

A szőlő fertőző tőkeelhalásban szerepet játszó gombák izolálása és azonosítása hagyományos és molekuláris biológiai módszerekkel a Tokaj-hegyaljai borvidéken

Kovács Csilla¹ – Peles Ferenc¹ – Xie Hongtao^{1,2} – Szojka Anikó¹ – Hajdu Gréta¹ – Bihari Zoltán² – Sándor Erzsébet¹

¹Debreceni Egyetem Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar, Élelmiszertudományi Intézet, Debrecen

²Tokaji Borvidék Szőlészeti és Borászati Kutatóintézet, Tokaj
k.csilla20@gmail.com

ÖSSZEFOGLALÁS

A tőkeelhalás napjainkban a szőlőültetvények egyik legsúlyosabb betegsége világszerte, mely a magyarországi szőlőkben is megtalálható. A magyarországi borvidékeken a tőkeelhalás kialakításában szerepet játszó kórokozók előfordulásáról azonban nagyon kevés adat található, a Tokaj-hegyaljai borvidéken pedig nincsenek ismereteink arról, hogy jelenleg a tárgyalt betegséggel összefüggésbe hozható kórokozók közül melyek találhatóak meg az ültetvényekben.

Kutatómunkánk célja a Tokaj-hegyaljai borvidéken észlelt fertőző tőkeelhalás néven összefoglalt egyes betegség típusok helyzetének felmérése, a helyi szakemberek közreműködésével, továbbá a beteg tőkékől izolálható kórokozók morfológiai és genetikai alapon történő azonosítása.

A vizsgált, elhalt tőkék mindegyikéből sikerült endofita gombákat kitenyészteni. Az izolátumok között döntő többségében a Botryosphaeria-ceae családba tartozó *Diplodia seriata* volt kimutatható a tenyészetek morfológiai és az rDNS régió alapján történt molekuláris azonosítása alapján.

Kulcsszavak: szőlő tőkeelhalás, *Diplodia seriata*, ITS

SUMMARY

Grapevine Trunk Diseases (GTD) is one of the most important diseases in vineyards worldwide, which can be found in Hungarian vineyards as well. In Hungarian wine regions there is very little information about the occurrence of pathogens which cause GTD, in case of Tokaj wine region there is no knowledge about that, what kind of pathogens can be found in the vineyards.

The objective of our research is to assess the situation and occurrence of GTD in Tokaj wine region in cooperation with local specialists, as well as identification of pathogens which were isolated from the diseased trunks by morphological and genetic basis.

We were able to isolate endophytic fungi from all sampled grape trunk. The majority of them were determined as *Diplodia seriata* not only based on colony morphology, but also determined by rDNA sequences.

Keywords: grapevine trunk diseases, *Diplodia seriata*, ITS

BEVEZETÉS

A tőkeelhalás napjainkban a szőlőültetvények egyik legsúlyosabb betegsége világszerte, mely a magyarországi szőlőkben is megtalálható (Dula, 2011). A szőlőtőke fertőző elhalásának (Grapevine Trunk Diseases) kialakulásában többféle kórokozó gomba is részt vehet. A szőlőtőke korai, fertőző tőkeelhalását korábban többféle néven írták le, pl. Esca, Petri-betegség, Eutypa-, Botryosphaeria, vagy fekete kordonkar-elhalás (BDA), stb. (Úrbez-Torres, 2011). A betegséggel kapcsolatban több gombafajt is azonosítottak eddig (pl. *Phaeoacremonium aleophilum*, *Phaeomoniella chlamydospora*, *Eutypa lata*, *Fomitiporia mediterranea*) (Bertsch et al., 2012). Az eddigi vizsgálatok alapján a korai, fertőző tőkeelhalásban szerepet játszó kórokozó gombák felszaporodásához kedvező körülményt biztosíthat a csapadék egyenlőtlen mennyisége is.

A megbetegedés nem egy kórokozóra, vagy kórokozóra vezethető vissza, hanem komplex betegségként értelmezendő, hiszen nem csupán egy gombafaj válhatja ki, hanem együttesen megjelenve több kórokozó faj is kialakíthatja, illetve valószínűsíthető szerepe van egyéb környezeti tényezőknek is (Bertsch et al., 2012).

A betegségnek többféle megjelenési formája van: (i) egy lassabb lefolyású – krónikus, és egy (ii) gyors lefolyású – akut, amit apoplexiának (gutaütés) neveznek. Az akut formánál egyértelműen gyorsan alakulnak ki a tünetek, míg a krónikus esetben akár több éven keresztül történő pusztító hatásról beszélhetünk (Mikulás, 2008; Bertsch et al., 2012).

A Petri betegség kialakításában az egy évnél fiatalabb hajtásokat megtámadó *Phaeomoniella chlamydospora* gomba szerepét bizonyították (Gramaje és Armengol, 2011; Bertsch et al., 2012; Dula, 2012). Elsősorban a fertőzött oltványok révén terjed, rohamos hozamcsökkenést okoz, de emellett a leveleken az erek mentén foltok jelennek meg, melyek aztán klorotikus és nekrotikus szalagokat alkotnak. A legtöbb esetben ezt a tünetet nevezik „tigris-csíkoságnak”. Ezek a tünetek általában néhány év után jelennek meg, mikor már fertőzötté vált a szőlő. Általában nyár közepén, száraz, forró, majd csapadékos időben jelenik meg (Surico et al., 2006).

Az Esca (latin jelentése: étel, eledel, az angol szóképp ezzel megegyező, de a görög (eszkhatosz: legutolsó, végső /betegségállapot/) eredeten alapul (Kövecses, 2009). Világszerte elterjedt betegség (Fischer és

Kassemeyer, 2003, Dula, 2012). Az 1900-as években kezdtek esca néven emlegetni a betegséget. Több gomba is okozhatja a tüneteket. *P. chlamydospora* (*Chaetothyriales*, *Herpotrichiellaceae*) és a *P. aleophilum* (*Diaporthales*, *Togniniaceae*) és számos *Basidiomycetes* faj (Fischer, 2006), melyek közül a legelterjedtebb *Fomitiporia mediterranea* (syn: *Phellinus punctatus* és *Fomitiporia punctata*). Magyarországról, Dula Bencéné által gyűjtött, Tokaj-hegyaljáról származó mintából izoláltak egy új, *Phaeoacremonium hungaricum* néven leírt fajt a betegséggel kapcsolatban (Essakhi et al., 2008). Az idősebb tőkéken jelenik meg a betegség: a szőlőlevélen az erek megsárgulnak, majd elszáradnak. A betegség lefolyása több évig is eltarthat, és először a fás részekben jelenik meg, majd ezt követően figyelhető meg a vegetatív részek pusztulása (Lima et al., 2010; Bertsch et al., 2012). Valószínűleg a szőlőn ejtett metszési sebeken keresztül, a szél segítségével jutnak a gombaspórák a növénybe (Varga, 2009; Díaz és Latorre, 2013). A kórokozó a szövetek teljes pusztulását okozza (Úrbez-Torres, 2011). A vegetációs időszakban a lombozati tünetek általában júniustól szeptemberig jelennek meg a szőlőn, de nem minden szőlőtőkén, illetve nem minden levélen láthatóak a tünetek (Petit et al., 2006).

Az Eutypás tőkeelhalást, amit a leggyakoribb betegségként írtak le, az *Eutypa lata* gomba faj okozza (Dula, 2012). Megjelenésével azokon a területeken kell számolni, ahol az éves csapadékmennyiség több mint 250 mm (Bertsch et al., 2012). Az Eutypás tőkeelhalást előidéző más, új fajokat is leírtak Ausztráliában (Trouillias et al., 2011). Ezek a fajok az *Eutypella microtheca*, az *Eutypella citricola* és a *Diatrypella vulgaris* voltak. Díaz és Latorre (2013) Chilében az *Eutypella leprosa* fajt írták le. A tünetek közül a satnya hajtások, a klorotikus pontok jellemzőek. A lombozati tünetek általában tavasszal jelennek meg. A kórokozó hatására a növény vízellátása összeomlik, a növényi sejteknek csökken a permeabilitása, ami kiszáradáshoz vezet.

A fekete kordonkar elhalást (black dead-arm, BDA) (néha: szőlő rák, grape cancer) először Magyarországon a tokaji régióban írtak le. A betegség során klorotikus pontok jelentek meg a leveleken, melyek később hervadásnak indultak (Lehoczky, 1974). A BDA betegség kórokozójaként korábban csak a *Diplodia mutila* (teleomorf: *Botryosphaeria stevensii*) fajt írták le, ma már azonban az említett kórokozóhoz társult a *Diplodia seriata* és a *Botryosphaeria dothidea* is (Phillips, 2002; Andolfi et al., 2011; Úrbez-Torres, 2011). A fás részek részleges elhalása az exkoriózis. A betegség nevét Ravaz és Verge vezették be 1925-ben.

A tőkeelhalást okozó gombák hatására jelentős gazdasági károk keletkeznek a szőlőültetvényekben, melyek eredményeképpen jelentős termésvesztés lép fel. A tőkepusztulást befolyásolja a tőkeelhalásra való hajlam is. A fertőzött növényi anyagok (oltványok) pedig növelik a betegség földrajzi elterjedését.

A betegség elleni védekezési lehetőséget a megfelelő higiéniai fertőtlenítés alkalmazása, valamint fertőzés csökkentésére irányuló fitotechnikai eljárások (sebkezelés, kevés sebfelületet ejtő művelés- és metszsmódok, fertőzött oltványok kiszűrése) jelenthetik.

A vizsgálatunk célja a Tokaj-hegyaljai borvidéken észlelt fertőző tőkeelhalás néven összefoglalt egyes betegség típusok helyzetének felmérése, a helyi szakemberek közreműködésével, továbbá a beteg tőkékben izolálható kórokozók morfológiai és genetikai alapon történő azonosítása.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Kísérleti beállítások

Az elhalt, kitermelt tőkét a Tokaji Borvidék Szőlészeti és Borászati Kutatóintézet munkatársai gyűjtötték be két területről: Dorgó dűlő (1. terület: Mezőzombor határában) és Szemere dűlő (2. terület: Mád határában). A 20 elpusztult tőkét február végén vágták ki, és szállították a laboratóriumba, a betegség jelenlétének igazolása és a kórokozó gombák identifikálása céljából.

Mikrobiológiai és molekuláris biológiai vizsgálatok

A minták előkészítését és a mikrobiológiai vizsgálatokat Abreo et al. (2013) leírása alapján végeztük el.

A minta beérkezése után először lefotóztuk a mintákat. A betegség, a fás részek jellegzetes mintázatú elhalása jól látható volt a beérkező mintákon. Ezt követően mintát vettünk a fás részekből úgy, hogy az első mintaszeletet eldobtuk, és csak a következőt használtuk fel a további munkákban. A mintákat előbb 10%-os Neomagnolos oldattal 10 percig fertőtlenítettük, majd kétszer mostuk steril desztillált vízzel. A mosások után steril burgonya-dextróz agarra (PDA, Scharlau) helyeztük a levágott szőlőtőke darabokat. A 3–5 napig tartó 25 °C-on történő inkubálás után a fejlődő micéliumokat új PDA táptalajra oltottuk. Tiszta tenyészet készítéséhez az átoltásokat a micéliumok kifejlődése után (1–3 nap) végeztük. Az izolátumok fenntartása PDA ferde agaron, 4 °C-on történt.

A morfológiai vizsgálatok során a telepképzést, a pigment termelést és a spóra alakját vizsgáltuk.

A DNS izoláláshoz az izolátumokat 20 ml PD-levest (burgonya-dextróz leves) tartalmazó, 100 ml-es Erlenmeyer lombikban szaporítottuk fel, melybe egy kacsnyi tenyészetet szuszpendáltunk bele. A tenyészeteket szobahőmérsékleten, rázógép segítségével 3 napon át 130 rpm-en ráztuk. A feltárás előtt a gomba micéliumot speciális szűrőkendő, Miracloth (Merck) segítségével leszűrtük, majd desztillált vízzel kétszer átmostuk, és a sejteltérésig -20 °C-on tároltuk. A gombasejtek feltárását folyékony nitrogénben, dörzsoszárban végeztük. A DNS kinyeréséhez NucleoSpin® Plant II (Macherey-Nagel) kitet alkalmaztunk a gyártó leírása szerint. Az izolált DNS-t 0,8% agaróz gélben futtatuk TAE pufferben.

Az ITS1 és ITS2 szakaszokat tartalmazó rDNS régiót ITS4 és ITS5 primerek (White et al., 1990) segítségével amplifikáltuk. A PCR reakcióban GoTaq Green Master polimerázt (Promega) használtunk.

A szekvenálathoz a PCR termékeket NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) segítségével tisztítottuk. A szekvenálást az Eurofins MWG GmbH (Németország) végezte.

A szekvenciákat az NCBI adatbázisba (ncbi.nlm.nih.gov) blasztolva határoztuk meg a gomba izolátumok taxonómiai besorolását. A *Botryosphaeriaceae* családba tartozó minták szekvenciáit a típus törzsek deponált ITS szekvenciáival is összehasonlítottuk. A szekvenciákat Clustal X program (Higgins és Sharp, 1988; Thompson et al. 1997; Larkin et al., 2007) segítségével rendeztük össze. A törzsfát a MEGA 5.05 (Tamura et al., 2011) programmal készítettük.

EREDMÉNYEK

Tünetek a fás részekben

A fás részekben jól látható nekrotikus részekkel jelentkező elhalások voltak megfigyelhetők (1. kép).

Telepmorfológia alapján beazonosított izolátumok

Eddigi telepmorfológiai vizsgálataink során egyértelműen Botryosphaerianak látszó, de ettől eltérő telepmorfológiát mutató fajokat találtunk. A telepképzés alapján jól elkülöníthetőek voltak a *Diplodia seriata* (teleomorf: *Botryosphaeria obtusa*), az *Alternaria* sp., a *Fusarium* sp., a *Phomopsis* sp., valamint az *Epicoccum nigrum* (syn: *Epicoccum purpurascens*) fajok (2. kép).

A telepmorfológia alapján az elhalt minták nagy részéből (80%) kimutatható volt a szőlő tőkeelhalásában szerepet játszó *Botryosphaeria* csoportba tartozó gomba. A minták negyedéből egynél több endofita gomba jelenlétét tudtuk kimutatni.

A *Diplodia seriata* (teleomorf: *Botryosphaeria obtusa*) egy gyorsan növekvő, légmicéliumot képező,

sötét pigmentet termelő faj (2A kép). A spórái oválisak, sötétbarna színűek, néhányuk szeptált (Arzanlou és Dokhanchi, 2012).

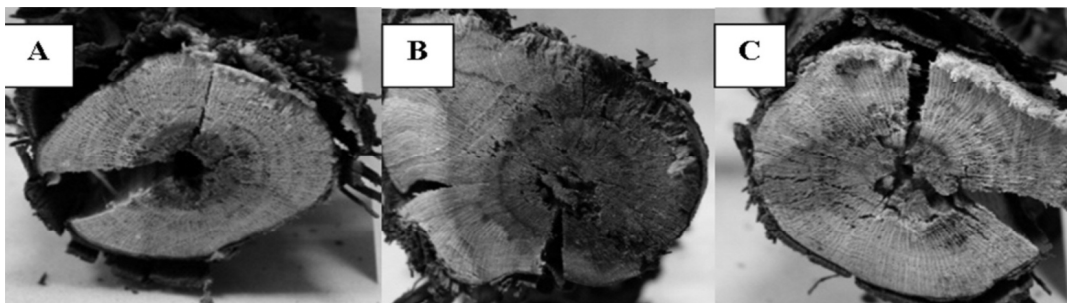
Izolátumaink telepmorfológiai analízise során *Epicoccum* nemzetségbe tartozó fajokat is sikerült azonosítanunk. Ezen fajokra is a gyorsan növekvő pelyhes telepek képzése jellemző, valamint erős narancssárga színű pigmentet termelnek, mely a PDA táptalajon jól látható (2B kép). Az enyhén pigmentált konidiofórok sporodochiumot alkotnak, melyeken a konídiumok egyesével képződnek. A konídiumok gömb alakúak, 5–25 µm átmérőjűek (Kortekamp, 1997).

Néhány tenyészetünk az ITS szekvenciák alapján *Fusarium tricinctum* fajként lett azonosítva. A *Fusariumok* fehéres színű telepeket képeznek, rózsaszínes pigmentet termelnek (2C kép), bőséges mikrokonídium termelő fajok. A makrokonídiumokra a sarlóalak jellemző (Carrieri et al., 2012).

A vizsgált 44 izolátumból csupán egy izolátum volt a *Phomopsis* genusba sorolható. Az izolátum pelyhes, sima krém-fehér, bézs-barna telepeket képez. A törzset növekedési gyűrű jellemzi (2D kép) és fekete piknidiumokat képez, melyek 12–17 napos inkubáció után jelennek meg. Utána krémszerű cseppeket tartalmazó spórákat kezd termelni. A spórái átlátszóak, oválisak, az α -spórák a fajoknál különbözőek lehetnek (Król, 2005).

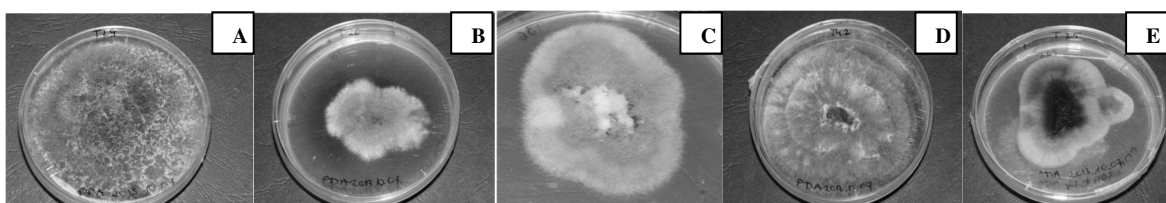
Alternaria genusba sorolható fajokat is azonosítottunk. Telepeik gyorsan növekvő, fekete vagy olajzöld-szürkés színűek (2E kép). A spórái hosszúkásak, elágazó láncokban kapcsolódnak egymáshoz, melyek vertikálisan és horizontálisan is harántfalakkal tagoltak (Rotem, 1994).

1. kép: Nekrotikus elhalások a szőlő fás részein (A, B, C: néhány szőlőtőke keresztmetszeti képe)



Picture 1: Necrosis on woody parts of the grapevine (A, B, C: cross-sectional view of some grapevine)

2. kép: Az izolátumok telepmorfológiája PDA táptalajon (A: *Diplodia seriata*, B: *Epicoccum nigrum*, C: *Fusarium* sp., D: *Phomopsis* sp., E: *Alternaria* sp.)



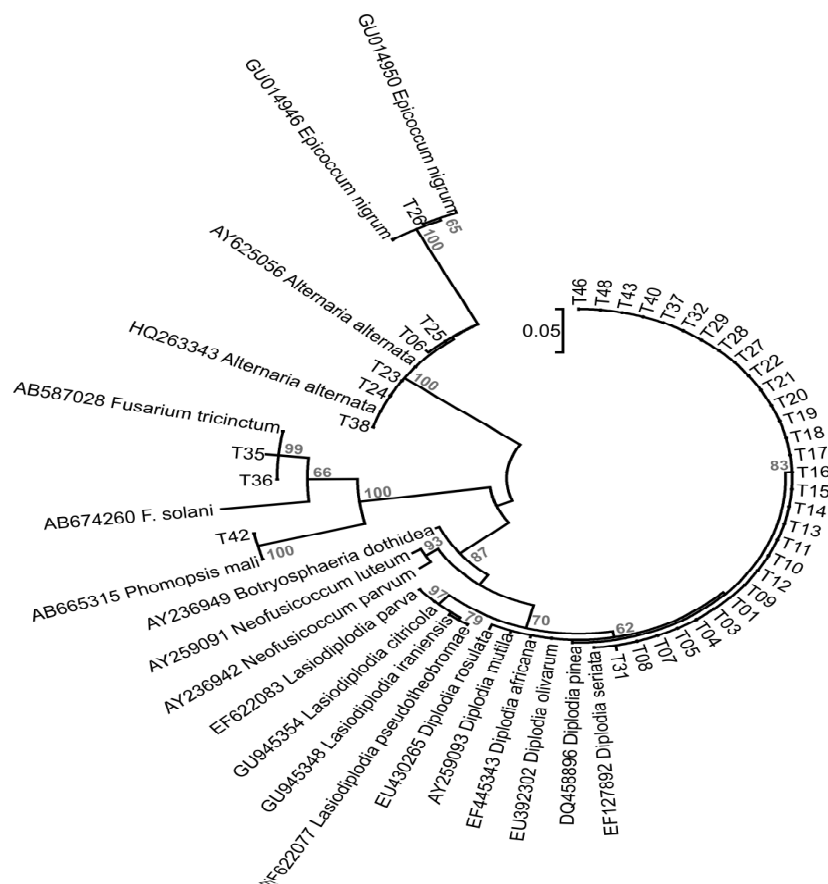
Picture 2: Colony morphology of the isolates on PDA medium (A: *Diplodia seriata*, B: *Epicoccum nigrum*, C: *Fusarium* sp., D: *Phomopsis* sp., E: *Alternaria* sp.)

A gombák azonosítása az ITS régiók szekvenciája alapján

A gombák azonosítását a legelterjedtebben használt molekuláris marker, az ITS régiók szekvenciái (Schoch et al., 2012) alapján végeztük el. A húsz mintából kitenyésztett gombák közül összesen 44 izolátum ITS régiójának szekvenciáját sikerült eddig meghatározni.

A szekvenciák adatbázisba történő blasztolása után öt csoportot tudtunk meghatározni (1. ábra). A 2. ábrán láthatjuk a két tökekötegből izolált fajok megoszlását. Megfigyelhető, hogy a legnagyobb arányban (68%) a *Diplodia seriata* (teleomorf: *Botryosphaeria obtusa*) izolátumok voltak jelen. Ezen kívül *Alternaria*, *Epicoccum*, *Fusarium* és *Phomopsis* gombák voltak azonosíthatók.

1. ábra: Az elhalt szőlőtőkéről izolált gombák maximum likelihood módszerrel szerkesztett törzsfája az rDNS ITS régió szekvenciája alapján



Megjegyzés: a T01-T48 jelzés az elhalt tőkékéből származó izolátumokat jelöli. Az elágazások hossza arányos a nukleotid eltérések számával, a skála felül, középen található. Az elágazások melletti szám a bootstrap analízis (1000 ismétlés) eredményét jelöli. Csak az 50%-nál nagyobb értékeket jelöltük. Az elemzést a MEGA 5.05 programmal (Tamura et al., 2011) végeztük.

Figure 1: Molecular phylogenetic analysis by maximum likelihood method of the fungal isolates from dead grapevine trunks

Note: T01-T48 indicates our dead isolates from dead stocks. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. The results of bootstrap analysis are indicated by gray numbers next to the branch. Values higher than 50% were only presented. Evaluational analyses were conducted by MEGA 5.05 (Tamura et al., 2011).

2. ábra: A tökekötegekből izolált fajok megoszlása

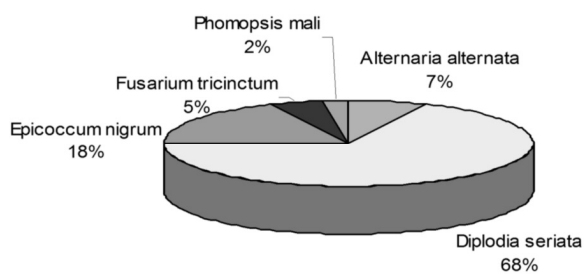


Figure 2: Isolated species from dead grapevine trunks

KÖVETKEZTETÉSEK

A Tokaj-hegyaljai borvidékről begyűjtött elhalt tőkék mindegyikéből sikerült endofita gombákat kitenyészteni. Az izolátumok között döntő többségben a *Botryosphaeriaceae* családba tartozó gombák voltak kimutathatóak a tenyészetek morfológiai vizsgálata alapján. Az rDNS régió alapján történt molekuláris azonosítás megerősítette, hogy ezek a minták a *Diplodia seriata* fajhoz tartoznak, melyet a tökeelhalásban szerepet játszó gombaként tartanak számon. A többi, ITS szekvencia alapján azonosított gombafajt is leírták már a szőlőtőkéről (Bertsch et al., 2012). Ezek közül az

Epicoccum nigrum és az *Alternaria alternata* esetében más patogénekkal szembeni antagonistát hatást is leírtak a szőlő esetében (Kortekamp, 1997; Musetti et al., 2006).

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A kutatás az Európai Unió és Magyarország támogatásával a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 azonosító számú „Nemzeti Kiválóság Program – Hazai

hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése konvergencia program” című kiemelt projekt keretei között valósult meg. A publikáció elkészítését a TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024 számú, valamint a TÁMOP-4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0007 számú projekt is támogatta. Sándor Erzsébet munkáját a Debreceni Egyetem belső kutatási pályázata támogatta. A kutatások a COST FA1303 keretében zajlottak.

IRODALOM

- Abreo, E.–Martinez, S.–Bettucci, L.–Lupo, L. (2013): Characterization of *Botryosphaeriaceae* species associated with grapevines in Uruguay. *Australasian Plant Pathology*. 42: 241–249.
- Andolfi, A.–Mugnai, L.–Luque, J.–Surico, G.–Cimmino, A.–Evidente, A. (2011): Phytotoxins produced by fungi associated with grapevine trunk diseases. *Toxins*. 3: 1569–1605.
- Arzanlou, M.–Dokhanchi, H. (2012): Morphological and molecular characterization of *Diplodia seriata*, the causal agent of canker and twig dieback disease on mulberry in Iran. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 46. 6: 682–694.
- Bertsch, C.–Ramírez-Suero, M.–Magnin-Robert, M.–Larignon, P.–Chong, J.–Abou-Mansour, E.–Spagnolo, A.–Clément, C.–Fontaine, F. (2012): Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. *Plant Pathology*. 62. 2: 243–265.
- Carrieri, R.–Raimo F.–Pentangelo, A.–Lahoz, E. (2012): *Fusarium proliferatum* and *Fusarium tricinctum* as causal agents of pink rot of onion bulbs and the effect of soil solarization combined with compost amendment in controlling their infections in field. *Crop Protection*. 43: 31–37.
- Díaz, G. A.–Latorre, B. A. (2013): Efficacy of paste and liquid fungicide formulations to protect pruning wounds against pathogens associated with grapevine trunk diseases in Chile. *Crop Protection*. 46: 106–112.
- Dula B.-né (2011): Korai szőlőtöke-pusztulást okozó, szaporítóanyag-gal terjedő kórokozó gombák. *Növényvédelem*. 47: 461–468.
- Dula B.-né (2012): Kordonkar-elhalást és korai tökepusztulást okozó betegségek. [In: Dula B. et al. (szerk.) *Diagnosztikai és szőlővédelmi kézikönyv.*] 76–87.
- Essakhi, S.–Mugnai, L.–Crous, P. W.–Groenewald, J. Z.–Surico, G. (2008): Molecular and phenotypic characterisation of novel *Phaeoacremonium* species isolated from esca diseased grapevines. *Persoonia*. 21: 119–134.
- Fischer M. (2006): Biodiversity and geographic distribution of basidiomycetes causing esca-associated white rot in grapevine: a worldwide perspective. *Phytopathologia Mediterranea*. 45: 30–42.
- Fischer, M.–Kassemeyer, H. (2003): Fungi associated with Esca disease of grapevine in Germany. *Vitis*. 42. 3: 109–116.
- Gramaje, D.–Armengol, J. (2010): Fungal trunk pathogens in the grapevine propagation process: potential inoculum sources, detection, identification, and management strategies. *Plant Disease*. 1040–1055.
- Higgins D. G.–Sharp P. M. (1988): "CLUSTAL: A package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer". *Gene*. 73. 1: 237–244.
- Kortekamp, A. (1997): *Epicoccum nigrum* LINK: A biological control agent of *Plasmopara viticola* (BERK. et CURT.) BERL. et DE TONI? *Vitis*. 36. 4: 215–216.
- Kövcics Gy. (2009): *Növénykórtani vademecum*. Magyar-angol angol-magyar szakkifejezés szótár. NOFKA. Debrecen. 470.
- Król, E. (2005): Identification and differentiation of *Phomopsis spp.* isolates from grapevine and some other plant species. University of Agriculture. Department of Plant Pathology. 151–156.
- Larkin, M. A.–Blackshields, G.–Brown, N. P.–Chenna, R.–McGettigan, P. A.–McWilliam, H.–Valentin, F.–Wallace, I. M.–Wilm, A.–Lopez, R.–Thompson, J. D.–Gibson, T. J.–Higgins, D. G. (2007): ClustalW and ClustalX version 2.0. *Bioinformatics Advance Access*. 2.
- Lehoczy, J. (1974): Black dead arm disease of grapevine caused by *Botryosphaeria stevensii* infection. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae*. 9: 319–327.
- Lima, M. R. M.–Mafalda, L.–Felgueiras-Graça, G.–Rodrigues, J. E. A.–Barros, A.–Gilana, M.–Dias, A. C. (2010): NMR metabolomics of esca disease-affected *Vitis vinifera* cv. Alvarinho leaves. *Journal of Experimental Botany*. 61. 14: 4033–4042.
- Mikulás J. (2008): Korai tökeelhalással (Esca) kapcsolatos feladatok szüret környékén. *Agrofórum*. 19. 10: 42–45.
- Musetti, R.–Vecchione, A.–Stringher, L.–Borselli, S.–Zulini, L.–Marzani, C.–D'Ambrosio, M.–Sanità di Toppi, L.–Pertot, I. (2006): Inhibition of sporulation and ultrastructural alterations of grapevine downy mildew by the endophytic fungus *Alternaria alternata*. *Phytopathology*. 96: 689–698.
- Petit, A. N.–Vaillant, N.–Boulay, M.–Clément, C.–Fontaine, F. (2006): Alteration of photosynthesis in grapevines affected by Esca. *Ecology and Epidemiology, Phytopathology*. 1060–1066.
- Phillips, A. J. L. (2002): *Botryosphaeria* species associated with diseases of grapevines in Portugal. *Phytopathologia Mediterranea*. 41: 3–18.
- Ravaz, L.–Verge, G. (1925): Sur une maladie de la vigne, l'excoriose. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences*. 180: 313–315.
- Rotem, J. (1994): The genus *Alternaria*: biology, epidemiology, and pathogenicity. APS Press. American Phytopathological Society. 326.
- Schoch, C. L.–Seifert, K. A.–Huhndorf, S.–Robert, V.–Spouge, J. L.–Levesque, C. A.–Chen, W.–Fungal Barcoding Consortium (2012): Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109: 6241–6246.
- Surico, G.–Mugnai, L.–Marchi, G. (2006): Older and more recent observations on esca: a critical review. *Phytopathologia Mediterranea*. 45: 68–86.
- Tamura, K.–Peterson, D.–Peterson, N.–Stecher, G.–Nei, M.–Kumar, S. (2011): MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28: 2731–2739.

- Thompson, J. D.–Gibson, T. J.–Plewniak, F.–Jeanmougin, F.–Higgins, D. G. (1997): The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25: 4876–4882.
- Trouillas, F. P.–Pitt, W. M.–Sosnowski, M. R.–Huang, R.–Peduto, F.–Loschiavo, A.–Savocchia, S.–Scott, E. S.–Gubler, W. D. (2011): Taxonomy and DNA phylogeny of *Diatrypaceae* associated with *Vitis vinifera* and other woody plants in Australia. *Fungal Diversity*. 49: 203–223.
- Úrbez-Torres, J. R. (2011): The status of *Botryosphaeriaceae* species infecting grapevines. Review. *Phytopathology Mediterranea*. Supplement. 50: 5–45.
- Varga Z. (2009): *Vitis* fajok és fajták tőkepusztulásának összehasonlító vizsgálata és a védekezési lehetőségei. PhD dolgozat. 113.
- White, T. J.–Bruns, T. D.–Lee, S. B.–Taylor, J. W. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. [In: Innis, M. A. et al. (eds.) *PCR Protocols: a guide to methods and applications.*] Academic Press Inc. New York. 315–322.