

Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre
Fakulta agrobiológie a potravinových zdrojov
Katedra ochrany rastlín

Ing Mounia Arbaoui

Autoreferát dizertačnej práce

**Variabilita izolátov *Sclerotinia sclerotiorum* z rôznych agroekologických
lokalít a biologická ochrana**

na získanie vedecko-akademickej hodnosti philosophiae doctor (PhD.)

v odbore doktorandského štúdia

41-97-9 OCHRANA RASTLÍN

Nitra 2005

Dizertačná práca bola vypracovaná v dennej forme doktorandského štúdia
na Slovenskej poľnohospodárskej univerzite v Nitre
Fakulte agrobiológie a potravinových zdrojov – Katedre ochrany rastlín

Predkladateľ : Ing. Mounia Arbaoui
Katedra ochrany rastlín, SPU v Nitre

Školiteľ: Doc. Ing. Jozef Huszár, DrSc.
Katedra ochrany rastlín, SPU v Nitre

Oponenti: Prof. Ing. Štefan Hraška, DrSc.
Univerzita Konštantína Filozofa v Nitre

Ing. Bernard Vančo, PhD.
Výskumný ústav rastlinnej výroby, Piešťany

Ing. Ján Heldák, PhD.
Výskumný a šľachtiteľský ústav zemiakársky, Veľká Lomnica

Autoreferát bol rozoslaný.....

Obhajoba dizertačnej práce sa koná.....o.....hod.
na Katedre ochrany rastlín, FAPZ, SPU v Nitre, pred komisiou pre obhajobu dizertačnej
práce v odbore doktorandského štúdia 41-97-9 “Ochrana rastlín” vymenovanou predsedom
spoločnej odborovej komisie 8. novembra 2005

Predseda spoločnej odborovej komisie: prof. Ing. Ludovít Cagáň, CSc.
Katedra ochrany rastlín, SPU v Nitre

1. Úvod

Medzi najvýznamnejšie hubové patogény vyskytujúce sa na všetkých svetadieloch, patrí polyfágnny parazit *Sclerotinia sclerotiorum*, ktorý najčastejšie vyvoláva sklerotíniové vädnutie alebo bielu hnilobu u širokého okruhu hostiteľských rastlín. Bolo opísaných vyše 400 hostiteľských druhov patriacich do viac ako 64 botanických čeľadí, pričom najfrekvencovanejšie sú composeae, solanaceae, brassicaceae a umbelliferae (Briard et al. 1997). Škodlivosť sklerotínií sa prejavuje v širokých teplotných (od 5 do 20 °C) a vlhkostných rozmedziach (od 20 do 100%) hlavne na ľahkých pôdach udržiavajúce zimnú vlhku.

Straty na úrode pôsobené sklerotíniou sú v priamej závislosti od doby napadnutia hostiteľských rastlín. V celosvetovom meradle škody na olejninách ako je slnečnica, repka a sója dosahujú viac ako 60 milión dolárov (Guihua Lu, 2003).

Na Slovensku *Sclerotinia sclerotiorum* napáda rôzne hostiteľské rastliny, ale výskyty sú najfrekvencovanejšia na slnečnici ročnej. Na základe sledovania výskytov sklerotínií na Slovensku v rokoch 1998 – 2003 zo 120 sledovaných lokalít bolo identifikované na 75 % lokalít západného Slovenska podielom napadnutia od 20 do 55 %a na východnom Slovensku od 1 do 10% (Huszár a Bokor, 2004; Bokor et al. 2005).

V pestovateľských oblastiach Slovenska okrem *Sclerotinia sclerotiorum* každoročne sú evidované patogény *Phomopsis helianthi*, *Alternaria helianthi*, *Botrytis cinerea*, *Plasmopara halstedii*, *Phoma spp* and *Septoria spp*. (Huszár a Kulcsárová, 2004; Huszár a Bokor, 2005)

V Alžírsku medzi najvýznamnejšie hostiteľské rastlinné druhy pre *Sclerotinia sclerotiorum* patria rajčiaky a melóny. Straty na úrode môžu dosiahnuť až 80 % (Fodil Chérif, 2003).

Vzhľadom na škodlivosť *Sclerotinia sclerotiorum* je dôležité rozšíriť poznatky o jeho patogenéze, fyziológii, molekulárnej biológii, biologickej ochrane ako aj o hostiteľsko-parazitických vzťahoch.

2. Literárny prehľad

V rámci rodu *Sclerotinia* sú opísané viacerými autormi tri druhy *Sclerotinia sclerotiorum* napádajúcich viac ako 360 druhov zo 64 čeľadí, *Sclerotinia minor* napádajúce hlavne bylinné rastliny patriace do čeľadí *Asteraceae*, *Brassicaceae* a *Fabaceae* a *Sclerotinia trifoliorum* napádajúce bôbovité druhy (Khon, 1979a, 1979b; Cruickshank, 1983). Medzi hlavné znaky rodu *Sclerotinia* sp patria tvorba askokarpov typu apotécii vyrastajúcich na skleróciach. Sklerócie na živných substrátoch sa častejšie tvoria na okrajoch petriho misiek, ale v niektorých prípadoch sa tvoria koncentrické kruhy alebo iné pravidelné útvary, čo poukazuje na endogenný rytmus niektorých izolátov (Le Tourneau, 1979). Purdy (1955) charakterizoval uvedené tri druhy rodu *Sclerotinia* podľa morfológických typov, ktoré sa diferencujú podľa chovania mycélia a tiež podľa veľkosti a farby sklerócií v podmienkach in vitro.

Sclerotinia sclerotiorum prežíva v pôde hlavne vo forme sklerócií a väčšinou sú zdrojom primárneho inokula (Agrios, 1978; Leroux et Basselat, 1984; Kapoor et al., 1987; Dillard et al., 1995). Sklerócia sú dlhé 3-10 mm a široké 3-7 mm (Huang, 1985; Huang et Kokko, 1989). Klíčenie sklerócií je buď myceliárna alebo karpogenická (tvorbou apotécei). Myceliárna infekcia môže vyvolávať koreňovú hnilobu, hnilobu bázy stebiel alebo vädnutie (Huang and Dueck, 1980; Huang and Kozub, 1990) a pri karpogenickom klíčení sa môžu vyskytovať hniloba úboru, hniloba nažiek a spála kvetenstva (Huang and Kokko, 1992). Myceliárne klíčenie sa uskutoční od 1 – 32°C s optimum okolo 24°C (Blancard, 1998, Woodard and Simpson, 1993). Pre karpogenické klíčenie sú dôležité teploty (11-15°C) a

vlhkosť (20-100 %) počas tvorby sklerócií alebo v určitej perióde (Dillard et al., 1995; Pohronezny, 1997).

Apotécea vyrastajú na skleróciách ktoré sú buď na povrchu pôdy alebo v pôde v ktorých vo vreckách sa tvoria vzduchom prenosné askospóry. Askospóry po vyklíčení infikujú rastliny vo forme mycélia. Ak podmienky sú nevhodné pre klíčenie askospór, tie môžu zachovať životaschopnosť na krátku dobu a klíčiť ak podmienky budú priaznivé.

Pri *Sclerotinia sclerotiorum* nebola zistená žiadna fyziologická špecializácia, ale kmene sa líšili v reakciách na rôznych hostiteľských druhoch, niektoré kmene vykazovali vysokú virulenciu k jednému hostiteľskému druhu, ale slabú k ďalšiemu druhu (Waipara et al., 1993). Jedným z faktorov patogenity druhov *Sclerotinia* pre rozvoj choroby je produkcia kyseliny oxálovej (Marciano et al., 1983; Godoy et al., 1990; Dutton and Evans, 1996; Zhou and Boland, 1999; Guimaraes and Stotz, 2004). Zistilo sa, že mutanti ktoré sú deficitné pre biosyntézu oxalátu sú menej patogénické ako huby divého typu.

Price and Colhoun (1975) uskutočnili umelé inokulácie s 19 izolátmi *Sclerotinia sclerotiorum* 11 odrôd patriacich k 11 rôznym botanickým druhom, pričom u väčšiny izolátov zistili variabilitu v stupni patogenity k jednotlivým hostiteľským druhom, ako aj citlivosť jednotlivých hostiteľských druhov k jednotlivým izolátom.

Kull et al. (2000, 2004) študovali zoskupenie myceliárnej compatibility ako aj agresivitu rôznych izolátov *Sclerotinia sclerotiorum* pôvodom z rôznych hostiteľov a rôznych geografických lokalít. Agresivita bola variabilná ako v medzi vzorkami ale medzi skupinami myceliárnej compatibility.

Pre štúdium variability izolátov *Sclerotinia sclerotiorum* okrem morfológických rozdielov sa ukázali ako najvhodnejšie štúdiá na základe molekulárnych markérov zahrňujúc reakcie RAPD/PCR ((Williams et al., 1990; Durand et al., 1993). Štúdiá Fraissinet et al. (1996) ukázali, že na rozdiel od početných patogenných húb *Sclerotinia sclerotiorum* vykazuje silnú karyotypovú stabilitu medzi kmeňmi čo dáva do súvislosti zachovávaním spôsobu pohlavnej reprodukcie. Na základe analýzy pomocou RAPD sa ukázalo, že izoláty *Sclerotinia minor* a *S. trifoliorum* boli v bližšom príbuzenskom vzťahu ako izoláty *Sclerotinia sclerotiorum*. Izoláty *Sclerotinia sclerotiorum* boli rozdelené do dvoch skupín na základe prítomnosti alebo neprítomnosti pásika 94 čo zodpovedalo skupinám z USA a Nového Zélandu, ale na základe analýzy ribozomálnej DNA sa nezistili žiadne rozdiely medzi izolátmi alebo druhmi (Noonan et al. 1996).

Kohn et al., (1991) zistili, že vývoj populácii *Sclerotinia sclerotiorum* sa uskutočňuje vo forme klónov, pričom sa ukázalo, že každá hostiteľská plodina môže byť infikovaná viacerými klónmi. Jedným z kritérií na detekciu klónov sú štúdiá zamerané na myceliárne kompatibilné skupiny na základe schopnosti dvoch izolátov fúzovať a vytvoriť jednu kolóniu. Predpokladá sa, že uvedené myceliárne kompatibilné skupiny sú geneticky rozdielne. Durman et al. (2003) identifikovali viac ako 50 rôznych myceliárnych skupín zo zbierky 140 izolátov *Sclerotinia sclerotiorum* zo sóji (60), šalátu (59), a slnečnice (21) z pestovateľskej oblasti 6500 km² v provincii Buenos Aires.

Proti patogénu *Sclerotinia sclerotiorum* toho času sa väčšinou odporúča chemická ochrana ktorá často je ale málo efektívna. Ako alternatívna metóda sa skúša biologická ochrana, ktorá je zameraná buď na redukciu sklerócií v pôde pomocou mikrobiálnych parazitov, alebo na inhibíciu infekcie hostiteľských pletív (Rabeendran et al., 1998). Boli izolované početné mykoparazitické huby a baktérie z parazitovaných sklerócií ako sú *Coniothyrium minitans*, *Trichoderma spp.*, *Gliocladium spp.*, a *Sporidesmium sclerotivorum* (Adams and Ayers, 1979; Lynch and Ebben, 1986; Budge and Whipps, 1991; Fravel et al., 1992). Ako ďalšie mykoparazity sklerócií boli opísané *Acrostalagmus*, *Fusarium*, *Hormodendrum*, *Mucor*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Stachybotrys* and *Verticillium* (Bedi, 1961; Makkonen and Pohjakallio, 1960). Izoláty *Coniothyrium minitans* (Budge et al., 1995) a *trichoderma spp.*

(Dos Santos and Dhingra 1980) sa ukázali ako perspektívne parazity sklerócií. Ukázalo sa, že najvhodnejšia doba pre aplikáciu hyperparazitov je odpočinkové obdobie sklerócií, kedy patogén má slabú mobilitu, alebo v štádií klíčenia kedy sú sklerócia zraniteľné. Huba *Coniothyrium minitans* bola izolovaná ako parazit mycelia tak aj sklerócií vo vnútri alebo na povrchu stoniek po askospórovej infekcii listov hubou *Sclerotinia sclerotiorum* (Merriman et al., 1979; Trutmann et al., 1982). *Coniothyrium minitans* tvorila pyknidy iba na rastlinných pletivách infikovaných *S. sclerotiorum*. *Coniothyrium minitans* aplikovaná do pôdy vo forme pevného substrátu môžu infikovať skleróciá a efektívne znížiť ich počet a ich životnosť (Budge et al., 1995; Gerlagh et al., 1994; Huang, 1977). Foliárna aplikácia suspenziou spór *Coniothyrium minitans* redukovala napadnutie nadzemnej časti (Trutmann et al., 1982). V súčasnosti sú známe dve komerčné prípravky na báze huby *Coniothyrium minitans* Contans a KONI (Whipps and Davies 2000). Contans je registrovaný v Nemecku pre repku olejnú šalát a vo Švajčiarsku pre šalát uhorky a fazuľu (Hedke et al., 1999). KONI sa odporúča proti skleróciovej hnilobe vyvolanej *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotinia minor* a *Sclerotinia trifoliorum* v skleníkoch, foliovníkoch, záhradách, verejných parkoch ako aj na poľnohospodárskych pôdach (Bioved, 2004).

3. Ciele práce

Pre zníženie škodlivosti *Sclerotinia sclerotiorum* v podmienkach Slovenska sme vytýčili nasledovné ciele:

1. Porovnanie izolátov *Sclerotinia sclerotiorum* na základe morfologickej variability pri rôznych teplotných režimoch na základe myceliárneho rastu, počtu vytvorených sklerócií ich hmotnosti, dĺžky. V tejto časti sme sa zamerali na nasledovné úlohy:

- Sledovanie vplyvu rôznych teplotných a svetelných režimov na rast mycélia a tvorbu sklerócií

- Sledovanie podobnosti morfologickej charakteristiky izolátov *Sclerotinia sclerotiorum* pochádzajúcich z rôznych proveniencií

2. Porovnanie patogenity izolátov *Sclerotinia sclerotiorum* proti rôznym odrodám rajčiaka jedlého a snečnice ročnej. V tejto časti sme vytýčili nasledovné čiastkové ciele:

- Či je pozitívna korelácia medzi agresivitou v podmienkach *in vitro* a myceliárnym rastom.

- Či agresivita izolátov *Sclerotinia sclerotiorum* je v korelácii s hostiteľským druhom odkiaľ boli izoláty získané.

- Či izoláty *Sclerotinia sclerotiorum* sa líšia v ich agresivite voči rôznym odrodám hostiteľských rastlín?

- Či každý izolát prejavuje rovnakú agresivitu voči každej odrode a každej hostiteľskej rastline.

- Náchylnosť odrôd a hybrid rajčiakov a snečnice voči *Sclerotinia sclerotiorum*.

- Či existuje nejaký dôkaz fyziologickej špecializácie v rámci izolátov *Sclerotinia sclerotiorum*.

3. Genetická analýza variability v rámci druhu *Sclerotinia sclerotiorum* pomocou reakcií PCR/RAPD. Pri týchto analýzach sme sa zamerali na nasledovné úlohy:

- Či izoláty *Sclerotinia sclerotiorum* sú karyotypovo homogénne.

- Či izoláty z každého pôvodu majú podobný genetický profil.

4. Analýza myceliárnych interakcií medzi izolátmi *Sclerotinia sclerotiorum* pomocou protirastúcich kultúr. Čiastkové ciele sú zamerané na zisťovanie:

- Či fenotypové vlastnosti môžu poskytnúť selektívnu výhodu na báze myceliárnej inkompatibility súvisiace s agresivitou, virulenciou, hostiteľskou špecificitou, rýchlejšim myceliárnym rastom alebo väčším počtom a váhou sklerócií

- Či v rámci myceliárnych kompatibilných skupín sa nachádzajú izoláty z rôznych lokalít alebo iba z jednej lokality

5. Sledovanie účinku rôznych kmeňov mykoparazita *Coniothyrium minitans* proti *Sclerotinia sclerotiorum* v skleníkových pokusoch boli zamerané na nasledovné úlohy:

- Či vysoký infekčný tlak choroby má vplyv na účinnosť rôznych kmeňov *Coniothyrium minitans*
- Či účinok bioagensa *Coniothyrium minitans* je porovnateľný s účinkom chemického ošetrenia

4. Materiály a metódy

4.1 Biologické materiály

4.1.1 Rastlinné materiály

Pri štúdiách patogenity izolátov *Sclerotinia sclerotiorum* sme použili 6 odrôd rajčiaka jedlého (Tajfun F1, Devín, Odéon, Rajka, Tornádo F1, Testa F1) a 6 hybridov slnečnice ročnej (Alexandra, NSH-45, Trezor, Bambo, Lympil, Marica II).

V skleníkovom pokuse pre testovanie účinnosti *Coniothyrium minitans* proti *Sclerotinia sclerotiorum* v štádiu priesad pri rajčiaka jedlého sme použili odrodu Saint-Pierre.

4.1.2 Mykologické materiály

Pri štúdiách morfológických, genetických, patogenity a biologickej ochrany, pri *Sclerotinia sclerotiorum* sme použili rôzne izoláty huby z rôznych hostiteľských druhov (*Phaseolus vulgaris*, *Lactuca sativa*, *Lycopersicon esculentum*, *Helianthus annuus*, *Conium maculatum*, *Iva Xanthifolia*) z územia Slovenska a Alžírsko.

V rámci biologickej ochrany proti *Sclerotinia sclerotiorum* sme skúšali dve biopreparáty Contans (Prophyta, Nemecko) a KONI (Bioved Bt Maďarsko) obsahujúce propaguly bioagensa huby *Coniothyrium minitans*.

4.2 Použité metódy

4.2.1 Izolácia a purifikácia izolátov *Sclerotinia sclerotiorum*

Izoláty *Sclerotinia sclerotiorum* boli udržiavané na zemiakovo dextrózovom agare s prídavkom streptomycínu na elimináciu kontaminácie baktériami. Petriho misky s rôznymi izolátmi boli inkubované pri 18 +/- 2°C, pri osvetlení 4000 luxov.

4.2.2 Porovnanie morfológických vlastností izolátov *Sclerotinia sclerotiorum*

Pre sledovanie rastu mycélia sme použili trojdňové disky inokula z jednotlivých izolátov. Rast mycélia sme sledovali v 10 opakovaníach pri rôznych teplotách (3, 10, 18 and 25°C) za svetla a v tme. Merania sme robili v intervaloch 24, 48, 72, 86, 96, 120, 144, 168, 192 hodín po inokulácii. Súčasne sme sledovali aj tvorbu sklerócií, počet, hmotnosť, dĺžku a šírku. Morfológickú charakteristiku sklerócií sme zaznamenali po 21 dní po inokulácii (Tariq et al., 1985). Dosiagnuté výsledky boli vyhodnotené viacfaktorovou analýzou rozptylu.

4.2.3 Porovnanie patogenity izolátov *Sclerotinia sclerotiorum*

Patogenita sa sledovala u izolátov pôvodom zo Slovenska a z Alžírsko. Patogenitu u kľúčnych rastlín rajčiaka a slnečnice sme sledovali v skleníkových podmienkach pri 18±2°C a 70 – 80 % relatívnej vlhkosti. Po umelej inokulácii rastliniek sme hodnotili patogenitu a citlivosť odrôd v rámci druhov k rôznym izolátom *Sclerotinia sclerotiorum*. Hodnotenie indexu napadnutia sme robili po 14 dňoch podľa vzorca Price and Colhoun (1975).

4.2.4 Genetické porovnanie izolátov zo Slovenska a z Alžírsko

Pre sledovanie vnútrodruhovej genetickej variability huby *Sclerotinia sclerotiorum* sme použili metódu RAPD/PCR. Kultúry húb sme dopestovali podľa metódy popísanej Noonan et al., 1996. Pre amplifikáciu sme použili 17 primerov (LBMB01, LBMB02, LBMB03,

FVIIex8, HBV3, HBV5HVR, HVR⁺, YNZ2, LBHB-A, LBHB-B, LBHB-C, FVIIexB-C,14C2, HVR, LBHB01, LBHB02, LBHB03). V termocykléru sme uskutočnili 45 cyklov, 1 minútu pri 94°C, 1 minútu pri 72°C, 40 × 94°C za 1 minútu a 8 minút pri 72°C. Pre štatistické vyhodnotenie dendrogramov sme použili Jacquardovú maticu genetickej podobnosti a metódu Priemerné väzby vo vnútri skupín.

4. 2. 5 Myceliárna interakcia izolátov *Sclerotinia sclerotiorum* Kultúry boli udržiavané na zemiakovo dextrózovom agare v tme pri teplotách 18 - 20° C. Kmene potom boli porovnávané na Pattersonovom médiu. Hodnotenie kompatibility resp. inkompatibility protirastúcich kultúr sme robili podľa Kohn et al, 1990.

4. 2. 6 Biologická ochrana proti napadnutiu so *Sclerotinia sclerotiorum* využitím hyperparazita *Coniothyrium minitans*

- V rámci ochrany proti napadnutiu s hubou *Sclerotinia sclerotiorum* sme zaradili dva prípravky, rôznymi metódami aplikácie na báze *Coniothyrium minitans* porovnávané na štandardný fungicídny prípravok na báze carbendazimu (Bavistin BASF). V rámci uvedeného pokusu sme hodnotili aj životnosť sklerócií *Sclerotinia sclerotiorum* na troch rôznych substrátoch: piesok, pôda a piliny.

- Pri rajčiakoch vo fáze priesad sme sledovali účinok hyperparazita *Coniothyrium minitans* použitím biopreparátov KONI a Contans na potlačenie napadnutia na pôde po prirodzenej infekcii hubou *Sclerotinia sclerotiorum*. Pokus bol urobený vo dvoch variantoch:

I. variant: 1./ Kontrola - bez ošetrovania., 2./ Chemický prípravok Bavistin-3,75ml/l.v dobe výsadby, 3./ Biopreparát KONI suspenzia spór v dobe výsadby, 4./ Biopreparát Contans-suspenzia spór v dobe výsadby.

II. variant: 1./ Kontrola - bez ošetrovania., 2./ Chemický prípravok Bavistin-3,75ml/l.v dobe výsadby, 3./ Biopreparát KONI suspenzia spór aplikovaná na báze kukurično-múčneho perlitu, 4./ Contans-suspenzia spór aplikovaná na báze kukurično-múčneho perlitu.

- Účinok mykoparazitickej huby na životaschopnosť sklerócií *Sclerotinia sclerotiorum* sme sledovali na substrátoch 1./ sterilný piesok, 2./ pôda bez sterilizácie, 3./ piliny. Pokusy boli urobené vo dvoch variantoch, v 9 ošetreniach a 12 opakovaníach:

I. variant: 1./ 10 sklerócií *Sclerotinia sclerotiorum* bez ošetrovania, 2./ 10 sklerócií *Sclerotinia sclerotiorum* inokulované 10ml suspenziou spór biopreparátu KONI, 3./ 10 sklerócií *Sclerotinia sclerotiorum* inokulované 10ml suspenziou spór biopreparátu Contans.

II. variant: varianty boli tie isté ako vo variante I., ale na rozdiel suspenzia spór nebola aplikovaná separátne na každé skleróciium ale boli ponorené do 10ml suspenzie spór na 10 minút (Whipps & Budge 1990)

Dosiahnuté výsledky boli štatisticky vyhodnotené multifaktoriálnou analýzou.

5. Výsledky a diskusia

5. 1 Porovnávanie morfológických vlastností izolátov *Sclerotinia sclerotiorum*

Pri týchto štúdiách sme sledovali myceliárny rast a vlastnosti sklerócií (váhu šírku, dĺžku a počet) pri izolátoch rastúcich pri rôznych teplotách (3°C, 10°C, 18°C, 25°C), na svetle a v tme. Vo všeobecnosti kultúry vytvárali biele mycelium, ktoré po období 7 – 15 dní začalo kondenzovať ako začiatok tvorby sklerócií. V ranných štádiách sklerócie podobili malým kľbkám bielej potom striebistej farby a asi po 21 dní v dôsledku dozrievania stmavli po tvorbe melanínu v kôrových vrstvách.

Rast mycelia jednotlivých izolátov sme sledovali na svetle a v tme pri rôznych teplotách, po inkubačnej perióde 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, a 216 hodín. Izoláty vykázali najrýchlejší rast mycelia pri 25°C ako na svetle tak aj v tme, najmä izolát I2 potom I6. Izoláty pomalší rast vykázali pri teplotách 18°C, 10°C a 3°C. Na základe testu viacnásobného triedenia sledované izoláty sa zaradili do dvoch homogenných skupín (I1, I2, I4, I6) a (I3, I5).

5. 2. Charakteristika sklerócií

Charakteristika sklerócií sa robila súbežne so štúdiami myceliárneho rastu. Morfológická charakteristika sklerócií: počet, dĺžka, šírka a váha boli zisťované po 21 dní od inkubácii na petriho miskách pri rôznych teplotách na svetle a v tme.

Počet sklerócií pri jednotlivých izolátov kolísal v závislosti od teplôt a prítomnosti alebo neprítomnosti svetla. Vo všeobecnosti sme zistili, že počet sklerócií bol vždy vyšší na svetle ako v tme. Pri 25°C na svetle počet sklerócií bol najvyšší v porovnaní ostatnými teplotnými režimami.

Rozmery sklerócií sme hodnotili u 100 náhodne vybratých sklerócií u každého variantu. Vo všeobecnosti sme zistili, že dĺžka a šírka sklerócií sa mení v závislosti od teplôt a tiež či pokusy sa robili na svetle alebo v tme. Pri 25°C na svetle a v tme nezaznamenali výraznejšie rozdiely ako pri 18°C na svetle a v tme. Najväčšie sklerócie sa tvorili v tme.

Zistili sme, že počet sklerócií neovplyvňuje **hmotnosť sklerócií**. Vo všeobecnosti sme zaznamenali, že hmotnosť sklerócií prakticky sa pohybuje okolo podobných hodnôt pre použité teploty na svetle i v tme.

Hoci je málo štúdií o variabilite izolátov *Sclerotinia sclerotiorum* na základe počtu a váhy sklerócií, naše výsledky sú v súlade s výsledkami Tariq et al., 1985, ktorý robil porovnávacie štúdiá kultúrnych a biochemických vlastností na rozlíšenie druhov v rámci *Sclerotinia*. Zistil tiež variabilitu v raste mycélia medzi izolátmi, pričom najrýchlejší rast zistil pri 25°C a najpomalší pri 5°C. Závislosť rastu mycélia na teplote uvádzal už skoršie Willis (1971), pri porovnávaní *Sclerotinia sclerotiorum* s *Sclerotinia trifoliorum*.

5. 3 Patogenita izolátov *Sclerotinia sclerotiorum* proti rôznym odrodám *Lycopersicon esculentum* a *Helianthus annuus*

Väčšina s nami sledovaných izolátov vykázali variabilitu v stupni patogenity v závislosti od hostiteľského druhu (slnečnica, rajčiak) a od použitých odrôd. Podľa indexu napadnutia izolát I1 sa javil ako najagresívnejší a izolát I2 ako najmenej agresívny na oboch hostiteľských druhoch. V našich pokusoch ani odrody rajčiaka ani hybridy slnečnice nereagovali podobne keď boli inokulované buď vysoko patogenným alebo slabo patogenným izolátom, zatiaľ Kull et al. (2004) pri sóji pri použití 6 izolátov *Sclerotinia sclerotiorum* zistil zhodné reakcie či použil rezistentné alebo náchylné odrody a inokulácie robil menej alebo vysoko agresívnym izolátom.

5. 4 Genetické porovnávanie izolátov *Sclerotinia sclerotiorum* pomocou PCR/RAPD analýzy

Pri použití 17 primerov sme zistili 166 skupín prúžkov na agarovom géle. Profili prúžkov ale neboli podobné medzi izolátmi *Sclerotinia sclerotiorum*. Každý primer vytváral prúžky bezohľadu nato či pochádzali izoláty zo Slovenska alebo z Alžírsku, ale v niektorých prípadoch iba niekoľko prúžkov a nie u všetkých izolátov. Na základe použitých primerov ale nedali sa rozdeliť izoláty na dve rozdielne skupiny podľa pôvodu. Vytvorené dendogramy s dvoma štatistickými metódami (Priemer väzby vo vnútri skupín and Jacquardová matrica genetickej podobnosti) ukázali rozdielne zhľuky s rozdielnym usporiadaním v závislosti od použitého primeru. Ak berieme do úvahy všetky dendogramy vytvorenými použitými primermi sa ukázali určité kombinácie medzi Slovenskými a Alžírskymi izolátmi. Naše výsledky sú v súlade so zisteniami genetickej variability u populácii *Sclerotinia sclerotiorum* na Novom Zélande (Carpenter et al., 1999)

5. 5 Myceliárne kompatibilné skupiny v rámci izolátov *Sclerotinia sclerotiorum*

Sledovali sme myceliárnu kompatibilitu u 6 izolátov *Sclerotinia sclerotiorum*. Párovanie bolo považované za kompatibilné keď dve porovnávané izoláty sa prelínali do jednej kolóny, bez deliacej interakčnej zóny a za inkompatibilné keď bola viditeľná červená reakčná čiara

hojným výskytom vzdušného mycélia na interakčnej zóne na povrchu kolónii. Pri 36 testovaných kombinácii sme zistili 5 inkompatibilných reakcii a 3 kompatibilné skupiny pozostávajúcich z dvoch alebo troch kmeňov. Všetky alžírské izoláty vytvárali kompatibilné reakcie so všetkými izolátmi. Zo Slovenských izolátov iba jeden izolát bol kompatibilný so všetkými izolátmi. Existencia rôznej myceliárnej compatibility slovenských izolátov poukazuje na vysokú genetickú heterogenitu v rámci druhu *Sclerotinia sclerotiorum* podobne ako zistil Kohn (1995)

5. 6 Biologická ochrana *Sclerotinia sclerotiorum* pri rajčiakoch použitím dvoch rôznych kmeňov *Coniothyrium minitans*

V skleníkových pokusoch s rajčiakmi vo fáze priesad sme hodnotili účinok dvoch kmeňov *Coniothyrium minitans* (Contans a KONI) po umelej inokulácii so *Sclerotinia sclerotiorum*. Napadnutie oproti kontrole (80%), chemické ošetrenie redukovalo výskyt o 50%, KONI o 44% a najmenej Contans o 30%. Naše výsledky naznačujú možnosť použitia hyperparazita *Coniothyrium minitans* (biopreparát KONI) v rámci biologickej ochrany proti bielej hnilobe rajčiaka v skleníkových podmienkach. Podľa niektorých literárnych prameňov *Coniothyrium minitans* bol účinné ako v skleníkových tak a j v poľných podmienkach proti *Sclerotinia sclerotiorum* ale iba pri nízkom alebo strednom infekčnom tlaku (Huang, 1980; Budge and Whipps, 1991; McLaren et al., 1996; McQuilken and Whipps, 1995).

5. 7 Účinok *Coniothyrium minitans* na životnosť sklerócií huby *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary

Životaschopnosť sklerócií huby *Sclerotinia sclerotiorum* bola úspešne redukovaná s oboma kmeňmi *Coniothyrium minitans* (biopreparáty Contans and KONI), ale na rôznej úrovni v závislosti od použitého substrátu. V pokuse s prípravkom Contans životnosť sklerócií na začiatku pokusu bola 50-100% pričom k významnej redukcii životaschopnosti sklerócií došlo až po 6 týždňoch od začiatku pokusu. V pokuse s prípravkom KONI kde na začiatku životaschopnosť sklerócií bola 55 – 89%, k významnej redukcii životaschopnosti sklerócií ako na pôdnom tak aj na pieskovom substráte došlo už po troch týždňoch od začiatku pokusu. Naše výsledky sú zrovnateľné výsledkami Whipps and Budge, 1990; Jones and Stewart, 1997, 2000, ktorí tiež uvádzajú účinok *Coniothyrium minitans* na životaschopnosť sklerócií i keď použili iný kmeň huby (A69). Ich kmeň redukoval životaschopnosť sklerócií na 0% po 4 týždňoch a na pôdnom substráte na 17% po dvoch týždňoch.

6. Závery

Z našich výsledkov sledovania vyplýva, že huba *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary sa vyznačuje vysokou morfológickou a genetickou variabilitou ale aj patogenitou medzi jednotlivými izolátmi pochádzajúcich z rôznych hostiteľských rastlín a z rôznych lokalít Slovenska a Alžírka. Dosažené výsledky možno zhrnúť do nasledovných bodov:

- Variabilita rastu mycélia izolátov huby *Sclerotinia sclerotiorum* bola v pozitívnej korelácii s teplotou (pri všetkých sledovaných izolátov najrýchlejší rast sme zistili pri teplote 25 °C, pričom izoláty rástli najpomalšie pri teplote 3°C).
- Vplyv svetla sa prejavil hlavne na tvorbu počtu sklerócií, ktorá bola podstatne vyššie za prítomnosti svetla ako za tmy.
- Veľkosť sklerócií bola v pozitívnej korelácii s neprítomnosťou svetla, najväčšie sklerócie sa tvorili za tmy.
- V morfológickej variabilite sme nezistili štatisticky preukazné rozdiely medzi izolátmi pôvodom z Alžírka a Slovenska.
- Zistili sme silnú variabilitu v patogenite izolátov *Sclerotinia sclerotiorum* (okrem niekoľkých výnimiek) každý izolát sa vyznačoval variabilitou v stupni patogenity, v závislosti od hostiteľskej odrody resp. hybridu.

- Izolát I₁ (kmeň z Alžírka) vykázal najvyššiu patogenitu ku všetkým testovaným odrodám rajčiaka jedlého a slnečnice ročnej. Uvedený kmeň pred 7 rokmi v pokusoch sa vyznačoval taktiež vysokým stupňom pathogenicity, čo naznačuje, že niektoré kmene si udržia silu patogenity vo forme sklerócií aj po rokoch skladovania.
- V rámci druhu *Sclerotinia sclerotiorum* sme nezistili žiadnu fyziologickú špecializáciu. Hoci slnečnica v podmienkach Alžírka nie je obecným hosťiteľom, izoláty boli patogénne ako na odrodách rajčiaka jedlého tak aj na hybridoch slnečnice ročnej.
- Hybridy slnečnice ročnej vykázali vyššiu citlivosť k napadnutiu izolátmi *Sclerotinia sclerotiorum* ako odrody rajčiaka jedlého. Medzi najodolnejšie odrody proti napadnutiu so *Sclerotinia sclerotiorum* patrili hybridy slnečnice NSH-45 a Alexandra.
- Pri rajčiaka jedlom medzi najodolnejšie odrody patrili Tajfun (F1) a Testa (F1), pričom vysokou náchylnosťou sa vyznačovala odroda Devín, u ktorej odrody odumreli všetky rastliny do 10 dní.
- Molekulárna analýza pomocou RAPD nepotvrdila jasné rozdiely medzi izolátmi pôvodom z Alžírka a zo Slovenska.
- Podľa Jacquardovej matrice genetickej podobnosti sa ukázalo, že slovenský izolát I3 je geneticky veľmi podobná k Alžírskému izolátu I1, podobne ako izolát I2 z Alžírka so slovenským izolátom I5.
- Uvedené zistenia sú ojedinelé kedy izoláty z rôznych geografických lokalít sú geneticky podobnejšie ako izoláty získané z lokalít Slovenska.
- Pri štúdiách myceliárnej interakcii medzi izolátmi alžírskych izoláty tvorili vzájomnú kompatibilnú reakciu čo tiež naznačuje ich genetickú homogenitu
- Neprítomnosť spoločnej myceliárnej kompatibilnej skupiny pri slovenských kmeňoch naznačuje existenciu ich vysokej genetickej heterogenity v populácii *Sclerotinia sclerotiorum*
- Medzi všetkými izolátmi iba kmeň I5 zo Slovenska bol kompatibilný so všetkými sledovanými izolátmi
- Pri použití *Coniothyrium minitans* ako bioagensa v skleníkových pokusoch sme potvrdili dobrú mykoparazitickú aktivitu proti bielej hnilobe
- Prípravok KONI na báze mykoparazitickej huby *Coniothyrium minitans* vykázal lepší ochranný potenciál ako prípravok Contans tiež na báze *Coniothyrium minitans*, zvlášť pri vyššom infekčnom tlaku.
- *Coniothyrium minitans* v oboch prípravkoch (KONI, Contans) mali deštruktívny vplyv na životaschopnosť sklerócií pri *Sclerotinia sclerotiorum*.
- Bioprodukt KONI sa vyznačoval väčšou schopnosťou potlačovať životaschopnosť sklerócií na všetkých skúšaných substrátoch
- Zo skúšaných substrátov piliny sa vyznačovali najväčšou potenciou pre redukciu životaschopnosti sklerócií huby *Sclerotinia sclerotiorum*

7. Prínos práce pre prax a ďalší rozvoj vednej disciplíny

Naše výsledky potvrdzujú, že huba *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary sa vyznačuje vysokou morfológickou a genetickou variabilitou ako aj variabilitou v patogenite medzi jednotlivými izolátmi pochádzajúcimi z rôznych hosťiteľských rastlín a z rôznych lokalít Alžírka a Slovenska.

- V našich štúdiách patogenity u rôznych izolátov *Sclerotinia sclerotiorum* sme zistili, že hosťiteľské rastliny (rajčiak jedlý, slnečnica ročná) sa líšia v citlivosti k rôznym kmeňom patogénna. Na základe získaných výsledkov odporúčame pre prax hybridy slnečnice s menšou náchylnosťou: NSH-45, Alexandra a Trezor a hybridy rajčiaka jedlého: Tajfun (F1), Testa (F1) ako aj odrodu Odéon.

- Podľa genetických analýz izolátov *Sclerotinia sclerotiorum* ukázali že v rámci druhu existuje vysoká genetická heterogenita. Táto práca je prvou kde izoláty *Sclerotinia sclerotiorum* zo Slovenska a Alžírka boli analyzované pomocou metódy RAPD/PCR. Odporúčame pokračovať v analýzach na širšej báze izolátov využitím nielen ďalších primerov ale aj iných techník ako napríklad PCR/RFLP.
- Zistili sme, že populácia slovenských kmeňov *Sclerotinia sclerotiorum* sa vyznačuje vysokou genetickou heterogenitou. Pretože *Sclerotinia sclerotiorum* je kosmopolitným patogénom ktorý je schopný dlhodobo udržať životaschopnosť v pôde vo forme sklerócií, odporúčame získať širšie poznatky o diverzite a distribúcii myceliárnych kompatibilných skupín na základe epidemiologických a pestovateľských štúdií využitím najrozšírenejších genotypov snečnice.
- Každoročné monitorovanie zmien v lokálnych populáciách podľa pestovateľských oblastí môže prispieť k účinnej pestovateľskej stratégii pre ochranu proti napadnutiu hubou *Sclerotinia sclerotiorum*.
- V skleníkových podmienkach sme potvrdili dobrý mikoparazitický účinok huby *Coniothyrium minitans* ako na redukciu napadnutia tak aj na životaschopnosť sklerócií parazitickej huby *Sclerotinia sclerotiorum*. Na báze *Coniothyrium minitans* biopreparát KONI bol účinnejší ako Contans, ale pre poľné podmienky treba rozšíriť sledovania v širších teplotných a vlhkosťových hraniciach.
- Pre biologický boj proti *Sclerotinia sclerotiorum* odporúčame izolovať nové kmene *Coniothyrium minitans* z pestovateľských oblastí Slovenska prípadne izolovať aj iných hyperparazitov ako napríklad baktérie *Pseudomonas fluorescence*, *Pseudomonas putida*, a *Bacillus subtilis*.

8. Summary

Sclerotinia sclerotiorum is an important plant pathogen that causes several diseases as white mold (Purdy, 1979; Boland and Hall, 1994), either market garden, ornamental or large scale cultures.

In Slovakia, *Sclerotinia sclerotiorum* is present in several locations and attacks various plants but it seems to be more important on sunflower. Diseases caused in economically important plants by *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary occurs worldwide, cause considerable damage, typically have been unpredictable and difficult to control culturally or chemically. Our work has been undertaken to provide more information about the morphology, genetics and pathogenicity of this pathogen. In this aim, we proceeded to the comparison of different isolates of *Sclerotinia sclerotiorum* from Algeria and Slovakia according to their morphological characteristics (mycelial growth, number, weight and size of sclerotia), the pathogenicity on different varieties of tomato and sunflower, the mycelial compatibility grouping and their genetics (RAPD/PCR). In a second part, we treated about the use of two products of *Coniothyrium minitans* (Contans and KONI) as biocontrol agents against the *Sclerotinia sclerotiorum* in glasshouse tomato trials and on different substrates *in vitro*.

Results have shown that the mycelial growth was positively correlated with the temperature. Indeed, the fastest mycelial growth was recorded at a temperature of 25°C for all isolates. The light also did have an effect on our isolates especially on the number of sclerotia formed which was much higher in the presence of light than in its absence. Contrarily, the size of sclerotia was positively correlated with the absence of light since the biggest sclerotia were obtained in the dark regime trial. Even though differences were found within our isolates in respect of the mycelial growth, size, number and weight, however, we were expecting to be able to show that a probable distinction can be made between isolates from Algeria and from Slovakia, but this was not possible.

The pathogenicity trials have shown that some exceptions, every isolate showed a variation in degree of pathogenicity dependent on the host and variety under consideration. Meanwhile, varieties of each host plant also showed variable degrees of susceptibility to the attack of the different isolates of *Sclerotinia sclerotiorum*. Sunflower was found to be less susceptible to the attack of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates as tomato plants which seemed to be more susceptible as more high pathogenic reactions were recorded within tomato trials.

Furthertmore, within tomato varieties, we have noticed that Tajfun F1 appeared to be the most resistant among all other varieties while among sunflower hybrids NSH-45 was the most resistant.

The RAPD analysis of our isolates did not confirm the clear distinction between Algerian and Slovak isolates as we were expecting, The data from our study suggested that a great genetic heterogeneity exists within *Sclerotinia sclerotiorum* isolates.

The mycelial compatibility grouping have shown that all Algerian isolates (I1, I2 and I6) produced compatible reactions between each other while Slovak isolates (I3, I4 and I5) were not all compatible to each other denoting that the Slovak strains present a great genetic heterogeneity.

The use of the two products KONI and Contans against *Sclerotinia sclerotiorum* have shown that the mode of application of the mycoparasites did have an effect on the efficiency of each inoculum in reducing the disease incidence. Though, the mycoparasite applied as a maize meal-perlite was far ahead more efficient in controlling the disease than the conidial suspension concerns KONI which exhibited an extraordinary potential to control the disease in comparison with Contans

The sclerotial viability of the pathogen was also successfully reduced by both kinds of *Coniothyrium minitans* (Contans and KONI) but with different levels of efficiency depending on the substrate and period considered. Indeed, from the results we concluded that *Coniothyrium minitans* either Contans or KONI had a detrimental effect on the sclerotial health of *Sclerotinia sclerotiorum*. However, we could observe that the KONI had a superior ability to reduce the sclerotial viability on almost all the substrates.

9. Použitá literatúra

ADAMS, P. B. - AYERS. W. A. 1979. Ecology of *Sclerotinia* species. *Phytopathology* 69, 1979, p. 896-899.

AGRIOS, G. N. 1978. Plant Pathology. 4th edition. Academic Press, San Diego, p. 803

BEDI, K. S. 1961. Factors affecting the variability of *Sclerotia of Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Indian Journal of Agricultural Sciences* 31, 1961, p. 236-245.

BIOVED, BT, 2004. Safety data sheet KONI, Hungary. 2004.

BLANCARD, D. 1998. Les maladies de la tomate: observer, identifier, lutter. Paris. INRA: p 320.

BOKOR, P.-HUDEC, K.-HUSZÁR, J. 2005. Rozšírenie patogéna *Sclerotinia sclerotiorum* v porastoch slnečnice na Slovensku. In.: Zborník referátov „ Prvé rastlinolekárské dni Slovenskej rastlinolekárskej spoločnosti, 25 – 26 január 2005, p. 75 – 79

BRIARD, M.-DUTERTRE, M.-BRYGOO, Y. 1997. Du nouveau du côté des *Sclerotinia*. Trois espèces...mais quelle variabilité!. *Phytoma-la defence des végétaux* n° 490, 1997, p. 15-19.

BUDGE, S. P. AND J. M. WHIPPS. 1991. Glasshouse trials of *Coniothyrium minitans* and *Trichoderma* species for the biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* in celery and lettuce. *Plant pathology* 40, 1991, p. 59-66.

- BUDGE, S. P.-MCQUILKEN, M. P.-FENELON, J. S.-WHIPPS, J. M. 1995. Use of *Coniothyrium minitans* and *Gliocladium virens* for biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* in glasshouse lettuce. *Biological Control* 5, 1995, p. 513-522.
- CARPENTER, M. A.-FRAMPTON, C.-STEWART, A. 1999. Genetic variation in New Zealand populations of the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 27, 1999, p. 13-21.
- DILLARD, H. R.-LUDWIG, J. W.-HUNTER, J. E. 1995. Conditioning sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* for carpogenic germination. *Plant disease* 79, 1995, p. 411-415.
- DOS SANTOS, A. F.-DHINGRA, O. D. 1980. Pathogenicity of *Trichoderma spp* on the sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Botany* 60, 1980, p. 472-475.
- DURAND, N.-REYMOND, P.-FÈVRE, M. 1993. Random amplified polymorphic DNAs assess recombination following an induced parasexual cycle in *Penicillium roqueforti*. *Current Genetics* 24, 1993, p. 43-48.
- DURMAN, S. B.-MENÉNDEZ, A. B.-GODEAS, A. M. 2003. Mycelial compatibility groups in Buenos Aires field populations of *Sclerotinia sclerotiorum* (Sclerotiniaceae). *Australian Journal of Botany* 51, 2003, p. 421-427.
- DUTTON, M. V.-EVANS, C. S. 1996. Oxalate production by fungi: its role in pathogenicity and ecology in the soil environment. *Canadian Journal of Microbiology* 42, 1996, p. 881-895.
- FODIL CHERIF, M. 1998. Etude des maladies dues au genre *Sclerotinia* sp sur cultures maraîchères. These. Ing. INA. El harrach. Alger.
- FRAISSINET, T.-REYMOND, L.-COTTON, P.-FÈVRE, M. 1996. Molecular karyotype of the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Current Genetics* 29, 1996, p. 496-501.
- FRAVEL, D.R.-ADAMS, P.B.-POTTS, W.E., 1992. Use of disease progress curves to study the effects of the biocontrol agent *Sporidesmium sclerotivorum* on lettuce drop. *Biocontrol Science and Technology* 2, 1992, p. 341-348.
- GERLAGH, M.-KRUSE, M.-VAN DE GEIJN, H. M.-WHIPPS, J. M. 1994. Growth and survival of *Coniothyrium minitans* on lettuce leaves in contact with soil in presence and absence of *Sclerotinia sclerotiorum*. *European Journal of Plant Pathology* 100, 1994, p. 55-59.
- 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*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 37, 1990, p. 179-191.
- GUIHUA, L. U. 2003. Engineering *Sclerotinia sclerotiorum* resistance in oilseed crops. *African Journal of Biotechnology* 2, n° 12, 2003, p. 509-512.
- GUIMARAES, R. L.-STOTZ, H. U. 2004. Oxalate production by *Sclerotinia sclerotiorum* deregulates guard cells during infection. *Plant Physiology* 136, 2004, p. 3703-3711
- HEDKE, K.-LÜTH, P.-VON TIEDEMANN, A. 1999. First biocontrol agent against *Sclerotinia sclerotiorum* in oilseed rape. 10th International Rapeseed Congress, Canberra, Australia, 1999.
- HUANG, H. C. 1977. Importance of *Coniothyrium minitans* in survival of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* in wilted sunflower. *Canadian Journal of Botany* 55, 1977, p. 289-295.
- HUANG, H. C. 1980. Control of *Sclerotinia* wilt of sunflower by Hyperparasites. *Canadian Journal of Plant Pathology* 2, 1980, p. 26-32.
- HUANG, H. C. 1985. Factors affecting myceliogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology* 75, 1985, p. 433-437.
- HUANG, H.C.-DUECK, J. 1980. Wilt of sunflower from infection by mycelial germinating sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 2, 1980, p. 47-52.

- HUANG, H. C.-KOKKO, E. G. 1989. Effects of temperature on melanization and myceliogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Botany* 67, 1989, p. 1387-1394.
- HUANG, H. S.-KOKKO, E. G. 1992. Pod rot of dry peas due to infection by ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease* 76, 1992, p. 597-600.
- HUANG, H.C.-KOZUB, G. C. 1990. Cyclic occurrence of sclerotinia wilt of sunflower in western Canadian. *Plant Disease* 74, 1990, p. 766-770.
- HUSZÁR, J.- BOKOR, P. 2004. Významné a nové choroby slnečnice ročnej. *Naše pole*, č. 6, 2004, p. 14 – 15
- HUSZÁR, J.-BOKOR, P. 2005. Výskyt chorôb slnečnice v ročníku 2004 *Naše pole*, č. 1, 2005, p. 34 – 37.
- HUSZÁR, J.-KULCSÁROVÁ, M. 2004. Výskyt chorôb slnečnice ročnej na Slovensku a použité metódy ochrany. *Agro* 5, 2004, p.: 24 – 27
- JONES, E. E.-STEWART, A., 1997. Biological control of *Sclerotinia minor* in lettuce using *Trichoderma* species. Proc. 50th New Zealand Plant Protection Conference, 1997, p. 154-158.
- JONES, E. E.-STEWART, A. 2000. Isolation of potential antagonists to *Sclerotinia sclerotiorum* from New Zealand soils. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Sciences* 28, 2000, p. 105-114.
- KAPOOR, K. S.-GILL, H. S.-SHARMA, S. R. 1987. Survival and carpogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Indian Phytopathology* 40, n° 4, 1987, p.500-502.
- KHON, L. M. 1979a. Delimitation of the economically important plant pathogenic *Sclerotinia* species. *Phytopathology* 69, n° 8, 1979, p. 881-886.
- KHON, L. M. 1979b. A monographic revision of the genus *Sclerotinia*. *Mycotaxon* 9, 1979, p. 365-444.
- KOHN, L. M. 1995. Clonal dispersal and spatial mixing in populations of the pathogenic fungus, *Sclerotinia sclerotiorum*. *Molecular Ecology*, 4, 1995, p. 69-77.
- KOHN, L. M.-CARBONE, I.-ANDERSON, J. B. 1990. Mycelial interactions in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Experimental. Mycology* 14, 1990, p. 255-267.
- KOHN, L. M.-STASOVSKI, E.-CARBONE, I.-ROYER, J.-ANDERSON, J. B. 1991. Mycelial incompatibility and molecular markers identify genetic variability in field populations of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology* 81, 1991, p. 480-485.
- KULL, L. S.-PEDERSEN, W. L.-HARTMAN, G. L. 2000. Aggressiveness and mycelial compatibility among isolates of *Sclerotinia sclerotiorum*. National American Phytopathology Meetings. *APS North Central Meetings*, Columbus, OH, June 2000.
- KULL, L. S.-PEDERSEN, W. L.-PALMQUIST, D.-HARTMAN, G. L. 2004. Mycelial compatibility grouping and aggressiveness of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease* Vol 88 n° 4, 2004, p. 325-332.
- LEROUX, P.-BASSELAT, B. 1984. Pourriture grise : la résistance aux fongicides de *Botrytis cinerea*. *Phytoma- la défense des végétaux* n°359, 1984, p. 25-30.
- LETOURNEAU, D. 1979. Morphology, cytology, and physiology of *Sclerotinia* species in culture. *Phytopathology* 69, 1979, p. 887-890.
- LYNCH, L. M.-EBBEN, M. H. 1986. The use of microorganisms to control plant disease. *Journal of Applied Bacteriology and Symptomatology* Supplement, 1986, p. 115-126.
- MAKKONEN, R.-POHJAKALLIO, O. 1960. On the parasites attacking the sclerotia of some fungi pathogenic to higher plants and on the resistance of these sclerotia to their parasites. *Acta Agriculturae Scandinavica* 10, 1960. p. 105-126.
- MARCIANO, P.- DI LENNA, P.- 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. *Physiological Plant Pathology* 22, 1983, p. 339-345.

- McQUILKEN, M. P.-WHIPPS, J. M. 1995. Production, survival and evaluation of solid-substrate inocula of *Coniothyrium minitans* against *Sclerotinia sclerotiorum*. *European Journal of Plant Pathology* 101, 1995, p. 101-10.
- MCLAREN, D. L.-HUANG, H. C.-RIMMER, S. R. 1996. Control of Apothecial Production of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Coniothyrium minitans* and *Talaromyces flavus*. *Plant Disease* 80 n°12, 1996, p. 1373-1378.
- MERRIMAN, P. R.-PYWELL, M.-HARRISON, G.-NANCARROW, J. 1979. Survival of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* and effects of cultivation practices on disease. *Soil Biology and Biochemistry* 11, 1979, p. 567-570.
- NOONAN, M. P.-GLARE, T. R.-HARVEY, I. C.-SANDS, D. C. 1996. Genetic comparison of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from New Zealand and USA. Hortnet Publications. NZPPS paper. 9p.
- POHRONEZNY, K. L. 1997. Compendium of tomato diseases. Ed. J.B. Jones, J.P. Jones, R.E. Stall et T. A. Zitter. APS Press, *the American Phytopathology Society* .St Paul, Minnesota (USA), p. 24-25.
- PRICE, K.-COLHOUN, J. 1975. Pathogenicity of isolates of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.)de Bary to several hosts . *Phytopathology* 83, 1975, p. 232-237.
- PURDY, L.H. 1955. Abrooder concept of the species *Sclerotinia sclerotiorum* based on variability. *Phytopathology* 45, 1955, p. 421-427.
- RABEENDRAN, N.-JONES, E.E.-STEWART, A. 1998. Isolation and In vitro screening of soil fungi for biological control of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Microbial Control of Plant Pathogens- Proc. 51st N.Z. Plant Protection Conf. 1998*, p.102- 106.
- TARIQ, V. N.-GUTTERIDGE, C. S.-JEFFRIES, P. 1985. Comparative studies of cultural and biochemical characteristics used for distinguishing species within *Sclerotinia*. *Transactions of the British Mycological Society* 84, n°3, 1990, p. 381-397.
- TRUTMANN, P.-KEANE, P. J.-MERRIMAN, P. R. 1982. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* on aerial parts of plants by hyperparasite *Coniothyrium minitans*. *Transactions of the British Mycological Society* 78, 1982, p. 521-529.
- WAIPARA, N. W.-HARVEY, I. C.-BOURDÔT, G. W. 1993. Pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on common thistle species and other pasture weeds. *Proceedings of the 46th New Zealand Plant Protection Conference*, 1993, p. 261-264.
- WHIPPS, J. M.-BUDGE, S. P. 1990. Screening for sclerotial mycoparasites of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mycological Research*. 94, 1990, p. 607-612.
- WHIPPS, J.M.-DAVIES, K.G. 2000. Success in biological control of plant pathogens and nematodes by microorganisms. In *Measures of Success in Biological Control* (G. Gurr and S.D. Wratten, eds), p. 231-269. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht..
- 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 Acids Research* 18, 1990, p. 6531-6535.
- WILLIS, C. B. 1971. Incubation temperature differentiates *Sclerotinia trifoliorum* from *S. sclerotiorum*. *Proceedings of the Canadian Phytopathological Society* 37, 1971, p. 21-30.
- WOODARD, K. E.-SIMPSON, C. E. 1993. Characterization of growth and sclerotial production of *Sclerotinia minor* isolated from peanut in Texas. *Plant disease* 77, 1993, p. 576-579.
- ZHOU, T.-BOLAND, G. J. 1999. Mycelial growth and production of oxalic acid by virulent isolates of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 21, 1999, p. 93-99

10. Zoznam publikovaných prác

1. HUSZÁR, J., GREGUŠKOVÁ, R., ARBAOUI, M.: Využitie biologickej ochrany na báze antagonistických húb rodu *Trichoderma* a *Coniothyrium* vo vzťahu k niektorým fytopatogénnym mikroorganizmom. Zborník konferencie k 50. Výročiu založenia Ústavu experimentálnej fytopatológie a entomológie SAV. "Ochrana rastlín v III. Miléniu" Smolenice, 1 – 2. októbra 2002 s. 69 – 71.
2. ARBAOUI, M. - HUSZÁR, J. - GREGUŠKOVÁ, R.: Comparison of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates originating from Algeria and Slovakia. In: In: Acta fytotechnica et zootecnica (Nitra, Slovakia), vol. 7, 2004, Special Number, p. 16-20 (50%)
3. HUSZÁR, J. – ARBAOUI, M. : Variabilita v raste mycélia rôznych kmeňov huby *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary v in vitro podmienkach. In.: Zborník referátov „ Prvé rastlinolekárské dni Slovenskej rastlinolekárskej spoločnosti, 25 – 26 január 2005 : 133 – 136

Aktívna účasť na vedeckých konferenciách

1. HUSZÁR, J. – GREGUŠKOVÁ, R. – ARBAOUI, M.: Využitie biologickej ochrany na báze antagonistických húb rodu *Trichoderma* a *Coniothyrium* vo vzťahu k niektorým fytopatogénnym mikroorganizmom. Medzinárodná konferencia „Ochrana rastlín v III. Miléniu“, Smolenice, 1. – 2. októbra 2002.
2. ARBAOUI, M. – HUSZÁR, J. – GREGUŠKOVÁ, R. : Porovnanie morfológických vlastností izolátov *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary pôvodom z Alžírsku a Slovenska. XVI. Slovenská a Česká konferencia o ochrane rastlín. Nitra, 16 – 17. september 2003.
3. HUSZÁR, J. - ARBAOUI, M. Variabilita v raste mycélia rôznych kmeňov huby *Sclerotinia sclerotiorum* (LIB) de Bary v in vitro podmienkach. Rastlinolekárské dni 2005, Nitra 25. 1. – 26. 1. 2005.