

INSTYTUT HODOWLI I AKLIMATYZACJI ROŚLIN  
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY  
ODDZIAŁ W POZNANIU

Elżbieta Starzycka-Korbas

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

**AUTOREFERAT**

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem:  
promotora prof. dr hab. Zbigniewa Webera  
promotora pomocniczego dr Marcina Matuszczaka

Recenzenci:

prof. dr hab. Marek Korbas  
dr hab. Dariusz Pańka prof. nadzw.

**POZNAŃ 2018**

## Wstęp

Rzepak jest ważną rośliną uprawną w Polsce – zajmuje około 900 tysięcy hektarów. Roślina ta jest naturalnym amfidiploidem, należy do rodziny kapustowatych (*Brassicaceae*), plemienia kapustne (*Brassiceae*), rodzaju kapusta (*Brassica*). Podwójnie ulepszone odmiany pozbawione związków antyżywnościowych stały się źródłem pełnowartościowego, zdrowego oleju, a także cenną paszą dla zwierząt, zawierającą około 40% białka w suchej masie (Muśnicki 1997). Zauważalny wzrost produkcji rzepaku w naszym kraju nastąpił po akcesji Polski do Unii Europejskiej w wyniku promocji wykorzystania oleju do produkcji biopaliw.

W uprawie rzepaku największe szkody wyrządzają patogeny, takie jak: *Leptosphaeria* spp., *Sclerotinia sclerotiorum*, *Alternaria* spp. *Plasmodiophora brassicae*.

Zgnilizna twardzikowa powodowana przez *Sclerotinia sclerotiorum* to jedna z najgroźniejszych chorób rzepaku ozimego. Coroczne występowanie *S. sclerotiorum* przyczynia się do znacznych strat w plonie na plantacjach rzepaku ozimego.

*S. sclerotiorum* występuje na całym świecie. Grzyb ten poraża 408 gatunków z 75 rodzin roślin dwuliściennych. (Boland, Hall 1994). W uprawach rzepaku z roślin porażonych uzyskuje się nasiona małe, słabo wykształcone, tzw. pośladowe (Krüger 1973, 1980, Morrall i in. 1976). Na niechronionych plantacjach rzepaku w latach sprzyjających rozwojowi *S. sclerotiorum* straty plonu mogą sięgać do 70% (Korbas i in. 2015).

Objawy zgnilizny twardzikowej na rzepaku najczęściej obserwuje się na liściach i łodygach. Na początku białoszare plamy widoczne są na liściach, a później białe lub białoszare, współśrodkowo strefowane przebarwienia występują na części obwodu lub całym obwodzie łodyg oraz niekiedy także łuszczyn. Silnie porażone rośliny przedwcześnie zamierają. W kolejnym etapie wewnątrz łodyg i łuszczyn, a w warunkach wysokiej wilgotności powietrza także na ich powierzchni występuje obfity biały nalot grzybni i czarne sklerocja (Kryczyński, Weber 2011).

W procesie chorobowym dużą rolę odgrywa wydzielany przez patogena kwas szczawiowy. We wczesnych fazach infekcji kwas szczawiowy gromadzi się w zainfekowanych tkankach zmniejszając pozakomórkowe pH do około 4-5. Obniżone pH przyczynia się do zwiększenia aktywności enzymów degradujących ścianę komórkową (Bateman, Beer 1965; Marciano i in. 1983; Maxwell, Lumsden 1970).

Wytwarzaniu kwasu szczawiowego towarzyszy chelatacja jonów wapnia  $\text{Ca}^{2+}$  i związków pektynowych zawartych w ścianie komórkowej (Smith i in. 1986).

Na rolę jaką odgrywa kwas szczawiowy w patogenezie wskazuje fakt, że mutanty *S. sclerotiorum* pozbawiane zdolności do wytwarzania kwasu szczawiowego nie są patogeniczne nawet przy pełnej aktywności enzymów degradujących ścianę komórkową. Mutanty te po odzyskaniu zdolności do wytwarzania kwasu szczawiowego stają się ponownie patogeniczne (Godoy i in. 1990).

Zasady integrowanej ochrony roślin (dyrektywa UE obowiązująca od roku 2014) ograniczają stosowanie chemicznych środków w ochronie roślin przed agrofagami. Dlatego w ochronie rzepaku przed zgnilizną twardzikową ważne jest stosowanie kwalifikowanego materiału siewnego pozbawionego sklerocjów *S. sclerotiorum* oraz różnego rodzaju zaleceń agrotechnicznych. Ważnym elementem ochrony przed zgnilizną twardzikową jest stosowanie preparatów zawierających antagonistyczne mikroorganizmy (*Coniothyrium minitans*, *Pseudomonas chloraphis*).

Istotną rolę w ograniczaniu porażania roślin rzepaku przez *S. sclerotiorum* powinna odgrywać hodowla odpornościowa i uprawa odmian o znacznym stopniu odporności. Niestety do tej pory nie udało się wyhodować odmiany rzepaku całkowicie odpornej na tego patogena, ale badania zmierzające do osiągnięcia tego celu są cały czas podejmowane w różnych ośrodkach badawczych (Chen i in. 2007; Starzycka i in. 2009; Delourme i in. 2011; Ding i in. 2013; Uloth i in. 2013; Mei i in. 2013; Uloth i in. 2014; Taylor i in. 2015).

## **Cel pracy**

Celem pracy była charakterystyka populacji *S. sclerotiorum* występujących na terenie Polski, na przykładzie trzech miejscowości o zróżnicowanych warunkach agroklimatycznych, to jest w Borowie (52.12N, 16.79E) w województwie wielkopolskim, Małyszynie (52.74N, 15.17E) w województwie lubuskim i Bąkowie (50.96N, 18.31E) w województwie opolskim oraz ocena odporności różnych typów odmian rzepaku ozimego na tego patogena.

Populację *S. sclerotiorum* scharakteryzowano na poziomie fenotypowym oceniając ilość wytwarzanego kwasu szczawiowego przez badane izolaty patogena oraz na poziomie molekularnym badając zmienność genetyczną wybranych izolatów

metodami RAPD (ang.: *Random Amplified Polymorphic DNA*) i SSR (ang.: *Simple Sequence Repeats*).

## **Materiały i Metody**

Materiał do badań stanowiły populacje patogenicznego grzyba *S. sclerotiorum* zebrane w latach 2012-2014, w trzech miejscowościach: w Małyszynie (województwo lubuskie) – 94 izolaty, w Borowie (województwo wielkopolskie) – 59 izolatów i w Bąkowie (województwo opolskie) – 75 izolatów oraz wybrane odmiany rzepaku ozimego badane w doświadczeniu polowym prowadzonym w Małyszynie. Poza charakteryzowaniem izolatów *S. sclerotiorum* do oceny odporności wybranych odmian rzepaku ozimego na *S. sclerotiorum* użyto siedem izolatów tego patogena: 01MAL/09 i 31MAL/09 (z Małyszyna), 04BOR/09 i 24BOR/09 (z Borowa), 05BAK/09 i 24BAK/09 (z Bąkowa). Do wymienionych sześciu izolatów dołączono izolat S.s.-3 *S. sclerotiorum*, pochodzący z pól doświadczalnych w Poznaniu, wykorzystywany od 1998 roku do testów odpornościowych linii i odmian rzepaku ozimego, o oznaczonym wcześniej poziomie wytwarzania kwasu szczawiowego i zsekwencjonowanym fragmencie ITS (*Internal Transcribed Spacer*) (Starzycka i in., 1998).

Stopień odporności na *S. sclerotiorum* oceniano u dziesięciu odmian rzepaku ozimego o dużym zasięgu uprawy w okresie prowadzonych badań. Wybrano sześć odmian populacyjnych: Bogart, Californium, Bojan, Adriana i Cabriolet, Monolit - odmianę otrzymaną z linii podwojonych haploidów (DH) oraz cztery odmiany heterozyjne F<sub>1</sub>: Poznaniak, DK Example, Gladius i Vectra. Wszystkie odmiany według ich autorów i badań Centralnego Ośrodka Badań Odmian Roślin Uprawnych (COBORU) odznaczają się średnim stopniem odporności na tego patogena.

W laboratorium, w poszczególnych latach po wyizolowaniu czystych kultur *S. sclerotiorum* oceniano ich zdolność do wytwarzania kwasu szczawiowego. Na przygotowane wcześniej płytki Petriego o średnicy 90 mm z pożywką PDA z dodatkiem indykatora kwasowości (zieleni bromokrezolowej w ilości 100 mg / 1 litr pożywki) w warunkach aseptycznych przenoszono fragment pożywki o średnicy około 5 mm z grzybnią dziesięciodniowej kolonii patogena. Inkubację kultur prowadzono w klimatyzowanym pomieszczeniu przy temperaturze 18°C z dostępem światła. Po 48 godzinach od założenia doświadczenia w czterech powtórzeniach mierzono średnicę przebarwień powstałych w wyniku wytwarzania kwasu szczawiowego przez

rozrastające się strzępki grzyba *S. sclerotiorum*. Otrzymane wyniki opracowano i uszeregowano za pomocą testu Duncana. Podobne czynności wykonywano dla 7 izolatów *S. sclerotiorum* wykorzystywanych do inokulacji roślin rzepaku ozimego.

Izolaty *S. sclerotiorum* uzyskane w 2014 roku posłużyły do badań zależności między wielkością kolonii izolatów patogena i powstającymi przebarwieniami pod wpływem wytwarzania kwasu szczawowego na pożywce z indykatorem kwasowości. Po 48 godzinach prowadzenia hodowli izolatów na pożywce PDA z zielenią bromokrezolową, mierzono średnice kolonii *S. sclerotiorum* oraz średnice powstałych przebarwień. Otrzymane wartości posłużyły do oceny korelacji między tymi cechami przy użyciu programu STATISTICA 9.

Do oceny zmienności genetycznej izolatów *S. sclerotiorum* zgromadzonych w latach 2012-2014 i siedmiu izolatów *S. sclerotiorum* wybranych do oceny stopnia odporności różnych typów odmian rzepaku ozimego wykorzystano analizę RAPD (Welsh i McClelland 1990; Williams i in. 1990) oraz analizę z wykorzystaniem markerów mikrosatelitarnych SSR (Litt, Luty 1989; Akkaya i in. 1992; Atallah i in. 2004). Badania polimorfizmu obejmowały: izolację genomowego DNA izolatów *S. sclerotiorum*, przeprowadzenie PCR (ang.: *Polymerase Chain Reaction*) z 12 starterami RAPD firmy Operon i rozdział produktów przy pomocy elektroforezy w żelu agarozowym, a także PCR z 8 parami starterów SSR (Applied Biosystem) połączonych w dwa multipleksy (Atallah i in., 2004) i rozdział produktów za pomocą sekwenatora. Analizie z wykorzystaniem markerów mikrosatelitarnych poddano izolaty *S. sclerotiorum* z 2014 roku i izolaty wybrane do oceny stopnia odporności odmian rzepaku ozimego.

Otrzymane dane dotyczące polimorfizmu produktów amplifikacji za pomocą metody RAPD oraz amplifikowane fragmenty PCR z loci mikrosatelitów rozcieńczone dwudziestosześcioletnie i rozdzielone metodą elektroforezy kapilarnej wykorzystując sekwenator - Applied Biosystems, Genetic Analyser 3130xl z kapilarami o długości 36 cm, ze standardem wielkości Gene Scan 600 LIZ i odczytane przy pomocy Peak Scanner Software v1.0 firmy Applied Biosystems, posłużyły do analiz statystycznych:

- podobieństw metodą Nei & Li (1979);
- wariancji molekularnej (AMOVA).

Badania molekularne z wykorzystaniem markerów mikrosatelitarnych przeprowadzono na Wydziale Biologii (Wydziałowa Pracownia Technik Biologii Molekularnej) Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Doświadczenia polowe z wybranymi typami odmian rzepaku ozimego przeprowadzono w kolejnych trzech sezonach wegetacyjnych począwszy od sezonu 2011/2012, na polach uprawnych należących do Spółki Hodowli Roślin Strzelce Grupa IHAR, Oddział w Małyszynie. Odmiany rzepaku wysiewano w czterech powtórzeniach na poletkach doświadczalnych o powierzchni 1,2 m<sup>2</sup>.

W celu oceny poziomu odporności wybranych typów odmian rzepaku ozimego zakażano rośliny wcześniej przygotowanym inokulum, które stanowiły ziarniaki żyta zaszczerpione fragmentami grzybni wybranego do inokulacji izolatu *S. sclerotiorum*.

W fazie opadania pierwszych płatków kwiatowych rzepaku zakażano odpowiednim izolatem *S. sclerotiorum* po 10 roślin (powtórzeń) każdej z 10 odmian. Przerośnięty grzybnią ziarniak żyta umieszczano w połowie wysokości łodyg roślin i owijano je w tym miejscu folią aluminiową. Inokulację w 2012 roku przeprowadzono 10 maja, w 2013 roku – 16 maja, a w 2014 roku – 6 maja.

Po trzech tygodniach od inokulacji oceniano stopień porażenia zakażonych roślin rzepaku w trójstopniowej skali: 0 – brak porażenia; 1 – średnie porażenie (plama infekcyjna nie obejmuje całego obwodu łodygi); 2 – silne porażenie (rozległa plama infekcyjna obejmująca cały obwód łodygi). Uzyskane dane posłużyły do obliczeń indeksów porażenia (IP), przy użyciu wzoru Townsenda-Heubergera (1943).

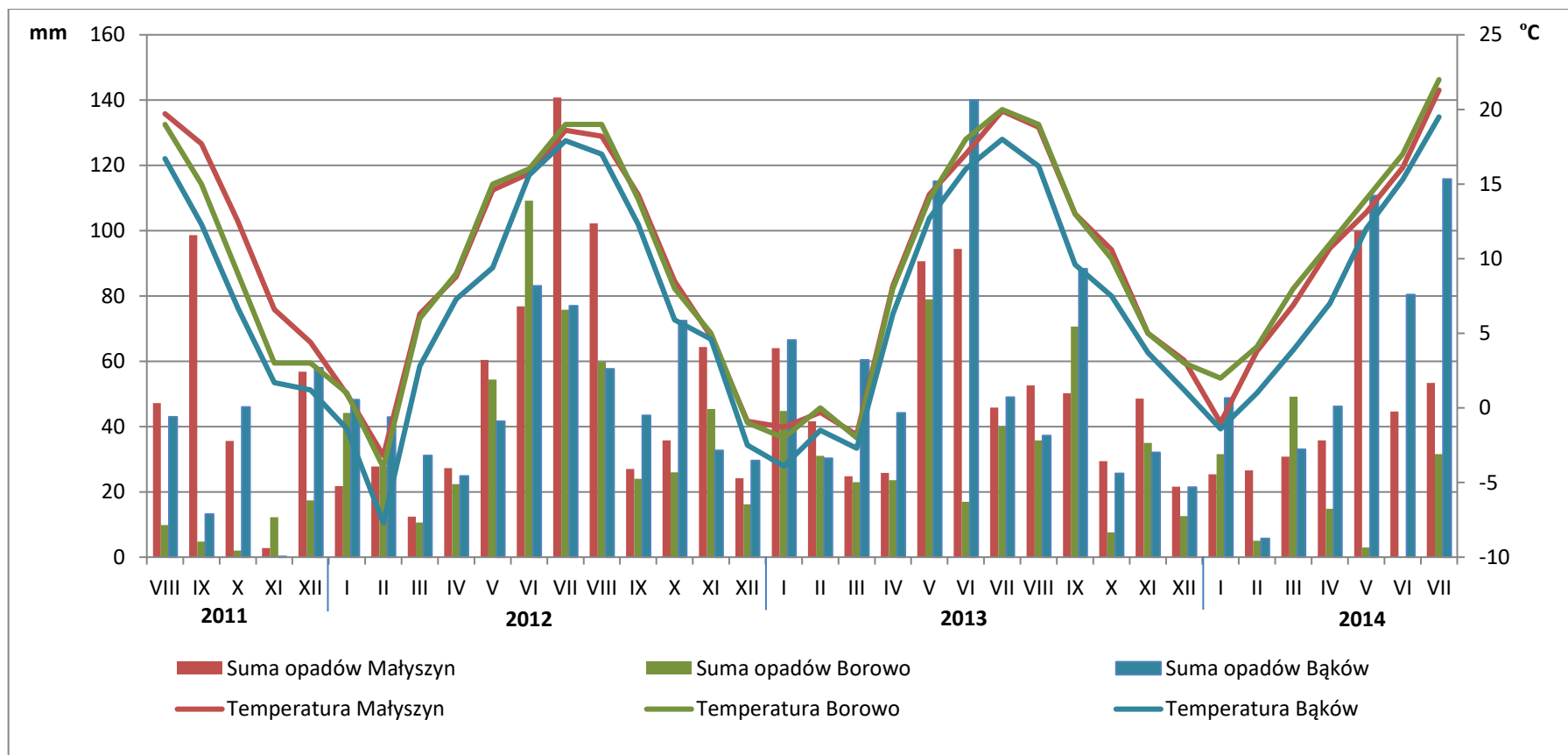
Po ocenie stopnia porażenia roślin przez izolaty: 01MAL, 31MAL, 04BOR, 24BOR, 05BAK, 24BAK, S.s.-3, zbierano wszystkie wcześniej inokulowane przez *S. sclerotiorum* łodygi i podsuszano. Następnie z miejsca zakażenia przy pomocy sterylnego skalpela, odcinano 15 fragmentów porażonej tkanki i umieszczano na płytkach Petriego z pożywką PDA. Po kilkukrotnym pasażowaniu przenoszono fragment kolonii każdego izolatu (w siedmiu powtórzeniach) na płytki Petriego z pożywką PDA i dodatkiem indykatora kwasowości – zieleni bromokrezolowej. Po 48 godzinach od założenia doświadczenia mierzono średnice przebarwień powstałych w wyniku wytwarzania kwasu szczawiowego przez rozrastającą się grzybnię *S. sclerotiorum*.

Otrzymane wyniki zostały opracowane przy pomocy programu STATISTICA 9, wykorzystując analizę korelacji porównano średnice przebarwień ze średnim indeksem porażenia rzepaku ozimego przez dany izolat.

## **Dane meteorologiczne**

Dane meteorologiczne: temperaturę i sumę opadów uzyskano ze stacji meteorologicznych zlokalizowanych w Małyszynie, Borowie i Bąkowie. Na rycinie 1 przedstawiono warunki pogodowe w poszczególnych miejscowościach podczas prowadzenia badań polowych w sezonach wegetacyjnych od sierpnia 2011 r. do lipca 2014 r.

Okres siedmiu dni po inokulacji w Małyszynie, gdzie oprócz poszukiwania izolatów *S. sclerotiorum* prowadzono doświadczenie polowe, charakteryzował się umiarkowaną średnią temperaturą na poziomie 14,1°C w 2012 r. i 13,3°C w 2014 r. Znacznie cieplejszy był ten okres w roku 2013, kiedy średnia tygodniowa temperatura wyniosła 18,0°C. Chłodny tydzień po inokulacji roślin rzepaku w latach 2012 i 2014 łączył się z większą niż w roku 2013 sumą opadów w tym czasie. W roku 2013, kiedy okres siedmiu dni po inokulacji był najcieplejszy, charakteryzował się jednocześnie najmniejszymi opadami na poziomie 5,4 mm.



Ryc. 1. Warunki meteorologiczne odnotowane w okresie prowadzenia doświadczeń w Małyszynie, Borowie i Bąków



## **Wyniki i dyskusja**

### **Wytwarzanie kwasu szczawiowego przez izolaty *S. sclerotiorum* z lat 2012 – 2014**

W przedstawionej pracy w każdym z trzech lat badań stwierdzano duże zróżnicowanie w produkcji kwasu szczawiowego przez poszczególne izolaty *S. sclerotiorum*, w testach na płytkach Petriego z pożywką PDA z dodatkiem indykatora kwasowości. W 2012 r. wśród 57 izolatów patogena stwierdzono 26 grup jednorodnych, w roku 2013 wśród 75 badanych izolatów grzyba zanotowano 27 grup jednorodnych, a w roku 2014 analizowano 96 izolatów *S. sclerotiorum*, wśród których wyszczególniono 40 grup jednorodnych. Średnice przebarwień powstałych w wyniku wytwarzania kwasu szczawiowego przez wszystkie izolaty patogena w trzech kolejnych latach przedstawiają tabele (Tab. 1 – 3).

Bardzo duże zróżnicowanie izolatów w wytwarzaniu kwasu szczawiowego przez *S. sclerotiorum* odnotowano także w badaniach prowadzonych na innym materiale roślinnym (Starzycka i in. 2002; Durman i in. 2005; Starzycka i Starzycki 2011; Mo i in. 2007; Li i in. 2008b; EL-Argawy 2012).

W badaniach Mo i in. (2007), którzy przeanalizowali 160 izolatów *S. sclerotiorum* z różnych części świata (71 izolatów z Chin, 39 – z Kanady, 20 – z USA i 30 - z Anglii) stwierdzono duże ich zróżnicowanie nie tylko pod względem wytwarzania kwasu szczawiowego. Różniły się one również szybkością wzrostu liniowego grzybni, liczbą wytwarzanych sklerocjów i agresywnością. Dodatkowo zaobserwowano dodatnią korelację między stężeniem wytwarzanego kwasu szczawiowego w początkowej fazie rozwoju patogena, a jego agresywnością.

Tab. 1. Ocena zdolności do wytwarzania kwasu szczawiowego w warunkach *in vitro* przez izolaty *S. sclerotiorum* wyizolowane w roku 2012

Izolaty	Średnica przebarwień [mm] pożywki pod wpływem wytworzonego kwasu szczawiowego	Grupy jednorodne
45MAL/12	42,5	
40MAL/12	39,5	
06BAK/12	37,5	
28MAL/12	36,0	
41MAL/12	35,0	
23MAL/12	35,0	
18MAL/12	33,0	
15MAL/12	32,5	
27MAL/12	32,5	
33MAL/12	32,0	
19MAL/12	31,0	
34MAL/12	30,5	
29MAL/12	30,0	
11MAL/12	30,0	
20MAL/12	29,0	
26MAL/12	27,5	
14MAL/12	26,5	
02BAK/12	26,0	
01MAL/12	25,5	
02MAL/12	25,0	
49MAL/12	25,0	
05BAK/12	25,0	
06MAL/12	25,0	
24MAL/12	25,0	
30MAL/12	24,5	
03BAK/12	24,5	
08BOR/12	24,5	
19MAL/12	24,0	
07MAL/12	23,0	
04MAL/12	22,5	
03BOR/12	22,5	
10BOR/12	22,5	
08MAL/12	22,0	
48MAL/12	21,5	
12MAL/12	21,5	
03MAL/12	21,5	
39MAL/12	20,5	
04BAK/12	20,5	
05MAL/12	20,5	
52MAL/12	20,0	
01BOR/12	20,0	
16MAL/12	20,0	
07BOR/12	19,5	
10BAK/12	19,0	
05BOR/12	18,5	
02BOR/12	18,0	
06BOR/12	18,0	
10MAL/12	17,0	
12BAK/12	17,0	
09BOR/12	16,5	
37MAL/12	16,5	
08BAK/12	15,5	
09MAL/12	15,5	
04BOR/12	15,0	
07BAK/12	15,0	
09BAK/12	14,5	
11BAK/12	14,0	

NIR<sub>0,05</sub> 2,539459

Pochodzenie izolatów: MAL – Małyszyn, BAK – z Bąków, BOR – Borowo

Tab. 2. Ocena zdolności do wytwarzania kwasu szczawiowego w warunkach *in vitro* przez izolaty *S. sclerotiorum* wyizolowane w roku 2013

Izolat	Średnica przebarwień [mm] pożywki pod wpływem wytworzonego kwasu szczawiowego	Grupy jednorodne	Izolat	Średnica przebarwień [mm] pożywki pod wpływem wytworzonego kwasu szczawiowego	Grupy jednorodne
08 BOR/13	45,50		35 BAK/13	30,50	
55 BAK/13	45,00		38 BAK/13	30,50	
03 BOR/13	44,50		59 BAK/13	30,50	
20 MAL/13	43,50		16 MAL/13	30,50	
16 BOR/13	43,00		32 BAK/13	30,00	
22 BOR/13	43,00		29 MAL/13	30,00	
09 BAK/13	42,50		07MAL/13	29,50	
19 MAL/13	41,50		11 BOR/13	29,50	
49 BAK/13	40,50		60 BAK/13	29,00	
28 BOR/13	40,00		29 BAK/13	28,00	
18 BAK/13	40,00		20 BOR/13	27,00	
53 BAK/13	39,50		04MAL/13	27,00	
47 BAK/13	38,00		13 BAK/13	27,00	
41 BAK/13	37,50		24 MAL/13	26,50	
06 BOR/13	37,00		10 BOR/13	26,00	
07 BAK/13	36,50		17 MAL/13	26,00	
02 BOR/13	36,50		52 BAK/13	26,00	
45 BAK/13	36,50		21 BOR/13	25,50	
40 BAK/13	36,00		15 BAK/13	25,50	
23 BOR/13	35,50		14 BOR/13	25,50	
22 MAL/13	35,50		08 MAL/13	25,50	
05 BOR/13	35,00		37 BAK/13	25,50	
04 BOR/13	35,00		58 BAK/13	25,00	
28 MAL/13	35,00		02 BAK/13	25,00	
01 MAL/13	35,00		27 BAK/13	25,00	
03 MAL/13	34,50		17 BAK/13	24,50	
54 BAK/13	34,50		27 BOR/13	23,50	
11 MAL/13	33,50		18 BOR/13	23,00	
18 MAL/13	33,50		15 BOR/13	23,00	
11 BAK/13	33,50		26 MAL/13	23,00	
02 MAL/13	32,00		27 MAL/13	23,00	
26 BOR/13	32,00		44 BAK/13	22,50	
09 MAL/13	32,00		33 BAK/13	21,50	
19 BOR/13	31,50		21 BAK/13	20,50	
01 BOR/13	31,00		13 MAL/13	20,00	
25 BOR/13	31,00		42 BAK/13	18,50	
14 MAL/13	30,50		46 BAK/13	15,00	
04 BAK/13	30,50				
NIR <sub>0,05</sub> 1,864775			NIR <sub>0,05</sub> 1,864775		

Pochodzenie izolatów: MAL – Małyszyn, BAK – z Bąków, BOR – Borowo

Tab. 3. Ocena zdolności do wytwarzania kwasu szczawiowego w warunkach *in vitro* przez izolaty *S. sclerotiorum* wyizolowane w roku 2014

Izolat	Średnica przebarwień [mm] pożywki pod wpływem wytworzonego kwasu szczawiowego	Grupy jednorodne	Izolat	Średnica przebarwień [mm] pożywki pod wpływem wytworzonego kwasu szczawiowego	Grupy jednorodne
30BOR/14	72,00		44 MAL/14	30,00	
24 BAK/14	70,50		25 MAL/14	30,00	
14 BAK/14	70,00		17 MAL/14	29,50	
02 BAK/14	70,00		32 BAK/14	29,00	
03 BAK/14	70,00		22 BAK/14	28,50	
38 BOR/14	70,00		34 BOR/14	27,50	
08 BAK/14	69,50		22 BOR/14	27,50	
18 BAK/14	68,00		06 BOR/14	27,50	
10 BAK/14	68,00		21 BOR/14	26,50	
05 BAK/14	67,00		31 BAK/14	26,00	
16 BAK/14	66,50		27 BOR/14	26,00	
20 BAK/14	66,50		18 BOR/14	26,00	
40 BAK/14	66,00		24 MAL/14	25,50	
11 BAK/14	65,00		13 BOR/14	25,50	
04 BAK/14	65,00		04 MAL/14	24,50	
21 BAK/14	64,50		24 BOR/14	24,50	
25 BOR/14	62,50		16 MAL/14	24,50	
26 BAK/14	61,50		11 BOR/14	24,50	
06 BAK/14	61,50		28 BOR/14	24,00	
34 BAK/14	61,50		14 BOR/14	23,50	
19 BAK/14	61,00		03 MAL/14	23,00	
25 BAK/14	60,50		08 BOR/14	23,00	
28 BAK/14	60,50		30 MAL/14	22,00	
07 BAK/14	58,50		08 MAL/14	21,50	
30 BAK/14	57,50		05 MAL/14	21,50	
07 BOR/14	55,00		02 BOR/14	21,00	
38 BAK/14	52,00		35 MAL/14	21,00	
36 BAK/14	47,00		07 MAL/14	20,50	
14 MAL/14	47,00		38 MAL/14	20,00	
13 MAL/14	46,00		15 MAL/14	20,00	
12 MAL/14	46,00		36 BOR/14	20,00	
29 BAK/14	45,50		19 MAL/14	19,50	
01 MAL/14	44,00		20 BOR/14	19,50	
31 BOR/14	42,50		21 MAL/14	19,50	
10 MAL/14	42,00		35 BAK/14	19,50	
09 MAL/14	41,00		29 BOR/14	19,00	
37 MAL/14	36,50		33 MAL/14	19,00	
11 MAL/14	36,00		28 MAL/14	19,00	
39 MAL/14	35,50		05 BOR/14	19,00	
34 MAL/14	35,50		47 MAL/14	18,50	
22 MAL/14	35,50		23 BOR/14	18,50	
43 MAL/14	34,50		02 MAL/14	18,00	
35 MAL/14	34,00		29 MAL/14	18,00	
39 BAK/14	33,00		46 MAL/14	17,50	
42 BAK/14	33,00		45 MAL/14	17,00	
40 BOR/14	32,50		01 BOR/14	16,00	
50 MAL/14	31,50		26 BOR/14	15,50	
33 BAK/14	30,50		06 MAL/14	13,00	
NIR <sub>0,05</sub> 2,960			NIR <sub>0,05</sub> 2,960		

Pochodzenie izolatów: MAL – Małyszyn, BAK – z Bąków, BOR – Borowo

## Wytwarzanie kwasu szczawiowego przez siedem izolatów *S. sclerotiorum* wybranych do oceny stopnia odporności różnych typów odmian rzepaku ozimego

W 2012 roku największe średnice przebarwień pod wpływem wytwarzanego kwasu szczawiowego tworzyły izolaty 01MAL/09 (28,7 mm), 24BOR/09 (28,6 mm) i 24BAK/09 (25,5 mm), a najmniejsze średnice przebarwień wystąpiły w przypadku izolatów 31MAL/09 (15,2 mm) i S.s.-3 (16,3 mm) (Tab. 4). W 2013 roku izolatem, który charakteryzował się największą zdolnością do tworzenia przebarwień był 24BAK/09. Natomiast izolaty 31MAL/09, 04BOR/09, 24BOR/09 i S.s.-3 wytwarzały najmniejsze średnice przebarwień (Tab. 5). Jeszcze inaczej przedstawiało się wytwarzanie kwasu szczawiowego przez badanych siedem izolatów w roku 2014 (Tab. 6). W warunkach laboratoryjnych największe przebarwienia tworzył izolat 05BAK/09 (28,7 mm), a najmniejsze izolat 24BAK/09.

Średnie średnice przebarwień w latach 2012 – 2014 były istotnie większe u izolatów 01MAL/09, 05BAK/09 04BOR/09 i 24BAK/09, niż u izolatu 31MAL/09 (Tab.7).

Tab. 4. Średnice przebarwień powstałych pod wpływem wytwarzania kwasu szczawiowego przez wybrane izolaty *S. sclerotiorum* w 2012 roku

Średnice przebarwień [mm] wywołanych przez izolaty						
z Małyszyna		z Bąkowa		z Borowa		z Poznania
01MAL/09	31MAL/09	05BAK/09	24BAK/09	04BOR/09	24BOR/09	S.s.-3
28,7 (A)	15,2 (B)	17,5 (AB)	25,5 (A)	24,2 (AB)	28,6 (A)	16,3 (B)

NIR  $\alpha_{0,05}=11,32$

Tab. 5. Średnice przebarwień powstałych pod wpływem wytwarzania kwasu szczawiowego przez wybrane izolaty *S. sclerotiorum* w 2013 roku

Średnice przebarwień [mm] wywołanych przez izolaty						
z Małyszyna		z Bąkowa		z Borowa		z Poznania
01MAL/09	31MAL/09	05BAK/09	24BAK/09	04BOR/09	24BOR/09	S.s.-3
15,6 (CD)	11,3 (D)	20,7 (B)	25,5 (A)	14,8 (D)	11,7 (D)	14,1 (D)

NIR  $\alpha_{0,05}=4,96$

Tab. 6. Średnice przebarwień powstałych pod wpływem wytwarzania kwasu szczawiowego przez wybrane izolaty *S. sclerotiorum* w 2014 roku

Średnice przebarwień [mm] wywołanych przez izolaty						
z Małyszyna		z Bąkowa		z Borowa		z Poznania
01MAL/09	31MAL/09	05BAK/09	24BAK/09	04BOR/09	24BOR/09	S.s.-3
23,00 (B)	14,17 (D)	28,67 (A)	10,17 (E)	23,00 (B)	20,17 (C)	13,00 (D)

NIR  $\alpha_{0,05}=2,27$

Tab. 7. Średnie średnice przebarwień powstałych pod wpływem wytwarzania kwasu szczawiowego przez wybrane izolaty *S. sclerotiorum* w latach 2012 - 2014

Średnice przebarwień [mm] wywołanych przez izolaty						
z Małyszyna		z Bąkowa		z Borowa		z Poznania
01MAL/09	31MAL/09	05BAK/09	24BAK/09	04BOR/09	24BOR/09	S.s.-3
22,4 (A)	13,6 (C)	22,3 (A)	20,4 (A)	20,7 (A)	20,2 (AB)	14,5 (BC)

NIR  $\alpha_{0,05}=6,04$

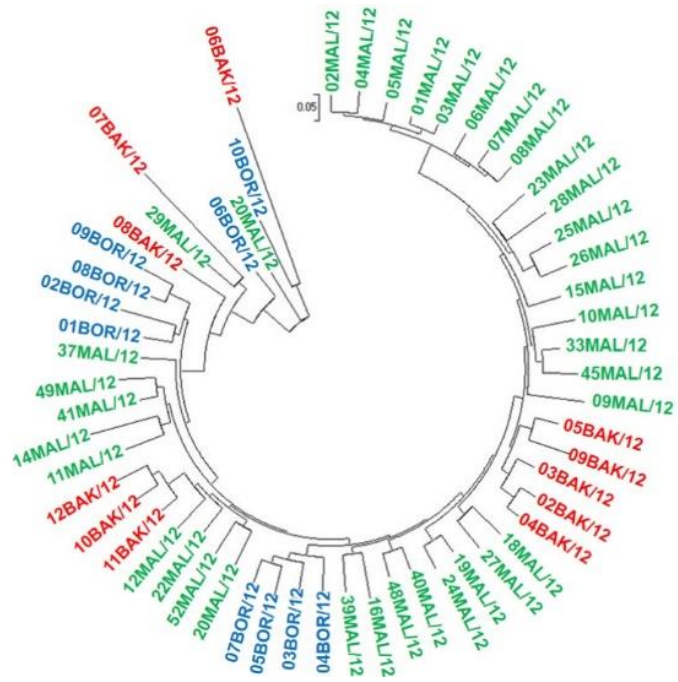
**Zależność między wielkością kolonii izolatów *S. sclerotiorum* z 2014 roku i powstających przebarwień pod wpływem wytwarzanego przez te izolaty kwasu szczawiowego**

Izolaty *S. sclerotiorum* pozyskane w 2014 roku poddano ocenie zależności między wielkością ich kolonii, a wielkością przebarwień pożywki pod wpływem kwasu szczawiowego. Otrzymane wyniki poddano analizie korelacji Pearsona. Stwierdzono, że między średnicami kolonii i średnicami przebarwień istnieje niemal pełna korelacja. Współczynniki korelacji wynoszą dla izolatów pochodzących: z Małyszyna  $r = 0,994348$ , z Borowa  $r = 0,998846$  i z Bąkowa  $r = 0,999507$ . Większym średnicom kolonii towarzyszyły odpowiednio większe średnice przebarwienia pożywki.

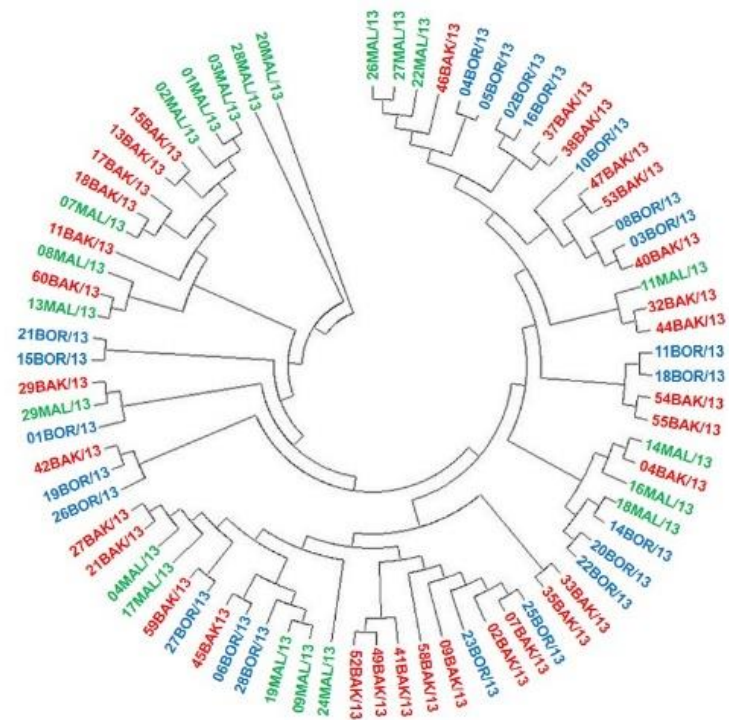
**Analiza podobieństw izolatów *S. sclerotiorum* uzyskanych z trzech miejscowości w latach 2012 – 2014 na podstawie polimorfizmu produktów amplifikacji metodą RAPD**

Uzyskane produkty amplifikacji z dwunastoma starterami RAPD dla izolatów *S. sclerotiorum* otrzymanych w latach 2012 – 2014 poddano analizie podobieństw według Nei & Li, a następnie wykreślono dendrogram podobieństw (Ryc. 2 - 4).

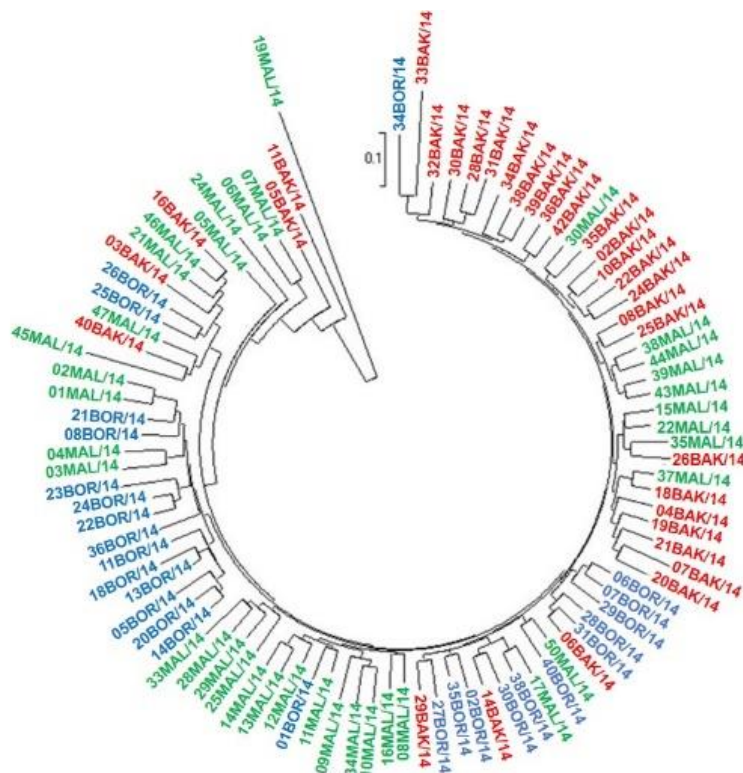
Na podstawie otrzymanych wyników w trzech kolejnych latach stwierdzono duże podobieństwo między izolatami patogena pochodzącymi z tej samej miejscowości.



Ryc. 2. Dendrogram podobieństwa na podstawie polimorfizmu produktów amplifikacji metodą RAPD izolatów *S. sclerotiorum* uzyskanych z trzech miejscowości w 2012



Ryc. 3. Dendrogram podobieństwa na podstawie polimorfizmu produktów amplifikacji metodą RAPD izolatów *S. sclerotiorum* uzyskanych z trzech miejscowości w 2013



Ryc. 4. Dendrogram podobieństwa na podstawie polimorfizmu produktów amplifikacji metodą RAPD izolatów *S. sclerotiorum* uzyskanych z trzech miejscowości w 2014

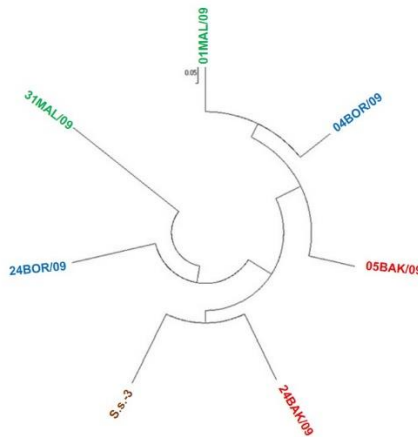
Podjęmowane próby badań populacji *S. sclerotiorum* przy pomocy analizy RAPD najczęściej ukazują tylko dużą różnorodność izolatów patogena z brakiem powiązania z konkretną cechą, taką jak pochodzenie, czy patogeniczność. Do takich wniosków doszli między innymi Colagar i in. (2010) badając 12 izolatów grzyba odszczepionych z rzepaku podwójnie ulepszanego, z różnych prowincji Iranu wykorzystując 18 starterów RAPD. Utworzony dendrogram podobieństw uporządkował większość izolatów *S. sclerotiorum* w różnych grupach, udowadniając dużą różnorodność genetyczną między badanymi izolatami. Stwierdzono, że markery RAPD wykorzystane w pracy mogą być użytecznym narzędziem do badania różnic genetycznych izolatów patogena, ale różnice te nie mają istotnego związku z ich położeniem geograficznym.

Częściową korelację markerów RAPD z miejscem pochodzenia izolatów *S. sclerotiorum* stwierdził Tok i in. (2016). Badając zróżnicowanie 60 izolatów *S. sclerotiorum* odszczepionych z bakłażana, z 6 różnych regionów Turcji przy pomocy 10 starterów RAPD wykazano ponad 90% podobieństwo między badanymi izolatami.



### **Analiza podobieństw na podstawie polimorfizmu produktów amplifikacji metodą RAPD siedmiu izolatów *S. sclerotiorum* używanych do inokulacji rzepaku ozimego**

Po wykonaniu badań RAPD z dwunastoma starterami i uzyskaniu produktów amplifikacji dla izolatów *S. sclerotiorum* wybranych do inokulacji roślin rzepaku ozimego, przeprowadzono analizę podobieństw metodą Nei & Li i wykreślono dendrogram podobieństw (Ryc. 5). Najbardziej odległe genetycznie okazały się izolaty 01MAL/09 i 31MAL/09. Natomiast największym podobieństwem charakteryzowały się izolaty S.s.-3 i 24BAK/09.



Ryc. 5. Dendrogram podobieństwa na podstawie polimorfizmu produktów amplifikacji metodą RAPD izolatów *S. sclerotiorum* używanych do inokulacji roślin rzepaku ozimego

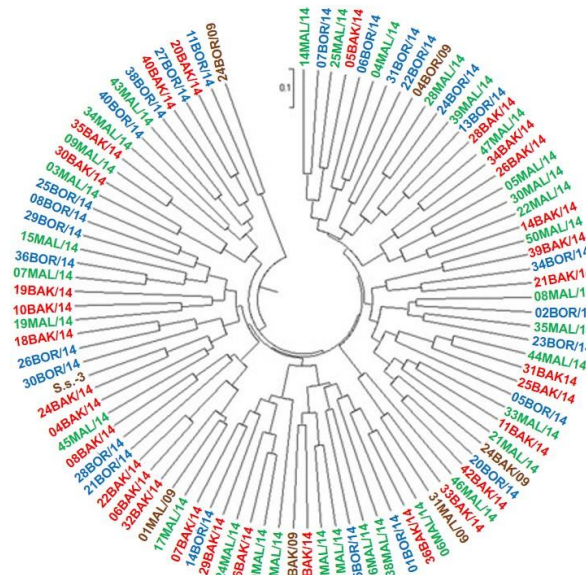
### **Analiza wariancji molekularnej (AMOVA) na podstawie polimorfizmu produktów amplifikacji metodą RAPD izolatów *S. sclerotiorum* uzyskanych z trzech miejscowości w latach 2012 – 2014**

Wykonana analiza wariancji molekularnej (AMOVA) na podstawie produktów amplifikacji metodą RAPD izolatów *S. sclerotiorum* wykazała w poszczególnych latach badawczych niewielkie różnice między izolatami patogena pochodzącymi z trzech różnych miejscowości. Największe różnice między populacjami grzyba z różnych lokalizacji wystąpiły w 2012 roku na poziomie 13 %. W kolejnych latach różnice były mniejsze i wynosiły: w 2013 roku – 4%, a w 2014 roku – 7%.

W badaniach izolatów *S. sclerotiorum* z różnych gospodarzy (fasola, pomidor, papryka, groch, sałata, słonecznik, marchew, rzodkiew, rzepak, kapusta) i z różnych regionów Brazylii metodą RAPD z 16 starterami, uzyskano duże różnice genetyczne (Litholdo Junior i in., 2011). Ponadto przeprowadzona analiza statystyczna AMOVA wykazała 99,1% zróżnicowania między izolatami patogena w regionach geograficznych, a jedynie 0,89% wiązało się z różnicami między izolatami z danego gospodarza.

### **Analiza podobieństw na postawie polimorfizmu produktów amplifikacji przy użyciu markerów mikrosatelitarnych izolatów *S. sclerotiorum* uzyskanych w 2014 roku i siedmiu izolatów wybranych do oceny stopnia odporności różnych typów odmian rzepaku ozimego**

Otrzymane dane po przeprowadzonych badaniach molekularnych z użyciem markerów mikrosatelitarnych poddano również analizie podobieństw wg Nei & Li. Uzyskane wyniki i wykreślony dendrogram podobieństw wskazuje na duże zróżnicowanie izolatów *S. sclerotiorum*. W przeciwieństwie do analiz RAPD nie można wskazać grup podobieństw związanych z pochodzeniem izolatów patogena (Ryc. 6). Dodatkowo wykonana analiza wariancji (AMOVA) wskazuje na 100% zróżnicowania w obrębie populacji *S. sclerotiorum* z danych miejscowości.



Ryc. 6 . Dendrogram podobieństwa na podstawie polimorfizmu produktów amplifikacji metodą SSR izolatów *S. sclerotiorum* uzyskanych z trzech miejscowości w roku 2014

Autorzy Tok i in. (2016) w swojej pracy wykorzystali analizę SSR z 6 parami markerów mikrosatelitarnych. Na podstawie otrzymanych wyników w wykreślonym dendrogramie 60 izolatów *S. sclerotiorum* wystąpiły 3 główne grupy. Jednak podobnie, jak przy analizach RAPD nie odnaleziono powiązania między przynależnością do grupy grzybniowej i pochodzeniem. Również w badaniach Zancan i in. (2015) nad 25 izolatami *S. sclerotiorum* pochodzącymi z różnych odmian fasoli nie stwierdzili korelacji analiz SSR z agresywnością.

W przedstawionej pracy, podobnie jak w badaniach Atallah i in. (2004) wykorzystano markery mikrosatelitarne opracowane wcześniej przez Sirjusingh i Kohn (2001). Określona przez tych autorów duża liczba haplotypów *S. sclerotiorum* odszczepionych z upraw ziemniaka znajdujących się w dorzeczu Kolumbii stanu Waszyngton nie miała związku z badaną patogenicznością grzyba. Na podstawie analizy statystycznej AMOVA określono 92% zmienności populacji patogena na badanym obszarze.

### **Indeksy porażenia odmian rzepaku ozimego inokulowanych wybranymi izolatami *S. sclerotiorum* w trzech kolejnych latach**

Wszystkie izolaty *S. sclerotiorum* użyte do inokulacji porażały użyte w pracy odmiany rzepaku ozimego (Tab. 8 - 10). W 2012 roku najmniej agresywne wobec roślin rzepaku były izolaty 31MAL/09, 05BAK/09 i S.s.-3. Z kolei izolaty patogena 01MAL/09, 24BAK/09, 04BOR/09 i 24BOR/09 porażały rośliny w 100%. W sezonie wegetacyjnym 2012/2013 użyte do inokulacji roślin izolaty *S. sclerotiorum* charakteryzowały się mniejszą niż w poprzednim sezonie patogenicznością. Izolaty 31MAL/09 i S.s.-3 porażały rośliny rzepaku w istotnie mniejszym stopniu niż izolat 05BAK/09. Natomiast w 2014 roku izolat 31MAL/09 okazał się istotnie mniej patogeniczny od pozostałych izolatów. W ciągu trzech kolejnych sezonów wegetacyjnych nie wystąpiły różnice istotne statystycznie między indeksami porażenia poszczególnych odmian rzepaku.

Tab. 8. Indeksy porażenia odmian rzepaku ozimego inokulowanych wybranymi izolatami *S. sclerotiorum* w sezonie 2011/2012

Odmiany	Indeksy porażenia rzepaku przez izolaty [%]						
	wytwarzające mało kwasu szczawiowego przebarwienia < 20 mm			wytwarzające dużo kwasu szczawiowego przebarwienia >20 mm			
	31MAL/09	05BAK/09	S.s.-3	01MAL/09	24BAK/09	04BOR/09	24BOR/09
POZNANIAK	0	0	15	100	100	100	100
BOGART	5	10	5	100	100	100	100
DK EXAMPLE	20	0	10	100	100	100	100
GLADIUS	5	10	20	100	100	100	100
VECTRA	15	10	10	100	100	100	100
CALIFORNIUM	15	5	15	100	100	100	100
CABRIOLET	10	15	15	100	100	100	100
MONOLIT	10	10	15	100	100	100	100
BOJAN	20	5	15	100	100	100	100
ADRIANA	30	10	25	100	100	100	100
Średnio	13	7,5	15	100	100	100	100

Tab. 9. Indeksy porażenia odmian rzepaku ozimego inokulowanych wybranymi izolatami *S. sclerotiorum* w sezonie 2012/2013

Odmiany	Indeksy porażenia rzepaku przez izolaty [%]						
	wytwarzające mało kwasu szczawiowego przebarwienia < 20 mm					wytwarzające dużo kwasu szczawiowego przebarwienia >20 mm	
	01MAL/09	31MAL/09	04BOR/09	24BOR/09	S.s.-3	05BAK/09	24BAK/09
POZNANIAK	15	0	55	70	20	55	70
BOGART	5	10	50	15	0	40	0
DK EXAMPLE	40	5	50	25	0	60	60
GLADIUS	15	0	30	15	20	55	35
VECTRA	25	0	30	20	5	70	45
CALIFORNIUM	40	15	35	5	20	70	25
CABRIOLET	25	0	10	20	20	50	35
MONOLIT	15	0	30	10	0	55	40
BOJAN	20	15	15	20	10	50	25
ADRIANA	40	0	50	30	30	50	45
Średnio	24	4	36	23	13	55	38

Tab. 10. Indeksy porażenia odmian rzepaku ozimego inokulowanych wybranymi izolatami *S. sclerotiorum* w sezonie 2013/2014

Odmiany	Indeksy porażenia rzepaku przez izolaty [%]						
	wytwarzające mało kwasu szczawowego przebarwienia < 20 mm			wytwarzające dużo kwasu szczawowego przebarwienia >20 mm			
	31MAL/09	24BAK/09	S.s.-3	01MAL/09	05BAK/09	04BOR/09	24BOR/09
POZNANIAK	05	15	20	85	85	90	50
BOGART	05	65	40	100	90	85	85
DK EXAMPLE	5	25	30	80	100	90	40
GLADIUS	15	15	50	65	100	60	45
VECTRA	0	25	50	80	70	85	50
CALIFORNIUM	5	55	55	100	100	100	65
CABRIOLET	10	60	55	100	90	100	55
MONOLIT	15	60	50	85	95	80	70
BOJAN	10	55	45	90	95	85	80
ADRIANA	0	80	45	65	100	100	90
<b>Średnia</b>	<b>7</b>	<b>46</b>	<b>44</b>	<b>85</b>	<b>93</b>	<b>88</b>	<b>63</b>

Do tej pory w uprawie rzepaku odnajdywano głównie częściową odporność na *S. sclerotiorum* (Baswana i in., 1991; Delourme i in., 2011). Potwierdza to wiele badań przeprowadzanych na całym świecie łącznie z wynikiem obecnej pracy, w której tylko kilka odmian wykazywało całkowitą odporność na dany izolat *S. sclerotiorum*, niestety bez powtarzalności w kolejnych latach.

W Iranie przeprowadzono badania in vitro i in vivo siedmiu genotypów *B. napus* na porażenie przez *S. sclerotiorum* pochodzących z 3 różnych grup zgodności grzybniowej (Alavi, Dalili, 2014). Zarówno w testach laboratoryjnych, jak i polowych, żaden z analizowanych genotypów nie wykazywał całkowitej odporności na tego patogena. Tylko jedna linia rzepaku Z-15 charakteryzowała się znacznym stopniem odporności w obu testach. Czasami w różnych badaniach odporności odmian obserwowane są sprzeczne wyniki. Przykładem może być odmiana Mystic, która w jednym teście była częściowo odporna, a w innym podatna (Uloth i in. 2013; Taylor i in. 2015). Powodem takiej sytuacji może być brak standaryzacji między badaniami, a także różnice techniczne związane z inokulacją roślin (Debryshire, Denton-Giles 2016). Testy odporności roślin często ograniczają się do inokulacji pojedynczym izolatem, co może przekładać się na różne wyniki. Jak potwierdzono w tej pracy istnieje wiele genotypów *S. sclerotiorum* o różnym stopniu patogeniczności, dlatego badania

odporności oparte na jednym patotypie często nie korelują ze stopniem odporności roślin w warunkach polowych, gdzie występuje wiele izolatów patogena należących do różnych patotypów (Ge i in. 2012).

Analiza korelacji wykazała bardzo wysoką, dodatnią zależność między średnią indeksów porażenia roślin rzepaku, w okresie trzech lat, wszystkich badanych odmian a sumą opadów w okresie siedmiu dni od inokulacji roślin grzybem *S. sclerotiorum* ( $r = 0,79$ ). Natomiast dla indeksów porażenia inokulowanych roślin rzepaku wszystkich badanych odmian i średniej tygodniowej temperatury analiza korelacji była niemal pełna i ujemna ( $r = - 0,98$ ).

W procesie patogenezy oraz rozwoju grzyba czynniki pogody odgrywają bardzo ważną rolę. Jajor i in. (2010) donoszą, że na infekcję rzepaku przez *S. sclerotiorum* istotny wpływ ma przebieg pogody, a zwłaszcza wilgotność powietrza. Według Mehta (2014) wilgotność powyżej 80% oraz zakres temperatur 5 – 25°C przyczynia się do szybkiego rozwoju patogena.

#### **Porównanie zdolności wybranych izolatów *S. sclerotiorum* do wytwarzania kwasu szczawiowego i ich chorobotwórczości wobec dziesięciu odmian rzepaku ozimego**

Każdego roku przeprowadzono porównanie zdolności wybranych izolatów *S. sclerotiorum* do wytwarzania kwasu szczawiowego i ich chorobotwórczości wobec roślin rzepaku ozimego. Wyniki współczynników korelacji Pearsona w ciągu badanych lat były dodatnie na poziomie niemal pełnym (2012 –  $r = 0,95$ ) i bardzo wysokim (lata 2013 –  $r = 0,72$ ; i 2014 –  $r = 0,82$ ).

Podobne wyniki otrzymał zespół Li i in. (2008b). Analiza korelacji wykazała, że w próbie 205 izolatów *S. sclerotiorum* pochodzących z Angli, Kanady i Chin istnieje dodatnia zależność ( $r = 0,739$ ) między ich agresywnością, a produkcją kwasu szczawiowego.

## Podsumowanie i wnioski

- Izolaty *S. sclerotiorum* zebrane w latach 2012 – 2014 i siedem izolatów tego gatunku wybranych do oceny stopnia odporności odmian rzepaku ozimego istotnie różniło się między sobą pod względem wytwarzania kwasu szczawiowego. Otrzymane wyniki świadczą o potencjalnym zagrożeniu występowania zgnilizny twardej na rzepaku nie tylko w tych miejscowościach, gdyż są one reprezentacyjne dla regionów Polski.
- Wytwarzanie kwasu szczawiowego zależało od szybkości wzrostu liniowego grzybni izolatów *S. sclerotiorum*. Stwierdzono niemal pełną korelację Pearsona pomiędzy wielkością średnicy 48 godzinnych kolonii izolatów *S. sclerotiorum* z roku 2014 i powstających przebarwień pod wpływem wytwarzanego przez te izolaty kwasu szczawiowego. W dostępnej literaturze nie znaleziono informacji o takiej zależności wykazanej w niniejszej pracy.
- Na podstawie analizy RAPD z dwunastoma starterami oraz analizy podobieństw wg Nei & Li dla izolatów *S. sclerotiorum* z lat 2012 – 2014, a także siedmiu siedmiu izolatów tego patogena wybranych do oceny stopnia odporności odmian rzepaku ozimego stwierdzono duże podobieństwo między izolatami patogena pochodzącymi z tej samej miejscowości. Niewielkie różnice genetyczne między izolatami patogena w zależności od miejsca pochodzenia potwierdziła analiza wariancji molekularnej (AMOVA) produktów amplifikacji metodą RAPD (13% - 2012 r., 4% - 2013 r., 7% - 2014 r.).
- O dużym zróżnicowaniu między izolatami *S. sclerotiorum* świadczy analiza podobieństw na podstawie polimorfizmu produktów amplifikacji otrzymanych przy użyciu starterów mikrosatelitarnych oraz analiza wariancji molekularnej (AMOVA) wykonana dla tych samych danych. Większe zróżnicowanie izolatów, wykazane w tej analizie może oznaczać, że zróżnicowanie alleli w obrębie sekwencji powtórzonych jest wyższe niż przeciętne zróżnicowanie w innych rejonach genomu patogena, zaś zastosowana metoda pozwala na detekcję każdego z wariantów w danym locus. Duży stopień zróżnicowania izolatów *S. sclerotiorum* pod względem patogeniczności może być przyczyną trudności w selekcji odmian odpornych na tego patogena
- Duży stopień porażania 10 odmian rzepaku przez *S. sclerotiorum* związany jest z dużym zróżnicowaniem izolatów tego gatunku pod względem zdolności do

wytwarzania kwasu szczawiowego, dużą molekularną zmiennością genetyczną oraz dużymi różnicami ich chorobotwórczości. Ponadto badane odmiany z trzech różnych typów charakteryzują się małym zróżnicowaniem pod względem odporności na tego patogena.

- W ciągu trzech lat badań wyodrębniono najmniej patogeniczny spośród siedmiu badanych izolat 31MAL/09, który również charakteryzował się niską produkcją kwasu szczawiowego. Potwierdza to istotną rolę tej substancji w rozwoju procesu chorobowego.
- Analiza korelacji Pearsona wykorzystana do porównania zdolności wybranych izolatów *S. sclerotiorum* do wytwarzania kwasu szczawiowego i ich chorobotwórczości wobec roślin rzepaku wykazała dodatnią bardzo wysoką zależność.
- Suma opadów oraz temperatura w okresie siedmiu dni od inokulacji roślin rzepaku ozimego przez *S. sclerotiorum* mają duży wpływ na stopień ich porażenia. Wykazano dodatnią, bardzo wysoką korelację między średnią indeksów porażenia inokulowanych roślin rzepaku wszystkich badanych odmian z sumą siedmiodniowych opadów ( $r = 0,79$ ). Ujemną, niemal pełną korelację uzyskano dla średnich indeksów porażenia i średnich temperatur dla okresu siedmiu dni od inokulacji ( $r = -0,98$ ).

## Literatura

1. **Akkaya M.S., Bhagwat A.A., Cregan P.B.** 1992. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics* 132:1131-1139.
2. **Alavi N., Dalili A.** 2014. Evaluation of resistance in rapeseed lines against *Sclerotinia* rot (*Sclerotinia sclerotiorum*). *Journal of Oilseed Brassica*, 5(1) :32 – 39.
3. **Atallah Z. K., Larget B., Chen X., Johnson D. A.** 2004. High genetic diversity, phenotypic uniformity, and evidence of out crossing in *Sclerotinia sclerotiorum* in the Columbia basin of Washington state. *Phytopathology* 94: 737–742.
4. **Baswana K. S., Rastogi K. B., Sharma P. P.** 1991. Inheritance of stalk rot resistance in cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L). *Euphytica* 57: 93–96.
5. **Bateman D. F., Beer S. V.** 1965. Simultaneous production and synergistic action of oxalic acid and polygalacturonase during pathogenesis by *Sclerotinia rolfisii*. *Phytopathology* 55: 204–211.
6. **Bolland G. J., Hall R.** 1994. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Can. J. Plant Pathol.* 16: 93–108.
7. **Chen H.F., Wang H., Li Z.Y.** 2007. Production and genetic analysis of partial hybrids in intertribal crosses between *Brassica* species (*B. rapa*, *B. napus*) and *Capsella bursa-pastoris*. *Plant Cell Reports* 26, 1791–800.



8. **Colagar AH, Saadati M, Zarea M and Talei SA.** 2010. Genetic variation of the Iranian *Sclerotinia sclerotiorum* isolates by standardizing DNA polymorphic fragments. *Biotechnol.* 9: 67–72.
9. **Derbyshire M. C., Denton-Giles M.** 2016. The control of sclerotinia stem rot on oilseed rape (*Brassica napus*): current practices and future opportunities. *Plant Pathology* 65: 859–877.
10. **Delourme R., Barbetti M., Snowdon R., Zhao J., Manzanares-Dauleux M. J.** 2011. Genetics and genomics of disease resistance. In: D Edwards, J Batley, IAP Parkin, C Kole, eds. *Genetics, genomics and breeding of oilseed brassicas*. Boca Raton, FL: Science Publishers, 276–318.
11. **Ding Y., Mei J., Li Q., Liu Y., Wan H., Wang L. Becker H. C., Qian W.** 2013. Improvement of *Sclerotinia sclerotiorum* resistance in *Brassica napus* by using *B. oleracea*. *Genet. Resour. Crop. Evol.* 60:1615–1619.
12. **Durman S. B., Menendez A. B., Godeas A. M.** 2005. Variation in oxalic acid production and mycelial compatibility within field populations of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Soil. Biol. Biochem.* 37: 2180-2184.
13. **EL-Argawy E.** 2012. Oxalic acid production by *Sclerotinia sclerotiorum* and its relation to pathogenicity. *J. Plant Prot. and Path., Mansoura Univ., Vol. 3 (3):* 211 – 225.
14. **Ge X. T., Li Y. P., Wan Z. J., You M., Finnegan P. M., Banga S. S., Sandhu P. S., Garg H., Salisbury P. A., Barbetti M.** 2012. Delineation of *Sclerotinia sclerotiorum* pathotypes using differential resistance responses on *Brassica napus* and *B. juncea* genotypes enables identification of resistance to prevailing pathotypes. *Field Crops Res.* 127: 248-258.
15. **Godoy G., Steadman J. R., Dickman M. B., Dam R.** 1990. Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 37: 179–191.
16. **Jajor E., Korbas M., Horoszkiewicz-Janka J., Wójtowicz M.** 2010. Wpływ ochrony fungicydowej i warunków meteorologicznych na porażenie odmian rzepaku przez *Sclerotinia sclerotiorum*. *Progress in Plant Protection* 50 (3): 1334-1339.
17. **Korbas M., Czubiński T., Horoszkiewicz-Janka J., Jajor E., Danielewicz J.** 2015. Atlas chorób roślin rolniczych dla praktyków. Polskie Wydawnictwo Rolnicze Sp. Z o.o., Poznań 2015 wydanie I, redakcja Top Agrar: 234 – 236.
18. **Krüger W.** 1973. Control measures for *Sclerotinia sclerotiorum* in rape. *Phytopath. Z.* 77: 125–137.
19. **Krüger W.** 1980. On the effect of calcium cyanamide on the development of apothecia of *Whetzelinia sclerotiorum* (Lib.) Korf and Dumont, the agent of stalk rot of rape. *Rev. Plant. Pathol.* 59: 5438 (Abstr.).
20. **Kryczyński S., Weber Z. (red.).** 2011. Choroby roślin uprawnych. *Fitopatologia 2. PWRiL:* 386-387.
21. **Li Z., Zhang M., Wang Y., Li R. and Dilantha Fernando, W. G.** 2008b. Mycelial compatibility group and pathogenicity variation of *Sclerotinia sclerotiorum* populations in sunflower from China, Canada and England. *Plant Pathology Journal*, 7 (2): 131 – 133.
22. **Litholdo Júnior C. G., Gomes E. V., Lobo Júnior M., Nasser L. C. B., Petrofeza S.** 2011. Genetic diversity and mycelial compatibility groups of the plant-pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* in Brazil. *Genet. Mol. Res.* 10: 868–877.
23. **Litt M., Luty J. A.** 1989. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics* 44: 397-401.

24. **Marciano P., Lenna P. Di, Magro P.** 1983. Oxalic acid, cell wall-degrading enzymes and pH in pathogenesis and their significance in the virulence of two *Sclerotinia sclerotiorum* isolates on sunflower. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 22: 339–345.
25. **Maxwell D. P., Lumsden R. D.** 1970. Oxalic acid production by *Sclerotinia sclerotiorum* in infected bean and in culture. *Phytopathology* 60: 1395–1398.
26. **Mehta N.** 2014. Epidemiology and forecasting for the management of rapeseed-mustard diseases. *Journal of Mycology and Plant Pathology*, 44 (2): 131-147.
27. **Mei J., Ding Y., Lu K., Wei D., Liu Y., Disi J.O., Li J., Liu L., Liu S., McKay J., Qian W.** 2013a. Identification of genomic regions involved in resistance against *Sclerotinia sclerotiorum* from wild *Brassica oleracea*. *Theor. Appl. Genet.* 126,549–556.
28. **Mo M., Li Z., Li R., Chen Y., Fernando D.W.G.** 2007. Analysis of mycelial compatibility and pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* isolated from oilseed crops in Canada, China, USA and England. *Proceedings of the 12th International Rapeseed Congress*, 26-30.03., Wuhan, China, 4: 190-193.
29. **Morrall R. A. A., Duczek I. J., Mc Kenzie D. L., McGee, D. C.** 1976. Some aspects of *Sclerotinia sclerotiorum* in Saskatchewan. 1970–75. *Can. Plant Dis. Surv.* 56: 56.
30. **Muśnicki Cz.** 1997. Rośliny Oleiste. Rozdział skryptu do ćwiczeń dla studentów Akademii Rolniczej w Poznaniu „Szczegółowa uprawa roślin” pod redakcją A. Dubasa i S. Gładysiaka. AR Poznań: 176-220.
31. **Nei M., Li W. H.** 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 5269 — 5273.
32. **Sirjusingh C., Kohn L. M.** 2001. Characterization of microsatellites in the fungal plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mol. Ecol. Notes* 1: 267–269.
33. **Smith V. L., Punja Z. K., Jenkins S. F.** 1986. A histological study of infection of host tissue by *Sclerotinia rolfii*. *Phytopathology* 76: 755–759.
34. **Starzycka E., Kachlicki P., Starzycki M.** 2002. Zróżnicowanie polskich i chińskich izolatów *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary pod względem zdolności do wytwarzania kwasu szczawiowego. *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops t. XXIII (2)*: 385-390.
35. **Starzycka E., Starzycki M.** 2011. *In vivo* and *in vitro* investigations on pH changes in winter rape (*Brassica napus*) under the influence of *Sclerotinia sclerotiorum* mycotoxin. *Phytopathologia* 61: 45–51.
36. **Starzycka E., Starzycki M., Cichy H., Mikołajczyk K.** 1998. Badanie odporności rzepaku ozimego na porażenie przez *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Rośliny Oleiste – Oilseed t. XIX (2)*: 493 – 500.
37. **Starzycka E., Starzycki M., Kauzik M., Woś H., Cichy H., Budzianowski G.** 2009. Ocena odporności rzepaku ozimego na porażenie przez *Leptosphaeria* spp. i *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary w doświadczeniach przeprowadzonych w Małyszynie i Borowie, w latach 2007–2009. *Rośliny Oleiste – Oilseed t. XXX (2)*: 207 – 222.
38. **Taylor A., Coventry E., Jones J. E., Clarkson J. P.** 2015. Resistance to a highly aggressive isolate of *Sclerotinia sclerotiorum* in a *Brassica napus* diversity set. *Plant Pathology* 64: 932–940.
39. **Tok F. M., Derviş S., Arslan M.** 2016. Analysis of genetic diversity of *Sclerotinia sclerotiorum* from eggplant by mycelial compatibility, random amplification of polymorphic DNA (RAPD) and simple sequence repeat (SSR) analyses. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 30:5, 921-928.
40. **Townsend G. R., Heuberger J .V.** 1943. Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments. *Plant Disease Report*, vol. 24: 340–343.

41. **Uloth M. B., You M. P., Finnegan P. M, Banga S. S., Banga S. K., Sandhu P. S., Yi H., Salisbury P A., Barbetti M. J.** 2013. New sources of resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* for crucifer crops. *Field Crops Research* 154: 40–52.
42. **Uloth M., You M. P., Finnegan P. M., Banga S. S., Yi H., Barbetti M. J.** 2014. Seedling resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* as expressed across diverse cruciferous species. *Plant Dis.* 98:184-190.
43. **Welsh J., McClelland M.** 1990. Finger printing genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acid Research*, 18 (24): 7213-7218.
44. **Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V.** 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research*, 18 (22): 6531-6535.
45. **Zancan W. L. A., Steadman J. R., Higgins R., Jhala R., Machado J. C.** 2015. Genetic and aggressiveness variation among *Sclerotinia sclerotiorum* dry bean isolates from Brazil fields. *Bioscience Journal.* 31:1143–1151.