rzepaku ozimego. Do badania odporności odmian na *S. sclerotiorum* wykorzystano siedem izolatów patogena (01MAL/09, 31MAL/09, 04BOR/09, 24BOR/09, 05BAK/09, 24BAK/09 i S.s.-3) wcześniej scharakteryzowanych pod względem produkcji kwasu szczawiowego oraz potwierdzonej przynależności gatunkowej (analiza sekwencji regionu ITS).

Stwierdzono duże zróżnicowanie izolatów *S. sclerotiorum* pod względem zdolności wytwarzania kwasu szczawiowego. W każdej miejscowości znajdowały się izolaty grzyba produkujące duże i małe ilości tego kwasu. Corocznie oceniano poziom produkcji kwasu szczawiowego w warunkach *in vitro* przez siedem izolatów *S. sclerotiorum* wykorzystywanych do oceny stopnia odporności odmian rzepaku. Wykazano występowanie zmienności tej cechy u tych izolatów w latach 2012 – 2014. Tylko izolat 31MAL/09 odznaczał się zawsze podobnym, niskim poziomem wytwarzania kwasu szczawiowego. Dodatkowo przeprowadzona analiza korelacji Pearsona wykazała na płytkach Petriego niemal pełną zależność między wielkością kolonii *S. sclerotiorum* pochodzących z 2014 roku i powstałych przebarwień pod wpływem wydzielanego kwasu przez te kolonie.

Analizy molekularne z wykorzystaniem markerów RAPD oraz mikrosatelitarnych potwierdziły zróżnicowanie między badanymi izolatami *S. sclerotiorum* na poziomie DNA. Na podstawie analizy RAPD oraz wykorzystania miary podobieństw według Nei i Li stwierdzono grupy podobieństw dla izolatów grzyba pochodzących z tej samej miejscowości. Jednak analiza wariancji molekularnej (AMOVA) wykazała między

izolatami z różnych miejscowości niski poziom różnic wynoszący 4 – 13% w zależności od roku. Analizy z wykorzystaniem markerów mikrosatelitarnych oraz utworzony dendrogram na podstawie miary podobieństw Nei i Li ukazały bardzo duże zróżnicowanie między badanymi izolatami *S. sclerotiorum*, a dodatkowo przeprowadzona analiza wariacji molekularnej (AMOVA) wykazała 100% zróżnicowanie w obrębie populacji grzyba z danych miejscowości.

Odmiany rzepaku ozimego każdego roku ulegały porażeniu przez wybrane izolaty *S. sclerotiorum*. Różnice w stopniu porażenia roślin jednak nie były istotne statystycznie. Izolat 31MAL/09, który wytwarzał najmniej kwasu szczawowego okazał się najmniej patogogeniczny. Dodatkowo jednoznacznie stwierdzono wpływ poziomu produkcji kwasu szczawowego przez izolaty *S. sclerotiorum* na chorobotwórczość wobec roślin rzepaku. Współczynnik korelacji Pearsona dla powyższych cech był niemal pełny w 2012 roku ($r = 0,95$) i bardzo wysoki w latach 2013 ($r = 0,73$) oraz 2014 ($r = 0,82$).

Porażenia roślin rzepaku w bardzo dużym stopniu zależały od sumy opadów oraz temperatury w okresie siedmiu dni od ich inokulacji wybranymi izolatami *S. sclerotiorum*. Analiza korelacji wykazała dodatnią, bardzo wysoką zależność między sumą tygodniowych opadów od momentu inokulacji, a stopniem porażenia rzepaku ($r = 0,79$), natomiast dla temperatur w tym okresie i stopnia porażenia stwierdzono niemal pełną korelację ujemną ($r = -0,98$).

Przeprowadzone badania potwierdzają istnienie różnorodności i zmienności genetycznej populacji *S. sclerotiorum* oraz niestety niski poziom odporności na tego patogena ocenianych 10 odmian rzepaku ozimego.

Doctoral thesis entitled

Characterisation of selected *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary populations and evaluation of different winter rapeseed (*Brassica napus* L.) varieties types of resistance to this pathogen.

Summary

Sclerotinia sclerotiorum is one of the most serious rapeseed pathogens which causes its disease known as sclerotinia stem rot. This fungus also affects about 400 other species of dicotyledonous plants and is characterised by considerable variability. The aim of the investigation was characterisation of *S. sclerotiorum* populations in three different places. The performed experiments focused on oxalic acid production by this pathogen and its genetic molecular variability derived from rapeseed as well as on the evaluation of three types of winter rapeseed cultivars resistance to the pathogen.

The experimental material comprised ten different winter rapeseed cultivars as well as *S. sclerotiorum* isolates collected in years 2012 – 2014 from the following three locations: Małyszyn (Lubuskie Voivodeship), Borowo (Wielkopolska Voivodeship) and Bąków (Opole Voivodeship). The following seven isolates of the pathogen (01MAL/09, 31MAL/09, 04BOR/09, 24BOR/09, 05BAK/09, 24BAK/09 and S.s.-3) were employed to investigate the resistance of rapeseed cultivars to *S. sclerotiorum*. They were earlier characterised with regard to oxalic acid production and confirmed genetic affiliation (DNA ITS).

It was determined significant variability of *S. sclerotiorum* isolates with respect to their ability to produce oxalic acid. In each site, there were fungal isolates which produced high and low quantities of this acid. Every year, the author evaluated, in *in vitro* conditions, levels of oxalic acid production by seven *S. sclerotiorum* isolates utilised for the assessment of the degree of resistance of rapeseed cultivars. It was demonstrated that the above characteristic in the examined isolates varied in years 2012-2014. Only isolate 31MAL/90 was always characterised by a similar, low level of the oxalic acid production. In addition, the performed Pearson's correlation analysis showed, on Petri dishes, almost total dependence between the size of *S. sclerotiorum* colonies derived from 2014 and the developed discolorations under the influence of the acid secreted by these colonies.

Molecular analyses employing RAPD and microsatellite markers corroborated differences between the examined *S. sclerotiorum* isolates at the DNA level. On the basis of RAPD analysis and employing the measure of similarities according to Nei and Li, similarity groups were established for fungal isolates derived from the same site. However, the analysis of molecular variance (AMOVA) carried out between isolates derived from different site demonstrated a low level of differences ranging from 4 to 13%, depending on the year. Analyses utilising microsatellite markers as well as the plotted dendrogram on the basis of the measure of similarities according to Nei and Li showed very strong variability between the examined *S. sclerotiorum* isolates and, in addition, the performed analysis of molecular variance (AMOVA) revealed 100% variability within fungal populations derived from given sites.

Every year, ten cultivars of winter rapeseed were inoculated by the selected *S. sclerotiorum* isolates. However, differences in the degree of plant infection were not statistically significant. The 31MAL/09 isolate, which produced the smallest quantities of oxalic acid, turned out to be the least pathogenic. Moreover, it was demonstrated unequivocally that the level of oxalic acid produced by *S. sclerotiorum* isolates influenced pathogenicity towards rapeseed plants. Pearson's coefficient for the above traits was almost full in 2012 ($r = 0.95$) and very high in 2013 ($r = 0.73$) and 2014 ($r = 0.82$)

The infection of the rapeseed plants depended, to a large extent, on total precipitation and temperature during seven days following their inoculation with the selected *S. sclerotiorum* isolates. The performed correlation analysis revealed high dependence between the sum of weekly precipitation from the moment of inoculation and the degree of rapeseed infection ($r = 0.79$), whereas in the case of temperatures during this period and the degree of infection – negative, nearly complete correlation ($r = -0.98$) was obtained.

The discussed experiments confirmed the existence of genetic diversity and variability of *S. sclerotiorum* populations and, unfortunately, a low level of resistance to this pathogen of the 10 evaluated winter rapeseed cultivars.

mgr inż. Elżbieta Starzycka-Korbas