



СЕЛСКОСТОПАНСКА АКАДЕМИЯ, СОФИЯ



ДОБРУДЖАНСКИ ЗЕМЕДЕЛСКИ ИНТИТУТ
Гр. Генерал Тошево

КЕРАНКА КРАСИМИРОВА ЖЕЧЕВА

ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ АГРЕСИВНОТО И ГЕНЕТИЧНО
РАЗНООБРАЗИЕ ПРИ *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM* (LIB.) DE BARY
В БЪЛГАРИЯ



АВТОРЕФЕРАТ

ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА СТЕПЕН
„ДОКТОР“

ПРОФЕСИОНАЛНО НАПРАВЛЕНИЕ :6.2 РАСТИТЕЛНА ЗАЩИТА
НАУЧНА СПЕЦИАЛНОСТ „РАСТИТЕЛНА ЗАЩИТА“

Научен ръководител:
Проф. д-р Иван Димитров Киряков

ДОБРИЧ, 2025



СЕЛСКОСТОПАНСКА АКАДЕМИЯ, СОФИЯ



**ДОБРУДЖАНСКИ ЗЕМЕДЕЛСКИ ИНТИТУТ
Гр. Генерал Тошево**

КЕРАНКА КРАСИМИРОВА ЖЕЧЕВА

**ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ АГРЕСИВНОТО И ГЕНЕТИЧНО
РАЗНООБРАЗИЕ ПРИ *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM* (LIB.) DE BARY
В БЪЛГАРИЯ**

АВТОРЕФЕРАТ

**ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА
СТЕПЕН „ДОКТОР“**

ПРОФЕСИОНАЛНО НАПРАВЛЕНИЕ :6.2 РАСТИТЕЛНА ЗАЩИТА

ПРОФЕСИОНАЛНО НАПРАВЛЕНИЕ :6.2 РАСТИТЕЛНА ЗАЩИТА
НАУЧНА СПЕЦИАЛНОСТ „РАСТИТЕЛНА ЗАЩИТА“

Научен ръководител:
Проф. д-р Иван Димитров Киряков

ДОБРИЧ, 2025

Разработения дисертационен труд се състои от 145 страници, които включват 11 основни раздела и две приложения. Поместени са 22 таблици и 40 фигури отразяващи резултатите от експерименталната дейност. Представената информация е подкрепена с 230 литературни източника, два от които са на кирилица.

Експерименталната работа е изведена в Добруджански земеделски институт- гр. Генерал Тошево периода 2020 г. – 2024 г.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на заседание на разширен научен съвет на отдел „Селекция на зърнено-житни и бобови култури“ към ДЗИ – гр. Генерал Тошево (Протокол № 2025-1/15.01.2025).

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на в от часа на заседание на Научното жури, изд. със заповед №на председателя на Селскостопанска академия – София.

Научен ръководител:
проф. д-р Иван Димитров Киряков

Рецензенти:

Становища:

Благодарности:

Изказвам своята искрена благодарност на моя научен ръководител проф. д-р Иван Димитров Киряков за търпението, ценните съвети, избора на тема и помощта при разработване на темата и интерпретиране на резултатите. Неговият оптимизъм, професионализъм и тактически съвети бяха много полезни за моето изследване и бъдещата ми кариера

Благодаря на моята лаборантка Светла Колева за прецизното изпълнение на всички мероприятия при извеждане на опитите.

Изказвам своята благодарност на цялото ръководство на Добруджански земеделски институт - гр. Генерал Тошево за съдействието, което ми оказват.

Накрая, но не на последно място, благодаря на семейството ми и колектива за подкрепата, разбирането, помощта и огромното търпение, които бяха безценна опора за мен.

1. УВОД

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) De Bary е фитопатогенна гъба, отнесена към семейство *Sclerotiniaceae* на клас *Leotiomycetes*, отдел *Ascomycota*, чиито кръг от гостоприемници надвишава 400 растителни вида, преобладаващо двуседелни. Върху нападнатите органи гъбата формира черни склероции, чийто размер и форма варират в зависимост от гостоприемника и тъканите, в или върху които се формират. Нападението на гостоприемниците може да се осъществи директно, чрез прорастване на склероциите (мицелогенно развитие), или посредством аскоспори, формиращи в развити върху склероциите апотеции (карпогенно развитие). Икономическите щети, причинени от патогена, са свързани с растителния вид и използваните генотипи и могат да доведат до 100% загуба в добива. За условията на България развитието на *S. sclerotiorum* има преобладаващо мицелогенен характер.

Направената библиографска справка по отношение на *Sclerotinia sclerotiorum* показва, че за периода 1972-2024 год. изследванията в България, свързани с патогена, са насочени основно към проучване устойчивостта на генетичната плазма, разработване на методи за оценка на генетичния материал, морфологични и културални особености, влияние на абиотичните фактори и прилаганите земеделски практики за развитие и разпространение на гъбата, както и мерки за контрол, свързани с прилагане на биологични агенти и продукти за растителна защита. Не са установени литературни източници, свързани с проучвания върху агресивността и генетичното разнообразие на патогена у нас, които биха подпомогнали селекционните програми за устойчивост, както и разработването на подходящи земеделски практики за неговия контрол.

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящото изследване е да се проучи генетичното и агресивно разнообразие в популациите на *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary в България, с оглед повишаване ефективността на селекционния процес и разработване на адекватна стратегия за контрол на патогена.

За постигане на поставената цел са разработени следните по-важни задачи:

- Обследване на производствени площи от слънчоглед, рапица и фасул за определяне разпространението на *S. sclerotiorum* в България;
- Установяване морфологичните и културални особености на моносклероцидни изолати на *S. sclerotiorum*;
- Проучване генетичното разнообразие в популациите на *S. sclerotiorum* на основа мицелната съвместимост между изолатите;
- Установяване агресивното разнообразие в популациите на *S. sclerotiorum* в страната;
- Проучване физиологичната устойчивост на образци фасул при полски и контролируеми условия;
- Проучване устойчивостта на диви образци от род *Helianthus* и хибридни комбинации от междувидова хибридизация към стъблената форма на *S. sclerotiorum*.

3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

3.1. Събиране и съхранение на растителните проби.

През периода 2019-2021 год. са проведени обследвания на слънчогледови, рапични и фасулеви посеви в Северна и Южна България. От всяко производствено поле (локация) са събрани растения със симптоми на кореново и базично гниене. От нападнатите растения са отделени склероции, които са поставени в натронови кесии и съхранени при 4°C до момента на тяхното обработване. Събраните проби са номерирани с буквен и цифров код, включващ гостоприемника, година на събиране, локацията и номера на съответното растение.

3.2. Изолиране и съхранение на получените изолати.

За изолиране на патогена е използвана готова хранителна среда PDA (*HIMEDIA*). За целта склероциите са промити на течаща вода за период от 2-4 h, след което са стерилизирани повърхностно с 0.6% NaClO за 3 min, последвано от двукратно промиване със стерилна дестилирана вода. Стерилизираните склероции са подсушени на ламинарен бокс, след което са поставени върху хранителната среда, разлята в Петриеви блюда с диаметър 90 mm. Блюдата са инкубирани в термостат при 21±1°C, на тъмно. При достигане на диаметралния растеж на колонииите 4-5 cm от периферията е отрязан диск (5 mm) и поставен върху нова хранителна среда. Изолатите са инкубирани при същите условия до формиране на

склероции. Формираните склероции са подсушени на ламинарен бокс, след което са поставени в стъклени ампули с вместимост (5 ml) и съхранени в хладилник при 4°C до тяхното използване.

3.3. Определяне морфологичните и културалните характеристики на моносклероцийните изолати.

В изследването са включени 118 изолата от 17 пункта на България. За целта склероции от съответната моносклероцийна култура са дезинфекцирани повърхностно със 70% етилов алкохол за 1 min, двукратно промити със стерилна вода и след подсушаване са поставени върху среда PDA разлята в 90 mm Петриеви блюда. След три дни инкубиране при 21°C, на тъмно, от периферията на колониите е отрязан агаров диск с размер 5 mm и поставен върху нова хранителна среда. За всеки изолат са използвани по 3 блюда. Блюдата са инкубирани при 21°C, на тъмно. Диаметралният растеж на колониите е отчетен след 24 и 48 h инкубация. Инициацията на склероции и цветът на колониите е отчетен от 4 до 8 ден. Броят на склероциите, тяхното разпределение и теглото им в блюдо е отчетено 31 дни след начало на инкубиране.

3.4. Определяне мицелната съвместимост между изолатите.

3.4.1. Влияние на хранителната среда и периода на инкубация върху визуализацията на съвместима/несъвместима реакция.

В изследването са включени 19 моносклероцийни изолата. Съвместимостта на изолатите е установена по методиката, описана от Schafer and Kohn (2006). В изследването бяха използвани три хранителни среди: PDA, PDA+50 µl/L червен оцветител (PDAC+50) и PDA+80 µl/L (PDAC+80). Наличието на съвместима/несъвместима реакция между изолатите е отчетено след 5 и 7 дни. Отчетени са следните фенотипни изяви: MC (мицелна съвместимост) – сливане на колониите; G (бразда) – ясно изразена разделителна линия от горната страна на блюдата и липса на червена линия от долната страна на блюдата; SG/L – слабо изразена бразда и червена линия; SG/SL – слабо изразена черта и червена линия; G/L – бразда и червена линия; G/SL – бразда и слабо изразена линия. За съвместима реакция беше прието липсата на бразда в границата на контакт между изолатите.

3.4.2. Сформиране на мицелно съвместими групи (MCGs).

В изследването са включени 154 моносклероцийни изолата от проби, събрани през 2019-2021 год., от 17 локации в Северна и Южна

България. Съвместимостта и самосъвместимостта на изолатите е установена по метода на Schafer and Kohn (2006), като е използвана средата (PDAC+80). Отбелязването на локалните групи е на основа техния произход, както следва: NLN_{MCG} -, където N – номер на локацията, L – областта, в която е разположена локацията, N_{MCG} – пореден номер на установената в локацията съвместима група.

С оглед определяне на генетичното разнообразие между отделни локации и райони бяха проведени комплиментарни тестове с 94 моносклероцийни изолата, включени във вече сформирани локални MCG групи. Отбелязването на допълнителните групи е както следва: NLN_{MCG}^+ NLN_{MCG}^+ и т.н.

3.5. Определяне агресивността на изолатите по отношение на фасулев сорт ГТБ Блян и слънчогледов хибрид Деведа.

В изследването са включени два гостоприемника – фасулев сорт ГТБ Блян и слънчогледов хибрид Деведа, и 102 моносклероцийни изолата. Включените в изследването гостоприемници са засети в съдове с размер 45x30x10 cm, съдържаща почвено-торфена смес (1:1), и отгледани при температура 21-24/16-18°C, съответно ден/нощ. Заразяването на растенията е осъществено по Straw-метода (Petzoldt and Dickson, 1996), като фасулевите растения са инокулирани във фенофаза начало на формиране на 2-ри троен лист, а слънчогледовите – поява на 3-та двойка листа (Фиг. 1). За целта, главното стъбло на растението е отрязано на разстояние 2 cm от възела на примордиалните (не същински) листа на фасулевите растения и първа двойка листа на слънчогледовите растения. Върху отреза е поставена едностранно затворена пластмасова сламка (6 x 25 mm), съдържаща агаров диск с мицел, отрязан от периферията на 3-дневна култура върху PDA от тестирания изолат. С всеки изолат са инокулирани по 5 растения. След инокулиране растенията са инкубирани при температура 20-21/16-18°C, съответно ден/нощ. Резултатите са отчитани 5 и 7 дни след инокулиране за фасула и 3 и 5 дни при слънчогледа, като е измерена дължината на нападнатата тъкан от мястото на поставяне на инокулума в mm.



Фигура 1. STRAW-тест при фасул и слънчоглед за определяне агресивността на изолатите

3.6. Проучване устойчивостта на образци фасул към *Sclerotinia sclerotiorum*.

3.6.1. Полски изследвания.

Изследването е проведено при полски условия през 2021 и 2022 година. През 2021 год. са тествани 94 образци фасул, групирани в зависимост от хабитуса на храста. Образците са засети в два реда с дължина 3 m и междуредово разстояние 30 cm. Заразяването е осъществено по STRAW-метода, като фасулевите растения са инокулирани във фенофаза начало на бутонизация. За целта стъблото на растението е отрязано на разстояние 3 cm от последния листен възел. Върху отреза е поставена едностранно затворена пластмасова сламка, съдържаща агаров диск с мицел от изолати S19.19.5/1 или R19.17.1. Резултатите са отчетени на 14 дни след инокулиране по 9 бална скала (Фиг. 2). Класирането на образците спрямо тяхната реакция е както следва: Високо устойчиви (VR) – 1.0; Устойчиви (R) - 1.1- 3.0; Средно устойчиви (MR) – 3.1-5.0; Чувствителни (S) – 5.1-7.0; Високо чувствителни (VS) – над 7.0. През 2022 год. са тествани 21 образца, показали различна степен на физиологична устойчивост. Схемата на сеитба, изолатите, метода на заразяване и отчитане са същите, както през 2021 год.



Фигура 2. Девет бална скала за отчитане реакцията на фасула към *Sclerotinia sclerotiorum* (жълта стрелка – 1^{ви}; червена – 2^{ри}; синя- 3^{ти} възел)

3.6.2. Сравнително изпитване на два метода за установяване устойчивостта при фасула към *Sclerotinia sclerotiorum* при контролируеми условия.

Изследването е проведено при оранжерийни условия и включва 21 образци фасул. Проучена е ефикасността на два метода за определяне устойчивостта на включените в изследването образци фасул.

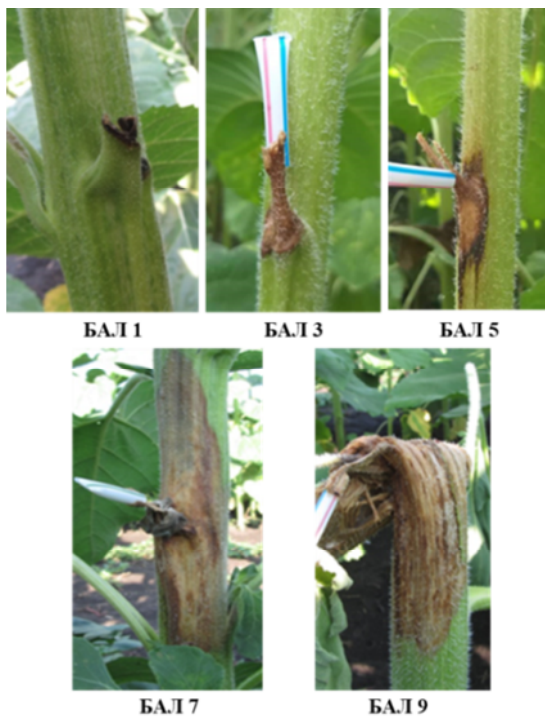
STRAW тест. Заразяването е осъществено във фенофаза напълно развит 1^{ви} троен лист. Централното стъбло на растенията е отрязано на височина 3 cm от възела на примордиалните листа, след което върху отреза е поставена едностранно затворена пластмасова сламка, съдържаща агаров диск с мицел на изолати R19171, S19323, S191951 или SS1914. От всеки образец са заразени по шест растения, като за контрола са използвани растения, върху които е поставена сламка с чист агаров диск. След инокулиране растенията са поставени при 22-24°C/16-18°C дневна/нощна температура. Реакцията на образците е отчетена 7 дни след инокулиране по 9 бална скала (Киряков и Генчев, 2002). На основа балната им оценка образците са групирани както следва: Високо устойчиви (VR) – 1.0; Устойчиви (R) - 1.1- 3.0; Средно устойчиви (MR) – 3.1-5.0; Чувствителни (S) – 5.1-7.0; Високо чувствителни (VS) – над 7.0.

Оксалов тест. Отрязаните преди заразяване по STRAW теста растителни органи (стъбло и листа) са поставени в съдове с 50 ml разтвор на оксалова киселина (20 mM доведен до pH=4.0 с 1 N NaOH). За контрола са използвани растения, потопени в стерилна вода, доведена до pH=4.0 с 1 N HCl. От всеки образец са използвани по пет растения. Растенията са поставени при температура 16-18°C. Резултатите са отчетени 19h (5h ден и 14h нош) след поставяне на растенията в разтворите по следната скала: 1 – липсват симптоми; 3- загуба на тургор по периферията на единични листчета; 5 – загуба на тургор по периферията на трите листчета от тройния лист; 7 – загуба на тургор над ½ от листната петура, побеляване на листната дръжка и стъблото; 9 – пълно увяхване на листата. На основа балната им оценка образците са групирани както следва: Високо устойчиви (VR) – 1.0; Устойчиви (R) - 1.1- 3.0; Средно устойчиви (MR) – 3.1-5.0; Чувствителни (S) – 5.1-7.0; Високо чувствителни (VS) – над 7.0 (Киряков и Генчев, 2002).

3.7. Устойчивост на диви образци и междувидови хибридни комбинации слънчоглед към стъблената форма на *Sclerotinia sclerotiorum*

Изследванията са проведени през 2019 и 2020 год. В изследването през 2019 год. са включени 15 хибридни комбинации от междувидова хибридизация с линия 712 А (културен *H. annuus*) и 10 диви образци *H. annuus*, използвани като родителски компоненти. Материалите бяха засети ръчно в редове с дължина 2 m, междуредово разстояние 0.7 m и вътре редово разстояние 0.30 m. Заразяването е осъществено във фенофаза бутонизация-цъфтеж по STRAW метода (Christov et al., 2004).

За целта дръжката на два листа от средните етажи за всеки генотип са отрязани на разстояние 2 cm от листния възел. В разреза е втъкната едностранно затворена пластмасова сламка - с агаров диск съдържащ, мицел на изолат Ss1814 или Ss1941, култивирани върху средата PDA. С всеки изолат са инокулирани по 4 растения от генотип. Като контрола са използвани растения, върху които е поставена сламка, съдържаща диск от чиста PDA. Резултатите са отчетени 14 дни след инокулиране по 9 бална скала (Фиг. 3): На основа средната им оценка генотипите са групирани както следва: 1- Високо устойчив (VR); 1.1-3.0 – Устойчив (R); 3.1-5.0 Средно устойчив (MR); 5.1-7.0 Чувствителен (S); над 7.0– Високо чувствителен(VS) (Christov et al., 2004).



Фигура 3. Девет бална скала за отчитане реакцията при слънчогледа към стъблената форма на *Sclerotinia sclerotiorum*

В изследването през 2020 год. са включени 29 едногодишни диви образци *Helianthus* ssp. от колекцията на ДЗИ - гр. Генерал Тошево, отгледани, инокулирани и отчетени както през 2019 год.

3.8. Статистически анализи на резултатите.

Генетичното разнообразие във всяка локация е установено чрез индекса на Shannon - $H_0 = h_0 / \ln k$, където $h_0 = -\sum(p_i \ln p_i)$, като p_i е честота на i -та в MCG (честотата се определя като съотношението между броя на изолатите, принадлежащи към i -тата MCG, и броя на изолатите в пробата), а k е размерът на извадката (Aban et al., 2018). Клоналният индекс (K_i) е изчислен за всяка популация като $K_i = 1 - [(\text{брой MCG}) / (\text{общ брой изолати})]$ (Aban et al., 2018, Yan et al., 2022).

Агресивността на изолатите е определена на база стойностите на площта под кривата на развитие (AUDPC):

$$\text{AUDCP} = \sum_{i=1}^{N-1} \frac{(Y_i + Y_{i+1})}{2} (t_{i+1} - t_i),$$

където y_i – размер на петното в началото на отчетния период, y_{i+1} – размер на петното в края на отчетния период, t_i – отчетен период (Simko and Piepho, 2012).

Проведени са еднофакторен и многофакторен дисперсионен анализ, корелационен анализ и клъстерен анализ с помощта на програмен продукт IBM SPSS (Statistics 19). Вариационният коефициент е изчислен с Microsoft Excel 2013.

4. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

4.1. Обследвани области и получени изолати.

От обработените през периода 2019-2021 год. 64 растителни проби -слънчоглед, фасул и рапица от 17 пункта на страната, са получени 168 изолата (Табл. 1). Степента на нападение по локации варира от 1% до 70%. Най-висока степен на нападение на базалната форма е наблюдавана през 2021 год. в локация S21.1 (Карнобат) – 70%. В останалите локации е установено нападение от единични растения.

Таблица 1. Произход на растителни проби и изолати през периода 2019-2021 год.

Код на локацията	Произход	Област	Брой проби	Степен на нападение (%)	Култура	Брой изолати
S19.3*	Дропла	Добрич	3	≤3	Слънчоглед	9
S19.5	Царичино	Добрич	3	≤3	Слънчоглед	9
S19.7	Кабиле	Ямбол	3	≤3	Слънчоглед	8
R19.8	Разград	Разград	1	≤1	Рапица	3
S19.9	Радко Димитриево	Шумен	1	≤1	Слънчоглед	1
S19.10	Риш	Шумен	2	≤1	Слънчоглед	6
S19.11	Риш	Шумен	1	≤1	Слънчоглед	3
S19.12	Вълчин	Бургас	5	5	Слънчоглед	15
R19.13	Стралджа	Ямбол	5	5	Рапица	10
S19.15	Ловеч	Ловеч	2	≤1	Слънчоглед	4
S19.16	Селановци	Враца	5	5	Слънчоглед	15
R19.17	Сливо поле	Русе	2	≤1	Рапица	6
S19.18	Сенокос	Добрич	1	≤1	Слънчоглед	1
S19.19	Ген. Тошево1	Добрич	5	5	Слънчоглед	13
S19.20	Ген. Тошево2	Добрич	2	≤1	Слънчоглед	3
S20.1	Поройно	Силистра	6	40	Слънчоглед	18
S20.2	Ситово	Силистра	2	≤1	Слънчоглед	6
S20.4	Сливо поле	Русе	4	≤3	Слънчоглед	12
S21.1	Карнобат	Бургас	9	70	Слънчоглед	24
SS1.4	Ген. Тошево3	Добрич	1	≤1	Фасул	1
SS4.1	Ген. Тошево4	Добрич	1	≤1	Слънчоглед	1
Общ брой			64			168

*Първата цифра в кода е година на събиране на пробите, а втората номер на локацията

4.2. Морфологични и културални характеристики на изолатите.

4.2.1. Морфология на колонииите.

След култивиране на 118 изолата на *S. sclerotiorum* върху средата PDA се наблюдават 3 типа растеж на колонииите - разпръснат, гладък и пухкав (Фиг.4). С най-голям процент се характеризират изолатите, притежаващи гладък тип на колонииите - 78%. Пухкав тип на мицела се наблюдава при 13%, а разпръснат при 9%. По отношение на оцветяването на колонииите проучваните изолати се групират в 3 групи – бежов, кафяв и бял цвят. При 7% от изолатите се наблюдава кафяво оцветяване на колонииите. Бежов цвят на колонииите е отчетен при 25 %, а най-висок процент е наблюдаван при изолатите с бял цвят на колонииите - 68 %.

Основавайки се на разположението на склероции в блюдо, проучваните изолати се групират в 4 групи: Най-голям процент от тестираните изолати са с подредени по ръба на блюдото склероции - 48%, следвани от изолатите с разположение на склероциите под формата на периферен пръстен -31%, разпръснати склероции - 14% и 7% при изолатите с под периферен пръстен.



Фигура 4. Морфологични особености на изолати от *S. sclerotiorum*

4.2.2 Диаметрален растеж и скорост на развитие.

Диаметралният растеж при проучваните изолати, след 48 h инкубиране върху средата PDA, варира от 29.50 за локация S19.3, до 90.00 mm, при средна стойност 82.00 mm, като разликите между тези стойности са достоверни ($LSD_{0.05}=1,52$) (Табл. 2) В седем локации максималният диаметралният растеж на изолатите достига 90 mm. Установени са значими разлики между минималните и максималните стойности, както в отделните локации, така и между локациите. Скоростта на нарастване на колонии варира от 0.61 до 1.88 mm/h. При осем локации - S19.3; S19.5; S19.10; S19.12; S19.16; S19.19; S20.1; S21.1,

е отчетена максимална скорост на нарастване 1,88 mm/h (Табл. 2). Установена е функционална зависимост ($r=1$, $P<0.001$) между диаметралния растеж и скоростта на нарастване.

Таблица 2. Диаметрален растеж (mm) и скорост на нарастване на 118 изолата от *S. sclerotiorum*, по локации, след 48 h инкубация при 21°C върху хранителната среда PDA

Код на локацията	Брой изолати	Диаметрален растеж (mm)				Скорост на нарастване (mm/h)			
		MIN	MAX	AVR	VC%	MIN	MAX	AVR	CV%
S19.3.	7	29,50	90,00	72,29	28,29	0,61	1,88	1,51	28,29
S19.5.	9	82,75	90,00	87,75	2,83	1,72	1,88	1,83	2,83
R19.8.	1	69,25	69,25	69,25	-	1,44	1,44	1,44	-
S19.9.	1	64,50	64,50	64,50	-	1,34	1,34	1,34	-
S19.10.	5	79,50	90,00	87,15	5,25	1,66	1,88	1,82	5,25
S19.11.	2	46,25	51,50	48,88	7,60	0,96	1,07	1,02	7,6
S19.12.	13	51,25	90,00	77,62	18,4	1,07	1,88	1,62	18,4
R19.13.	7	77,00	87,50	84,18	4,39	1,60	1,82	1,75	4,39
S19.15.	2	77,75	87,25	82,50	8,14	1,62	1,82	1,72	8,14
S19.16.	14	72,00	90,00	85,63	1,05	1,50	1,88	1,78	6,53
S19.17.	4	87,50	89,25	88,13	0,88	1,82	1,86	1,84	0,88
S19.19.	11	65,00	90,00	83,07	8,41	1,35	1,88	1,73	8,41
S19.20.	5	82,25	88,50	85,00	3,31	1,71	1,84	1,77	3,31
S20.1.	11	57,5	90,00	80,34	11,64	1,20	1,88	1,67	11,64
S21.1.	24	70,25	90,00	84,85	7,90	1,46	1,88	1,77	7,9
SS1.4	1	63,75	63,80	63,75	-	1,33	1,33	1,33	-
SS4.1	1	76,25	76,30	76,25	-	1,59	1,59	1,59	-
<i>Средно</i>	<i>118</i>	<i>67,78</i>	<i>82,23</i>	<i>77,71</i>		<i>1,41</i>	<i>1,71</i>	<i>1,62</i>	

LSD_{0,05}=3.00 за min и max на диаметрален растеж;

LSD_{0,05}=0.63 за min и max на скорост

4.2.3. Брой и тегло на склероциите в блюдо.

Броят склероции в блюдо варира от 18 до 114, като разликите между минималните и максимални стойности на изолатите, както в отделни локации, така и между локациите са достоверни. Минималната стойност при локация S19.20 (Генерал Тошево 2) 18 бр. склероции в блюдо, като се наблюдават положителни достоверни разлики спрямо всички проучвани изолати. Максимална стойност за склероции се наблюдава при локация S20.1 (Поройно – 114 бр.) следвана от S19.5 (Царичино – 110.5 бр.), като не са установени достоверни разлики, но разликите спрямо останалите 15 локации са достоверни. Теглото на склероциите в блюдо варира от 0.042 g (Генерал Тошево 2) до 0.89 g

(Ген. Тошево 1). Установена е значителна корелационна зависимост между броя и теглото на склероциите в блюдо ($r=0.546$, $P<0.001$), но слаба спрямо диаметралния растеж и скоростта на нарастване ($r=0.207$, $P>0.05$).

Таблица 3. Брой и тегло на склероциите в блюдо (g) при 118 изолата от *S.sclerotiorum* след 30 дни инкубация при 21°C върху хранителната среда PDA

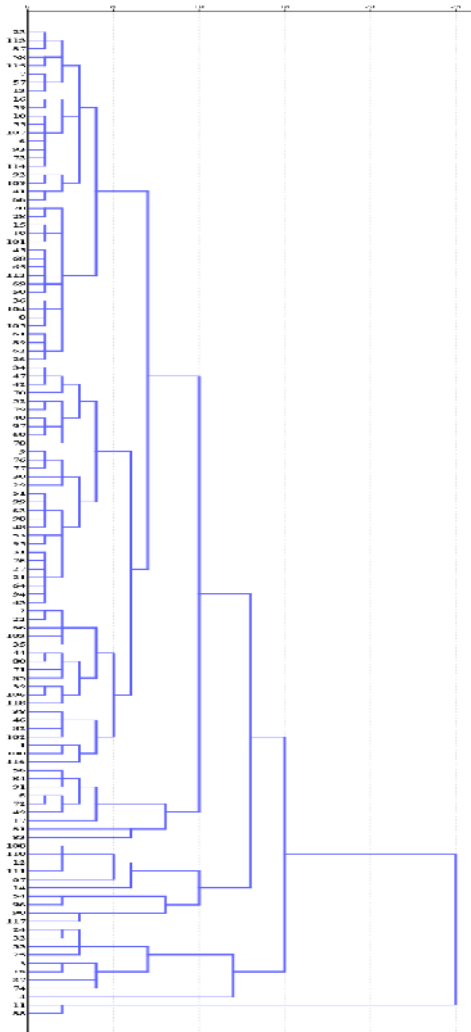
Код на локацията	Брой изолати	Брой склероции на блюдо				Тегло на склероции в блюдо (g)			
		MIN	MAX	AVR	CV%	MIN	MAX	AVR	CV%
S19.3	7	39,0	71,5	56,29	19,05	0,15	0,69	0,36	51,42
S19.5	9	46,5	110,5	70,5	28,30	0,194	0,55	0,36	36,28
R19.8	1	36,0	36,0	36,0	-	0,211	0,21	0,21	-
S19.9	1	48,0	48,0	48,0	-	0,269	0,27	0,27	-
S19.10	5	46,5	66,5	58,3	12,90	0,205	0,45	0,33	26,37
S19.11	2	56,0	58,0	57,0	2,48	0,155	0,26	0,21	34,84
S19.12	13	39,5	57,5	51,19	10,02	0,078	0,46	0,33	32,14
R19.13	7	40,0	63,5	51,57	15,67	0,214	0,48	0,34	28,87
S19.15	2	39,5	49,5	44,5	15,89	0,164	0,17	0,17	2,08
S19.16	14	37,5	71,0	53,79	19,75	0,139	0,49	0,29	35,89
S19.17	4	49,5	58,0	53,25	7,84	0,32	0,44	0,4	13,46
S19.19	11	39,0	71,5	54,05	19,00	0,184	0,89	0,37	50,81
S19.20	5	18,0	54,5	40,9	33,76	0,042	0,58	0,29	67,03
S20.1	11	29,5	114,0	58,55	41,43	0,078	0,56	0,28	45,84
S21.1	24	45,0	79,0	59,5	16,98	0,167	0,66	0,35	33,99
SS1.4	1	80,5	80,5	80,5	-	0,382	0,38	0,38	-
SS4.1	1	57,5	57,5	57,5	-	0,522	0,52	0,52	-
<i>Средно</i>	118	43,97	67,47	54,79		0,20	0,47	0,32	

LSD_{0,05}=10.67 за min и max на брой склероции;

LSD_{0,05}=0.14 за min и max на тегло в блюдо

Получените резултати показват, че независимо от наличието на достоверни разлики между популациите на патогена в отделните локации, техните културални характеристики не са свързани с произхода на изолатите.

Проведения клъстерен анализ показва липсата на връзка между диаметралния растеж, броят на склероции и тяхното тегло с географския произход и гостоприемника от който са изолирани. Изолати от един и същ произход попадат в различни клъстери (Фиг.5).

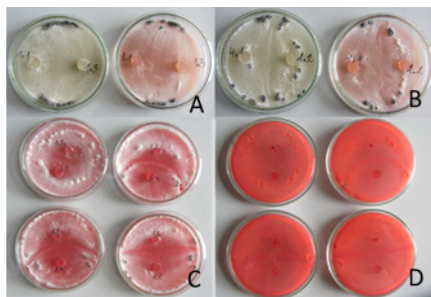


Фигура 5. Дендограма представяща Евклидовата дистанция между 118 изолата на основа културалните им характеристики (диаметрален растеж, скорост на развитие, брой склероции и тегло на склероциите в блюдо)

4.3. Генетично разнообразие в популациите на *Sclerotinia sclerotiorum*.

4.3.1 Влияние на хранителната среда и периода на инкубация върху визуализацията на съвместима/несъвместима реакция.

Разработвайки методиката за определяне на мицелната съвместимост /несъвместимост между 19 изолата на *S. Sclerotiorum* се установява, че хранителната среда PDAC+ оцветител ни дава по-добра визуализация. Резултатите от теста показват, че използваният оцветител не оказва влияние върху развитието на изолатите. На *фигура 6* е представена съвместима и несъвместима реакция между изолати на гъбата върху PDA и PDAC+50. При тази концентрация на оцветителя разделителната линия (бразда) между несъвместимите изолати е значително по-ясно отчетлива от тази при средата без оцветител. Повишаване количеството на оцветителя в средата на 80 μL дава възможност за по-ясно очертаване на разделителната линия, както и за добре изразена червена линия от долната страна на блюдата (*Фиг. 6*). Оптималния период за отчитане е между 4 и 7 дени на инкубация. Резултатите от изследването показват, че след 5 дни инкубиране на изолатите разграничителната линия е значително по-ясно изразена, но в колониите не се наблюдава формиране на склероции. На седмия ден разграничителната линия е по тънка, а в колониите се наблюдават формирани склероции, които са разположени от двете страни на разделителната линия. Успоредно с това на седмия ден от долната страна на блюдата се наблюдава по-ясно изразена червена линия



Фигура 6. Фенотипна изява при комплиментарни тестове за
СЪВМЕСТИМОСТ.

A- съвместима реакция върху среди PDA и PDAC+50; B – несъвместима реакция върху PDA и PDAC+50; C – Съвместима и несъвместима реакция върху PDAC+80, горна страна; D - Съвместима и несъвместима реакция върху PDAC+80, долна страна

4.3.2. Мицелно съвместими групи в отделни локации.

Проучваните 154 моносклероцийни изолата на *S. sclerotiorum* са самосъвместими, което дава възможност за по-нататъшното им включване в изследването. Общо изолатите от отделните локации сформират 108 локални MCGs, като индексът на Shannon (Htot) за цялата

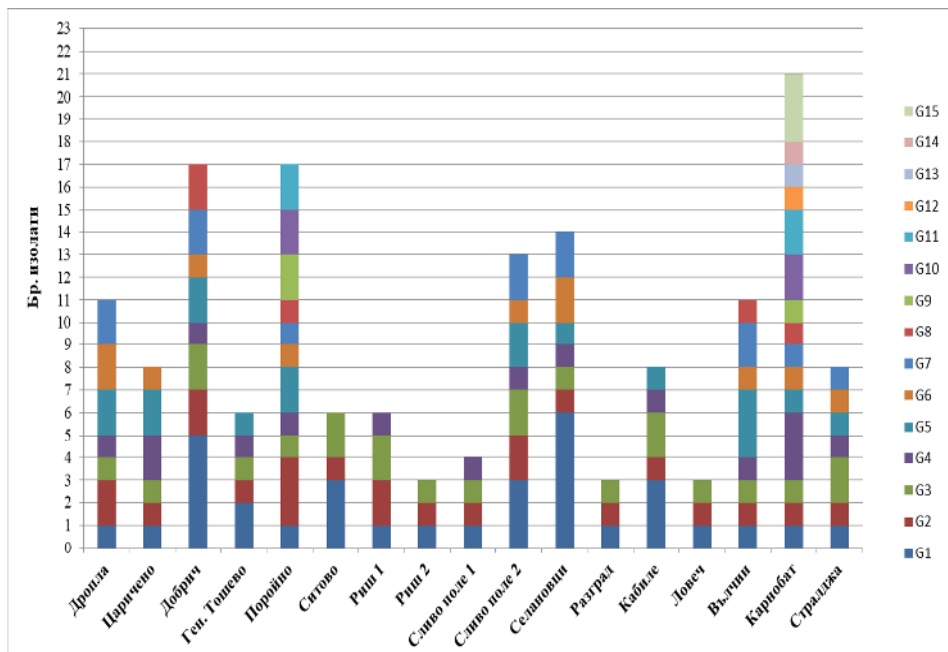
популация възлиза на 0.895 (Табл.4, Фиг. 7). Шестдесет и пет или 42.2% от проучваните изолати сформират самостоятелна група, като в отделните локации този процент варира от 25 до 100%. Тридесет от групите са изградени от 2 изолата (19.5%), 8 от 3 (5.2%), и по една съответно с 5 (0,5%) и 6 (0,5%) изолата. При 3.9% от изолатите се наблюдава участие на един и същ изолат в повече от една MCG. Пет процента от изолатите, получени от единични растения, са отнесени към различни MCGs, което е показател за успоредно заразяване на растенията с повече от един генотип. Клоналният индекс за всички популации възлиза на 0,299.

Таблица 4. Локални мицелно съвместими групи (MCG) на *S. sclerotiorum* в 17 локации от 9 области в България

Област	Произход	Култура	Брой изолати	Брой MCGs	Код на MCG	H ₀ *	K _i **
Добрич	Дропла	Слънчоглед	8	7	1D1-1D7	0,875	0,125
	Царичино	Слънчоглед	8	6	2D1-2D6	0,833	0,250
	Добрич	Слънчоглед	13	8	3D1-3D8	0,746	0,385
	Ген.Тошево	Слънчоглед	6	5	4D1-4D5	0,871	0,167
Силистра	Поройно	Слънчоглед	17	11	1S1-1S11	0,828	0,353
	Ситово	Слънчоглед	6	3	2S1-2S3	0,564	0,500
Русе	Сливо поле 1	Рапица	6	4	1RU1-1RU4	0,693	0,333
	Сливо поле 2	Слънчоглед	12	7	2RU1-2RU7	0,787	0,417
Шумен	Риш 1	Слънчоглед	6	4	1SH1-1SH4	0,742	0,333
	Риш 2	Слънчоглед	3	3	2SH1-2SH3	1,000	0,000
Бургас	Вълчин	Слънчоглед	11	8	1B1-1B8	0,822	0,273
	Карнобат	Слънчоглед	20	15	2B1-2B15	0,894	0,250
Ямбол	Стралджа	Слънчоглед	9	8	1Y1-1Y8	0,929	0,111
	Кабиле	Слънчоглед	8	5	1R1-1R5	0,718	0,375
Ловеч	Ловеч	Слънчоглед	4	4	1L1-1L4	1,000	0,000
Враца	Селановци	Слънчоглед	14	7	1V1-1V7	0,634	0,500
Разград	Разград	Рапица	3	3	2R1-2R3	1,000	0,000
Общо			154	108		0,895	0,299

*Индекс на Shannon: H₀ - нормализирано MCG разнообразие; H_{prop} – средно за H₀ (0.825); съотношението на общото разнообразие на MCG, резултат на вариране между индивидите в популацията (H_{prop}/tot) = 0.922; съотношение на общото многообразие на MCG, резултат от наблюдаваните различия между популациите (H_{tot} – H_{prop}/H_{tot}) = 0.778.

**K_i – клонален индекс



Фигура 7. Брой на изолатите в установените MCGs (G1 до G15 отразява броя на установените MCGs в съответната локация)

4.3.3. Съвместимост на изолатите от различни локации.

При проучване на съвместимостта между 94 изолата от различни локации, участващи в сформираните локални групи, бяха проведени шест комплементарни теста, в които се сформират 10 междулокални съвместими групи (Табл.5). При четири от тестовете - Кабиле-Разград, Риш 1-Риш 2, Сливо поле 1-Сливо поле 2, Добрич-Сливо поле 1-Вълчин-Стралжа-Селановци - не беше установена съвместимост между изолатите от различните локации. В петти тест се сформират 8 обобщени групи, като една от тях (1D5x2D4x1SH3x1Y8) включва шест изолата от четири локации (Дропла-Царичино-Риш 1-Стралджа), разположени в три области на страната. В шестия тест, включващ 20 изолата от пет локации, се сформират две съвместими групи -1D3x4D2x1B2 и 2D5x1V7 (Табл. 5). Обединена група 1D3x4D2x1B2 включва три изолата от Дропла, Добрич и Вълчин, а 2D5x1V7 от Царичино и Селановци.

Таблица 5. Съвместимост между изолати на *S. sclerotiorum* от различни локации

Добрич			Русе		Шумен		Бургас	Ямбол		Враца	Разград	Общ. брой изолати
Дрепан	Царичино	Добрич	Сливо поле 1	Сливо поле 2	Рип 1	Рип 2	Вълчан	Стралжа	Хабане	Селановци	Разград	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	NO ³⁸	-	NO ³³	11
-	-	-	-	-	NO ³⁰	NO ³⁰	-	-	-	-	-	8
-	-	-	NO ⁶⁶	NO ⁸	-	-	-	-	-	-	-	14
-	-	NO ²⁷	NO ³⁰	-	-	-	NO ¹⁴	NO ⁴	-	NO ¹³	-	20
1D ⁵¹	2D ¹²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21
1D ⁵²	2D ¹⁶	-	-	-	1S13 ²	-	-	1Y8 ¹	-	-	-	
1D ⁵³	-	-	-	-	-	-	1B5 ¹	-	-	-	-	
1D ⁶¹	2D ⁵¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1D ¹⁸	-	-	-	-	-	-	1B5 ³	-	-	-	-	
-	2D ³⁶	-	-	-	-	-	1B5 ³	-	-	-	-	
1D ⁵¹	2D ⁵¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
-	-	-	-	-	-	-	1B5 ¹	1Y8 ¹	-	-	-	20
1D ¹³	-	4D ¹⁷	-	-	-	-	1B ²¹	-	-	-	-	
-	2D ⁵¹	-	-	-	-	-	-	-	1V7 ¹	-	-	

*Брой на изолатите включени в обединената MCG/общ брой на изолатите от локацията включени в теста.

4.4. Агресивност на изолатите.

4.4.1. Агресивност на изолатите към фасулев сорт ГТБ Блян.

Площта под кривата на развитие (AUDPC) за 102 изолата при сорт ГТБ Блян варира от 114.4 до 455.4, като разликите между тях са достоверни при $LSD_{0.05}$ (44.47) (Табл.6). Минималната стойност при проучваните локации е най-ниска при локацията S19.5 (Царичино), а най-висока при S19.17 (Сливо поле 1). Максималните стойности в локациите варират от 179.8 за R19.8 (Разград) до 455.40 за S19.16 (Селановци). При 13 локации се наблюдават достоверни разлики спрямо най-ниската стойност на AUDPC (114.40), като такива не са установени между локации S19.3, S19.5, S19.10 и S19.12. Спрямо най-високата стойност на показателя (455.40) не са установени разлики при седем от локациите. Тези резултати показват, че агресивността на изолатите спрямо ГТБ Блян не е свързана с географското разпространение на изолатите. Вариационният коефициент в локациите с повече от един изолат варира от 7.32 до 44.12%, което показва, че изолатите от една локация варират по своята агресивност по отношение на фасула.

Таблица 6. Агресивност на 102 изолата от *S. sclerotiorum* към сорт ГТБ Блян, по произходи

Код	Произход	Област	Брой изолати	Пореден номер	MIN	MAX	AVR	CV%
S19.3	Дропла	Добрич	9	1-9	138,40	395,00	209,58	44,12
S19.5	Царичино	Добрич	9	10-18	114,40	393,80	260,04	42,13
R19.8	Разград	Разград	1	19	179,80	179,80	179,80	-
S19.10	Риш 1	Шумен	5	20-24	157,00	362,60	262,32	30,27
S19.11	Риш 2	Шумен	1	25	357,20	357,20	357,20	-
S19.12	Вълчин	Бургас	10	26-35	141,60	417,80	272,04	38,25
R19.13	Стралджа	Ямбол	6	36-41	200,40	438,80	326,13	25,92
S19.15	Ловеч	Ловеч	3	42-44	270,60	349,00	334,00	12,66
S19.16	Селановци	Враца	11	45-55	240,60	455,40	384,07	15,55
S19.17	Сливо поле 1	Русе	3	56-58	385,80	437,60	415,07	6,40
S19.18	Сенокос	Добрич	1	59	299,00	299,00	299,00	-
S19.19	Ген.Тошево 1	Добрич	9	60-68	165,60	438,60	357,92	22,84
S19.20	Ген.Тошево 2	Добрич	4	69-72	362,20	436,20	406,40	8,13
S20.1	Поройно	Силистра	6	73-78	236,00	370,60	299,80	19,48
S20.2	Ситово	Силистра	4	79-82	288,80	376,60	331,90	12,37
S20.4	Сливо поле 2	Русе	2	83-84	196,00	392,20	294,10	47,17
S21.1	Карнобат	Бургас	18	85-102	301,40	412,80	371,29	7,32
<i>Средно</i>			102		237,34	383,12		
<i>LSD_{0,05}</i>					44,47			

4.4.2. Агресивност на изолатите към слънчогледов хибрид Деведа

Площта под кривата на развитие (AUDPC) за 102 изолата при хибрид Деведа варира от 104.0 до 521.8, като разликите между тях са достоверни при $LSD_{0,05}$ (62.05) (Табл. 7). Минималната стойност при проучваните локации е най-ниска при локацията S19.3 (Дропла), а най-висока при S19.18 (Сенокос). Максималните стойности в локациите варират от 259.2 за R19.8 (Разград) до 521.8 за S19.19 (Генерал Тошево 1). Не са установени достоверни разлики в минималната стойност на AUDPC (104.0) между локации S19.3 и S19.12. Спрямо максималната стойност на показателя (521.8) не се наблюдават разлики в четири от проучваните локации. Тези резултати потвърждават липсата на връзка между географския произход и агресивността на изолатите спрямо хибрид Деведа. Вариационният коефициент в локациите с повече от един изолат варира от 4.47 до 30.93%, което показва, че в някои локации се наблюдават различия в агресивността на изолатите.

Таблица 7. Агресивност на 102 изолата от *S. sclerotiorum* към хибрид Деведа по произходи

Код	Произход	Област	Брой изолати	Пореден номер	MIN	MAX	AVR	CV%
S19.3	Дропла	Добрич	9	1-9	104,00	352,00	259,73	30,93
S19.5	Царичино	Добрич	9	10-18	247,00	514,00	331,91	24,74
R19.8	Разград	Разград	1	19	259,20	259,20	259,20	-
S19.10	Риш 1	Шумен	5	20-24	232,00	395,20	298,40	21,25
S19.11	Риш 2	Шумен	1	25	278,20	278,20	278,20	-
S19.12	Вълчин	Бургас	10	26-35	159,80	502,00	299,42	33,95
R19.13	Стралджа	Ямбол	6	36-41	239,80	377,80	296,67	17,19
S19.15	Ловеч	Ловеч	3	42-44	255,80	300,20	282,87	8,39
S19.16	Селановци	Враца	11	45-55	292,00	414,00	358,27	11,84
S19.17	Сливо поле1	Русе	3	56-58	323,40	487,20	386,40	22,83
S19.18	Сенокос	Добрич	1	59	335,00	335,00	335,00	-
S19.19	Ген. Тошево1	Добрич	9	60-68	230,00	521,80	405,04	29,32
S19.20	Ген.Тошево2	Добрич	4	69-72	331,00	363,20	345,65	4,74
S20.1	Поройно	Силистра	6	73-78	221,00	296,20	259,87	11,52
S20.2	Ситово	Силистра	4	79-82	233,00	332,40	300,95	15,45
S20.4	Сливо поле2	Русе	2	83-84	255,60	353,60	304,60	22,75
S21.1	Карнобат	Бургас	18	85-102	231,40	388,40	301,46	17,72
<i>Средно</i>			<i>102</i>		<i>248,72</i>	<i>380,61</i>	<i>311,98</i>	
<i>LSD_{0,05}</i>					<i>62,05</i>			

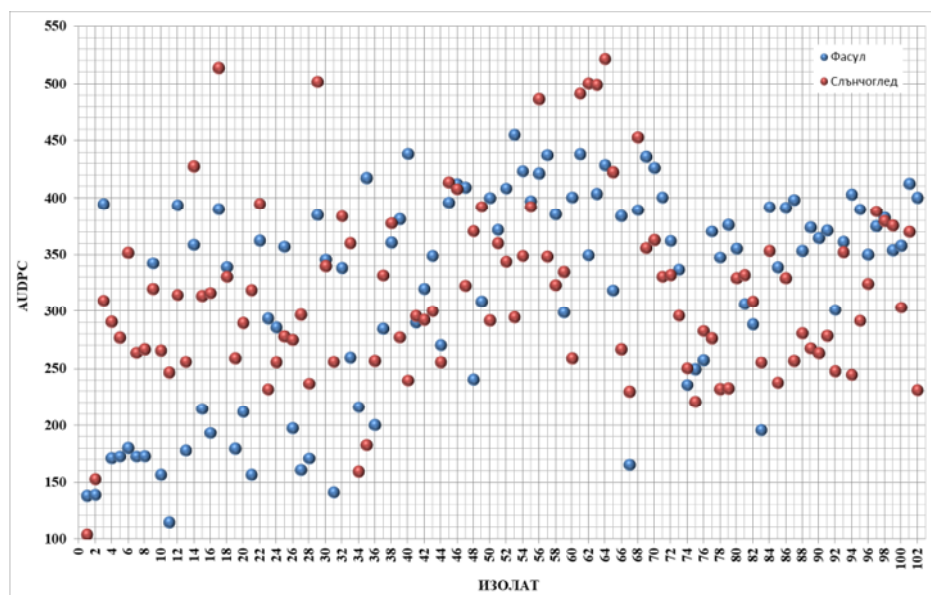
4.4.3. Агресивност на изолатите към двата гостоприемника.

Анализът на варианса за стойностите на AUDPC към двата гостоприемника показва достоверно влияние на фактора *Изолат* ($F=28.094$; $P<0.001$) и комбинираното влияние на фактори *Изолата x Културата* ($F=10.514$; $P<0.001$), докато самостоятелното влияние на фактор *Култура* ($F=2.513$; $P>0.05$) е с ниска степен на достоверност.

Средната максимална стойност на AUDPC, по отношение на двата гостоприемника варира от 121.2 до 475.4, като разликите при $LSD_{0,05}$ са достоверни. При 35 изолата се наблюдава по-висока агресивност към сорт ГТБ Блян, като разликите са достоверни (Фиг. 8). Тридесет и един изолата са по-високо агресивни към хибрид Деведа. При останалите изолати не се наблюдават достоверни разлики по отношение на агресивността им към двата гостоприемника.

Проведеният корелационен анализ показва умерена, положителна зависимост между агресивността на изолатите към двата гостоприемника и скоростта на нарастване на колонии ($r=0.311$, $P=0.05$). Установена е слаба, но с незначителна, достоверна зависимост между MCGs и средните стойности на AUPDC средно за двата гостоприемника ($r=0.140$,

$P > 0.05$). Проведените кълстерни анализи групират проучваните изолати от различни локации в общи подгрупи, което е показател, че тяхната агресивност не е свързана с географското им разположение и гостоприемника, от който са изолирани.



Фигура 8. AUDPC за 102 изолата на *S. sclerotiorum*, средно за двата гостоприемника ($LSD_{0,05}=53.99$).

Поредният номер на изолатите в съответните локации е посочен в таблици 6 и 7.

4.5. Физиологична устойчивост на образци фасул към *Sclerotinia sclerotiorum*.

4.5.1. Полски изследвания.

Резултатите от проведения през 2021 год. полски анализ за физиологична устойчивост при 89 образци фасул показват, че 30.33% от образците реагират с чувствителна до високо чувствителна реакция към изолат S19.19.5/1, а 34.83% към изолат R19.17.1. Устойчивост до средна устойчивост при детерминантните сортове (тип I) показват 83.9% от образците (Фиг. 9). При индетерминантните образци разпределението на устойчивите и средно устойчивите материали е както следва: тип II –

66.7%; тип III – 38.5%; тип IV – 81.8%. По-високият процент на устойчивост при детерминантните образци вероятно се дължи на по-силната лигнификация в листните възли.



Фигура 9. Разпределение на 89 образци фасул в зависимост от реакцията им към два изолата на *Sclerotinia sclerotiorum* през 2021 год.

* хабитус на храста; R – устойчив; MR – ср. устойчив; S – чувствителен; VS – високо чувствителен

Проведеният дисперсионен анализ за влиянието на условията през годината върху реакцията на 21 генотипа фасул, инокулирани с два изолата на патогена през 2021 и 2022 год., показва достоверно влияние на факторите *Година* ($F=7.430$, $P<0.01$), *Генотип* ($F=5.047$, $P<0.001$), както и взаимодействието между *Година x Генотип* ($F=3.598$, $P<0.001$) и *Изолат x Година* ($F=2.014$, $P<0.01$). Средно за двете години на изследване не са установени сортове с устойчива реакция към двата изолата (Табл. 8). Средна устойчивост проявяват образци Астор, А 195, Izabell, Родопея и ИИРР 7585.

Таблица 8. Реакция на 21 образца фасул към два изолата на *S. sclerotiorum* през 2021 и 2022 год.

№	Образец	Хабитус	S19.19.5/1			R19.17.1			Ср. за генотипа
			2021	2022	Ср.	2021	2022	Ср.	
			Бал	Бал		Бал	Бал		
1	Астор	Шб	4,0	6,0	5,0	6,3	3,3	4,8	4,9
2	Елексир	Шб	6,0	4,3	5,1	5,8	5,8	5,8	5,4
3	Вулкан	Шб	3,8	6,5	5,1	4,0	6,5	5,3	5,2
4	A195	Ia	3,8	3,0	3,4	4,3	3,0	3,6	3,5
5	Добр. 7	Шб	4,5	5,8	5,1	5,8	9,0	7,4	6,3
6	Добр. ран	Шб	6,3	4,8	5,5	6,5	9,0	7,8	6,6
7	Пуклив 2	Пб	8,3	7,5	7,9	8,5	7,3	7,9	7,9
8	Абритус	Па	2,8	8,8	5,8	8,5	3,3	5,9	5,8
9	Лудогорие	Па	3,3	8,0	5,6	6,3	3,5	4,9	5,3
10	Скития	Па	8,5	5,5	7,0	8,0	7,3	7,6	7,3
11	Мизия	Ia	4,8	7,8	6,3	6,0	6,8	6,4	6,3
12	Хелис	Ia	4,0	8,3	6,1	6,3	6,0	6,1	6,1
13	Izabell	Ia	3,0	3,8	3,4	3,3	4,8	4,0	3,7
14	Радоил	IVa	7,3	4,8	6,0	6,8	5,3	6,0	6,0
15	Блян	Па	6,8	5,3	6,0	5,5	4,8	5,1	5,6
16	Устрем	Па	4,5	5,3	4,9	5,5	5,5	5,5	5,2
17	Тракия	Ia	6,0	7,3	6,6	7,5	3,3	5,4	6,0
18	Родопея	IVa	3,3	4,8	4,0	3,5	3,8	3,6	3,8
19	Пирина	IVa	8,5	5,0	6,8	5,0	6,3	5,6	6,2
20	Вежен	Па	5,0	6,5	5,8	4,8	5,0	4,9	5,3
21	ИИРР 7585	Ia	3,8	6,5	5,1	2,5	3,3	2,9	4,0
Средно за изолата			5,2	6,0	5,5	5,7	5,4	5,5	

LSD_{0,05}: Генотип – 1.41; Изолат x Генотип – 1.99; Година x Изолат x Генотип – 2.82

4.5.2. Сравнително изпитване устойчивостта на образци фасул към *Sclerotinia sclerotiorum* чрез прилагане на директен и индиректен метод.

Проведеният анализ на варианса за реакцията на 21 образци фасул към четири изолата на *S. sclerotiorum* при прилагане на STRAW-теста в оранжерийни условия показва висока достоверност на самостоятелното и комбинирано влияние на проучваните фактори.

Таблица 9. Устойчивост на 21 образца фасул към *S. sclerotiorum* при прилагане на директен и индиректен метод за анализ

№	Образец	Оксалов тест	STRAW				Средно
			SS19.1.4	R 19.17.1	S19.19.5/1	S19.3.2/3	
1	Астор	5.6	2.8	4.4	4.8	5.2	4.3
2	Елексир	7.6	4.0	4.2	4.8	3.4	4.1
3	Вулкан	7.8	4.0	5.6	3.6	4.8	4.5
4	A195	4.8	3.8	3.2	4.0	4.6	3.9
5	Добр. 7	9.0	4.6	5.2	4.6	4.4	4.7
6	Добр. ран	8.2	4.2	3.8	4.8	4.4	4.3
7	Пуклив 2	8.2	4.2	6.0	5.6	5.8	5.4
8	Абритус	8.0	4.0	7.6	6.4	7.0	6.3
9	Лудогорие	4.4	5.2	6.8	5.6	6.4	6.0
10	ГТБ Скития	3.6	2.4	4.4	7.4	5.4	4.9
11	Мизия	7.0	5.0	6.2	4.6	4.8	5.2
12	Хелис	5.8	6.2	5.8	4.8	5.0	5.5
13	Izabell	5.0	3.6	3.8	3.4	4.2	3.8
14	Радоил	7.0	3.8	4.4	5.0	3.2	4.1
15	ГТБ Устрем	6.6	4.2	4.6	4.0	5.2	4.5
16	ГТФ Блян	7.0	5.0	5.0	4.0	5.0	4.8
17	Тракия	7.8	4.2	6.2	5.4	4.4	5.1
18	Родопея	3.6	3.6	4.8	4.2	4.4	4.3
19	Пирина	4.0	2.8	4.2	4.0	5.8	4.2
20	Вежен	8.4	4.2	6.0	2.8	5.8	4.7
21	ИИРР 7585	8.6	4.0	5.2	3.4	3.6	4.1
Средно			4.1	5.1	4.6	4.9	

*LSD*_{0.05}: 2.04 за Оксалов тест; 0.82 за Генотипа; 0.36 за Изолата; 0.36 за Генотип x Изолат.

Наблюдават се достоверни разлики, както между проучваните образци, така и по отношение на тяхната реакция към отделните изолати (Табл. 9). Проведеният анализ при контролируеми условия потвърждава установената при полския анализ средна устойчивост на образци Астор, А 195, Izabell, Родопея и ИИРР 7585. Установена е слаба положителна зависимост ($r=0.120$, $\text{sig}=0.606$) между оксаловия тест и STRAW теста. Слаба положителна зависимост е установена и между оксаловия тест и реакцията на образците към изолати SS19.1.4 ($r=0.182$, $\text{sig}=0.640$) и R19.17.1 ($r=0.071$, $\text{sig}=0.649$). Слаба отрицателна зависимост е установена

между оксаловия тест и реакцията на образците към изолати S19.3.2/3 ($r=-0,112$, $\text{sig}=0,256$) и S19.19.5/1 ($r=-0,058$, $\text{sig}=0,558$). Получените резултати ни дават основание да препоръчаме прилагането на оксаловия тест в началните генерации на селекционните материали, след предварителен сравнителен анализ на родителските форми по двата метода.

4.6. Проучване устойчивостта при слънчогледа към стъблената форма на *Sclerotinia sclerotiorum*

От включените в полския анализ през 2019 год. 10 едногодишни диви образци на *H. annuus* средна устойчивост към двата изолата показват E-129, E-115, E-110 и E-154, като разликите в балната оценка между изолатите не са достоверни (Табл. 10).

Таблица 10. Реакция на 15 хибридни комбинации слънчоглед и 10 едногодишни диви образци от *H. annuus* към два изолата на *S. sclerotiorum*

Кат. №	Образец/ хибрид	SS19.4.1	SS19.1.4	Ср.	Кат. №	Образец/ хибрид	SS19.4.1	SS19.1.4	Ср.
H1	712 A x E-155-2	7,8	3,0	5,4	H14	712 A x E-155-3	7,3	3,0	5,2
H2	712 A x E-116	7,8	4,0	5,9	H15	712 A x E-117	8,0	6,5	7,3
H3	712 A x E-154-2	5,8	4,5	5,2	A3	E-110*	3,8	3,0	3,4
H4	712 A x E-115	5,5	4,0	4,8	A5	E-115*	4,3	3,8	4,1
H5	712 A x E-125-2	6,0	5,3	5,7	A8	E-116*	3,8	5,8	4,8
H6	712 A x E-110-2	3,5	3,8	3,7	A10	E-117*	5,5	4,0	4,8
H7	712 A x E-129	4,8	2,8	3,8	A17	E-120*	6,0	4,0	5,0
H8	712 A x E-155-1	7,5	4,5	6,0	A22	E-125*	6,3	6,3	6,3
H9	712 A x E-120	6,3	8,0	7,2	A23	E-127*	7,0	8,0	7,5
H10	712 A x E-125-1	8,0	6,0	7,0	A33	E-129*	3,3	3,5	3,4
H11	712 A x E-127	8,0	8,5	8,3	A47	E-154*	3,8	3,0	3,4
H12	712 A x E-154-1	5,8	6,8	6,3	A49	E-155*	5,3	3,3	4,3
H13	712 A x E-110-1	4,0	4,3	4,2	Ср. за изолата		5,8	4,8	

$LSD_{0,05}$ - 0,44 за изолат; 1,56 за генотип и 2,05 за изолат x генотип

*едногодишни диви образци от *H. annuus*

От проучваните 15 хибридни комбинации, резултат от междувидова хибридизация, средна устойчивост към двата изолата на *S. sclerotiorum* показват H4 =712A x E-115, H6=712A x E-110-2, H7=712A x E-129 и H13=712A x E-110-1 (Табл. 10). Устойчивостта при тези хибриди съответства на устойчивостта на дивите образци, използвани като донори на резистентност.

От проучваните през 2020 год. 29 диви образци от *Helianthus* spp. средна устойчивост към включените в изследването изолати показват девет, като седем са от *H. annuus* и по един от *H. petiolaris* и *H.p. ssp.runyonii* (Табл. 11). И през двете експериментални години изолат SS19.4.1 показва по-висока агресивност към проучваните генотипи в сравнение с SS19.1.4.

Таблица 11. Реакция на 29 едногодишни диви образци *Helianthus* spp. към два изолата на *S. sclerotiorum*

Кат.№	Образец	Вид*	Изолат		Ср.
			SS19.1.4	SS19.4.1	
HA 1	E035-47p- Еал.д./3- H17	<i>H. annuus</i>	6,6	4,2	5,4
HA 2	E045-29E/2H17	<i>H. annuus</i>	3,8	3,4	3,6
HA 3	E093-EE/2H18	<i>H. annuus</i>	9,0	8,0	8,5
HA 4	E081-13pЕанг.Н18	<i>H. annuus</i>	5,8	4,8	5,3
HA 5	E092-40Еанг./2H18	<i>H. annuus</i>	3,8	3,6	3,7
HA 6	E118-8E/1H18	<i>H. annuus</i>	4,6	4,6	4,6
HA 7	E119-23E/2H18	<i>H. annuus</i>	4,2	3,8	4,0
HA 8	E121-45E/2H18	<i>H. annuus</i>	5,6	3,0	4,3
HA 9	E127-44p-Е13-Н18	<i>H. annuus</i>	8,0	4,8	6,4
HA 10	E153-29E/1H19	<i>H. annuus</i>	3,8	3,8	3,8
HA 11	E152-47E/1H19	<i>H. annuus</i>	3,4	3,4	3,4
HA 12	E174-132E/1H19	<i>H. annuus</i>	6,6	4,6	5,6
HP 13	020Op18r	<i>H. petiolaris</i>	6,8	4,8	5,8
HP 14	021Op	<i>H. petiolaris</i>	4,2	4,0	4,1
HP 15	37	<i>H. petiolaris</i>	5,0	5,4	5,2
HP 16	105	<i>H. petiolaris</i>	6,8	7,6	7,2
HPP 17	142	<i>H. pe. ssp.petiolaris</i>	7,4	8,0	7,7
HD 18	50	<i>H. debilis</i>	6,0	5,0	5,5
HD 19	104	<i>H. debilis</i>	7,8	6,4	7,1
HDS 20	89	<i>H.d. ssp. silvestris</i>	5,2	5,2	5,2
HDC 21	137	<i>H.d. ssp.cucumerifolius</i>	6,4	6,8	6,6
HDT 22	141	<i>H.d. ssp. tardiflorus</i>	6,4	7,0	6,7
HPr 23	143	<i>H. praecox</i>	6,2	7,6	6,9
HPr 24	144	<i>H. praecox</i>	7,2	7,6	7,4
HPrH 25	27	<i>H.pr. ssp.hirtus</i>	6,4	6,2	6,3
HPrPr 26	28	<i>H.pr. ssp. praecox</i>	5,6	6,4	6,0
HPrH 27	148	<i>H.pr. ssp.hirtus</i>	6,2	5,2	5,7
HPrR 28	149	<i>H.pr. ssp.runyonii</i>	3,2	3,2	3,2
Hag 29	E130	<i>H. agrophyllus</i>	6,0	4,2	5,1
Средно за изолата			5,8	5,3	

**H.d. ssp* – *Helianthus debilis* ssp; *H.pr.ssp* – *Helianthus praecox* ssp; *H. pe. ssp.*– *H. petiolaris* ssp.
LSD_{0,05} - 0,35 за изолат; 1,36 за генотип и 1,92 за изолат x генотип

5. ОСНОВНИ ИЗВОДИ

Основавайки се на проведените изследвания и анализа на получените резултати върху агресивността и генетичното разнообразие на *Sclerotinia sclerotiorum* в България, могат да се направят следните основни изводи:

1. През периода 2019 – 2021 год. нападението на слънчогледовите посеви от кореновата и базична форма на *Sclerotinia sclerotiorum* варира от единични растения до 70%. В посевите на рапица и фасул нападението варира от единични растения до 5%.
2. По своите морфологични особености проучваните 118 изолата на *Sclerotinia sclerotiorum* се групират в три групи в зависимост от типа на колониите, както и цвета на колониите, и в четири групи спрямо разположението на склероциите в блюдо. Началото на формиране на склероции е в интервала от 3 до 8 дни. Установена е функционална зависимост ($r=1$, $P<0.001$) между диаметралния растеж и скоростта на нарастване, както и достоверна положителна зависимост между броя склероции и теглото на склероциите в блюдото. Установени са достоверни разлики по отношение на културалните характеристики на изолатите, както в отделните локации, така и между тях. Морфологичните и културални особености на изолатите не са свързани с техния географски произход и гостоприемника, от който са изолирани.
3. Хранителната среда PDAC+80 е най-подходяща за визуализиране на фенотипната изява при провеждане на комплементарни тестове за съвместимост. Сформирани са 108 локални MCGs, като общия индекс на Shannon (H_{tot}) за проучваните популации е 0.895, а клоалният индекс възлиза на 0.299. Доказано е преобладаващо клоново разпространение на патогена в отделните локации. Сформираните 10 междулокационни MCGs потвърждават наличие на клоално разпространение на патогена между пространствено отдалечени локации.
4. Установени са слаби положителни зависимости между агресивността на изолатите към фасулевия сорт ГТБ Блян и слънчогледовия хибрид Деведа с диаметралния растеж и темпа на развитие на колониите, както и между агресивността към фасула и локалните MCGs. Клъстерните анализи групират проучваните изолати от различни локации в общи подгрупи, независимо от географския им произход и гостоприемника, от който са изолирани.

5. Установено е значително вариране във физиологичната устойчивост на 89 образци фасул, групирани в зависимост от хабитуса на храста. Доказано е достоверно влияние на факторите *Условия на годината* и *Генотип*, както и на комбинираното влияние на факторите *Година x Генотип* и *Изолат x Генотип*. Средно за двете години на изследване не са установени сортове с устойчива реакция. Средна устойчивост при полски условия проявяват образци Астор, А 195, Izabell, Родопея и ИИРР 7585. Установена е слаба положителна зависимост ($r=0.120$, $\text{sig}=0.606$) между оксаловия тест и STRAW теста, приложени при контролируеми условия. Директният и индиректен метод потвърждават средната устойчивост на образците Астор, А 195, Izabell, Родопея и ИИРР 7585, установена и при полски условия.
6. От проучваните при полски условия 15 хибридни комбинации, резултат от междувидова хибридизация, средна устойчивост към *S. sclerotiorum* показват 712 А x Е-115, 712 А x Е-110-2, 712 А x Е-129 и 712 А x Е-110-1. Устойчивостта при тези хибриди съответства на устойчивостта на дивите образци *Helianthus annuus*, използвани като бащини донори на резистентност. От проучваните 29 диви едногодишни образци *Helianthus* spp. средна устойчивост показват девет, като седем са от *H. annuus* и по един от *H. petiolaris* и *H. praecox* ssp. *runyonii*.

6. ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

- Kiryakov, I. & K. Zhecheva (2019).** Mycelial compatibility and aggressiveness of Bulgarian *Sclerotinia sclerotiorum* isolates. *Field Crops Studies*, 12 (3), 9-22 (BG).
- Zhecheva, K. & Kiryakov, I. (2021).** Aggressiveness of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates to *Phaseolus vulgaris* and *Helianthus annuus*. *Field Crops Studies*, 14 (2-3-4), 9-16 (BG).
- Zhecheva, K., & Kiryakov, I. (2023).** Comparative testing of the resistance of bean accessions to white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) by a direct and indirect method. *Bulgarian Journal of Crop Science*, 60(5), 40-46 (BG).
- Zhecheva, K., Koleva, M., & Kiryakov, I. (2024).** *Sclerotinia sclerotiorum* genetic diversity in Bulgaria. *Bulgarian Journal of Crop Science*, 61(5) 97-104 (BG).

7. НАУЧНИ И НАУЧНО-ПРИЛОЖНИ ПРИНОСИ

1. Това е първото изследване у нас, свързано с генетичното разнообразие на *Sclerotinia sclerotiorum*, основаващо се на мицелната съвместимост между изолатите, включващо 156 изолата от 17 производствени полета в 11 области на Северна и Южна България.
2. За първи път у нас е проучена агресивността на 102 изолата от *Sclerotinia sclerotiorum* с произход от 17 производствени посева на слънчоглед, рапица и зрял фасул. Получените резултати дават възможност за повишаване на ефикасността на селекционните програми за устойчивост при фасул и слънчоглед.
3. За първи път у нас е проведено мащабно проучване, свързано с морфологичните и културални характеристики на 118 изолата от *Sclerotinia sclerotiorum*, произхождащи от различни географски райони и гостоприемници.
4. При полски условия е проследена физиологичната устойчивост на 89 образци фасул от сърцевидната колекция на Добруджански земеделски институт към *Sclerotinia sclerotiorum*. Получените резултати потвърждават физиологичната устойчивост на някои образци, посочвани като донори на резистентност от наши и чужди автори.
5. Потвърдено е становището на други автори относно възможностите за прилагане на оксаловия тест за определяне физиологичната устойчивост на фасула към *Sclerotinia sclerotiorum*. Получените резултати показват, че точността на метода може да се повиши след предварително тестиране на родителските компоненти чрез успоредно прилагане на директен и индиректен метод за тестиране.
6. Потвърдена е физиологичната устойчивост на основни за страната сортове зрял фасул към *Sclerotinia sclerotiorum*. Представената информация има приложен характер и ще подпомогне земеделските производители при избора на сорт в райони с установено разпространение на патогена.
7. Потвърдена е възможността за пренос на устойчивост към стъблената форма на *Sclerotinia sclerotiorum* от едногодишни диви видове *Helianthus annuus* към културния слънчоглед.
8. За първи път в България е проучена устойчивостта на едногодишни диви видове от *Helianthus* spp. към повече от един

изолат на *Sclerotinia sclerotiorum*. Получените резултати дават възможност за включване на устойчивите образци в селекционната програма на слънчогледа.