

A szőlő Esca betegségét okozó *Phaeomoniella chlamydospora* gomba és az endofita *Erwinia billingiae* baktérium kölcsönhatásának *in vitro* és *in planta* vizsgálata

INTÉZMÉNYI TDK KONFERENCIA BIOLÓGIA SZEKCIÓ PÁLYAMUNKA

Készítette: Szabó Dóra, II. Évfolyam, Biológus MSc

Debreceni Egyetem, Természettudományi és Technológiai Kar, Biotechnológiai Intézet,
Molekuláris Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék



Témavezetők: Dr. Szemán-Nagy Gábor, egyetemi docens

Debreceni Egyetem, Természettudományi és Technológiai Kar, Biotechnológiai Intézet,
Molekuláris Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék

Dr. Karácsony Zoltán, tudományos munkatárs

Eszterházy Károly Katolikus Egyetem, Élelmiszertudományi és Borászati Tudásközpont

Tartalom

1. BEVEZETÉS	4
2. CÉLKITŰZÉS	4
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	5
3.1. A szőlőt befolyásoló biotikus tényezők és a szőlő mikrobiomja	5
3.2. A szőlő és kórokozók kölcsönhatásai, a tőkebetegségekkel szembeni védekezési lehetőségek	6
3.3. Tőkebetegségek általános bemutatása	10
3.4. A szőlő tőkebetegségek csoportjába tartozó kórképek	12
3.4.1. <i>Botrioszfériás tőkeelhalás</i>	12
3.4.2. <i>Eutípás tőkeelhalás</i>	12
3.4.3. <i>A szőlőnövény Esca betegsége</i>	12
3.5. Az <i>Erwinia</i> nemzetség és az Ebi	15
4. ANYAG ÉS MÓDSZER	17
4.1. A vizsgált mikroorganizmusok tenyésztése	17
4.2. A vizsgált mikroorganizmusok izolálása és azonosítása	18
4.2.1. <i>Szőlő endofita gombák</i>	18
4.2.2. <i>Szőlő endofita baktériumok</i>	18
4.3. Berendezések és softwarek	19
4.4. Potenciális antagonisták, ill. szinergisták kimutatása	19
4.5. A vizsgált mikroorganizmusok növekedési rátájának, sejtszámának és spóraszámának mérése	20
4.6. Fenolvegyületek degradációjának mérése folyadékkultúrában	20
4.7. Poliszacharid koncentráció	20
4.8. <i>In planta</i> kísérletek	21
5. EREDMÉNYEK	22
5.1. Potenciális antagonisták, ill. szinergisták kimutatása	22
5.2. A vizsgált baktérium azonosítása	22
5.3. A vizsgált mikroorganizmusok növekedési rátájának, sejtszámának és spóraszámának mérése	23
5.3.1. <i>A növekedési ráták összehasonlítása tiszta és kevert kultúrák esetében</i>	23
5.3.2. <i>A mikroorganizmus-telepek morfológiájának megfigyelése</i>	24
5.3.3. <i>Pch spóraszámának meghatározása</i>	25
5.3.4. <i>Ebi sejtszámának meghatározása</i>	26
5.3.5. <i>A Pch és Ebi együttes növekedésének mikroszkópos megfigyelése</i>	27
5.4. Fenolvegyületek degradációjának vizsgálata	28
5.5. Poliszacharid termelés	29

5.6. <i>In planta</i> vizsgálatok.....	29
6. KÖVETKEZTETÉSEK	31
7. ÖSSZEFOGLALÁS	32
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	33
9. IRODALOMJEGYZÉK	34

1. BEVEZETÉS

A szőlő korai tőkeelhalását (grapevine trunk disease – GTD) gombák általi fertőzés okozza. A betegségek ezen csoportja olyan tünetegyütteseket foglal magába, melyek jelenleg megoldatlan problémát jelentenek a szőlő növényvédelmében, hiszen súlyos esetben a fertőzött tőke pusztulásához vezethetnek. Egy ilyen megbetegedés igen komplex folyamat és több kórkép formájában is megvalósulhat, mint a Botriszfériás-, Eutípás-, Fomopsziszos tőkeelhalás, a Feketelábúság, valamint az Esca. 2018-ban, 34 különböző nemzetségbe tartozó, összesen 133 gombafajt hoztak összefüggésbe a GTDk-kel és ez a szám évente növekszik (Cobos és mtsai., 2022), 2023-ra 174-re emelkedett (Li és mtsai., 2023).

A GTD komoly anyagi károkat okoz a szőlő- és borágazatnak, mivel az ide tartozó patogének súlyosan fenyegetik a borszőlő (*Vitis vinifera*) élettartamát és termőképességét, továbbá gazdasági problémát okoznak a termelési költségek növelésével. Az Esca évente 1,5 milliárd USD veszteséget okoz bizonyítottan és több, mint 2 milliárd tőke fertőzéséért felelős (Fischer és mtsai., 2019). A probléma megoldását tovább nehezíti, hogy a napjainkban használatban lévő fungicidek hatástalanok, a nátrium-arsenát betiltása óta (Songy és mtsai., 2019).

Az utóbbi években kiemelkedő figyelmet kaptak a biológiai növényvédelem lehetőségei (Cobos és mtsai., 2022). Ennek hatékony megvalósításához elengedhetetlen a szőlőre és annak környezetére jellemző mikrobiom, ezen belül a betegségeket okozó gombák és ezek szinergistáinak és antagonistáinak leírása. Továbbá a jelen lévő mikroorganizmusok közötti kölcsönhatások, valamint az ezekre ható abiotikus környezeti faktorok viszonyának meghatározása, ugyanis a patogének jelenléte nem minden esetben vezet a tünetek megjelenéséhez. A betegségek pontosabb megértéséhez fontos a jövőben feltárni többek között a növény korának szerepét, a sebgyógyulásban és védekezésben szerepet játszó fenolos vegyületek funkcióját, valamint a gazdanövény endofita mikroorganizmusainak kölcsönhatásait.

2. CÉLKITŰZÉS

Kutatásunk célja, hogy az Esca betegségért elsősorban felelős *Phaeomoniella chlamydospora* (Pch) által okozott tünetek erősségét összefüggésbe hozzuk a szőlő mikrobiótájában természetes körülmények között jelen lévő mikroorganizmusokkal. Jelen dolgozatban a szőlő szállítószőveteiből izolált *Erwinia billingiae* (Ebi) baktérium hatására, a Pch virulenciájában bekövetkező változásokat, valamint a két mikroorganizmus közötti kölcsönhatásokat vizsgáltuk.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. A szőlőt befolyásoló biotikus tényezők és a szőlő mikrobiomja

A szőlő kiemelt helyen szerepel a mezőgazdaságban, mely visszavezethető a borászati tradíciókra és a bor mitológiai szerepére egyaránt. A termesztési adatokban megfigyelhető változások összefüggésbe hozhatóak az időjárási tényezőkkel, a szőlő szervezet- és élettani sajátosságaival, továbbá a különböző mikro- és makroorganizmusok behatásával egyaránt.

A borteremő szőlő roppant kényes növény, rengeteg kártevője ismert volt már az 1890-es években, pl. a hernyók, legyek, bogarak pajzs- és levéltetvek, kabócák, poloskák, termeszek, atkák, csigák és a sort még hosszan folytathatnánk (Jablonowski, 1895). Azonban nem csupán makroszkopikus kártevőinek széles a skálája, a szőlőtőkéhez sok különböző mikroorganizmus társul és képes kolonizálni annak mind külső (epifitonok), mind belső (endofitonok) felületeit. Ezen mikrobák hatásai lehetnek negatívak, de pozitívak is. Bizonyos mikrobák több aspektusban is kulcsszerepet játszanak a növény egészsége szempontjából. Stimulálhatják a növény ellenállóképességét a mechanikai sérülésekkel szemben, vagy gátolhatják a növényi kórokozókat. Fontos tehát tisztázni, milyen hatással lehetnek adott mikroorganizmus-növény kapcsolatok a szőlő fitneszére és a termésre.

A mikrobiom definíciója egy új megközelítés szerint, egy olyan karakterisztikus mikrobiális közösség, amely jól leírható élőhelyeket foglal el, amiknek elkülönülő fizikai-kémiai tulajdonságai vannak. Tehát nem csupán a magába foglalt mikroorganizmusokra utal, hanem azok tevékenységének színterére is, ami sajátos ökológiai nichék kialakulását eredményezi. Egy dinamikus és interaktív ökoszisztémaforma, mely változhat időben és térben. Ez a „tevékenységi színtér” magába foglal minden mikrobiális összetevőt, metabolitot (szignál- és organikus molekulák, toxinok) és a környezeti feltételeket (Berg és mtsai., 2020).

Az ebben a témában készült tanulmányok azt mutatják, hogy a növény föld feletti részeinek baktériumközössége erősen függ sok, különböző faktortól, beleértve a vegetatív ciklus különböző állomásait (Pinto és mtsai., 2014), a szőlő fajtáját, a geográfiai helyzetet, a dülő kitettségét vagy a talaj mikrobiális összetételét, tehát sok egyedi mikroba képes kolonizálni a föld feletti növényi szerveget. A szőlőt kolonizáló mikrobiom sajátos összetétele mellett fontos megjegyezni, hogy a dülő talaja a gyűjtőhelye azon baktériumoknak, amelyek képesek megtelepedni a filozférában (Zarraonaindia és mtsai., 2015). A levél, virág és termés mikrobiomjáról szóló tanulmányok nem meggyőzőek a GTD kórokozók jelenléte és a GTD

tünetek kialakulása közötti összefüggés tekintetében, tehát a tőkebetegségekért felelős gombák nem ezen részeket fertőzik (Bertsch és mtsai., 2013).

Több publikáció alapján a bakteriális társulás a levélszinten elsődlegesen Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroides és Actinobacteria csoportok tagjaiból áll össze, míg a virágban a *Pseudomonas* és *Erwinia* fajok dominálnak (Bekris és mtsai., 2021; Deyett & Rolshausen, 2020; Niem és mtsai., 2020). Nagyobb változatosság figyelhető meg az epifiton közösségben, mint az endofitonban. A mikrobiom eukarióta közösségének összetétele levél esetében az Ascomycota és Basidiomycota törzsek által dominált (Pinto és mtsai., 2014).

A fűrészek endofita baktériumairól kevesebb információ áll rendelkezésre, a dominánsak a Proteobacteria (~50%) és Actinobacteria (~18%) és Bacteroidota (~14%) fajok voltak, egészséges és tünetes növényben egyaránt. Egészséges növények bakteriális mikrobiomjában domináns volt a *Bacillus* és *Streptomyces* taxonok tagjai, amelyek fordított mennyiségi összefüggést mutattak többek között a Pch-val, tehát valószínűsíthető ezen mikroorganizmusok védelmi szerepe a GTDK-kel szemben (Bekris és mtsai., 2021; Deyett & Rolshausen, 2020; Niem és mtsai., 2020).

A föld feletti fásodó részekben leírható gombabiom fajgazdagsága összefüggésben áll a növény életkorával, idősebb növényekből több taxont izoláltak. Jellemzően a szőlő endobiomjának gombái az Ascomycota, Basidiomycota és Zygomycota törzsekbe tartoztak, legnagyobb gyakorisággal az *Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus* nemzetségek voltak jelen, megemlítendő a Botryosphaeriaceae, Nectriaceae, Diaporthaceae családok, ill. a *Phaeomoniella* nemzetség tagjait, mely utóbbiak szerepet játszanak a korai tőkeelhalásban (Bertsch és mtsai., 2013; Del Frari és mtsai., 2019; Dissanayake és mtsai., 2015, 2018; González és mtsai., 2009; Gramaje és mtsai., 2018; Gramaje & Armengol, 2011; Jayawardena és mtsai., 2016, 2018).

A gyökérzóna mikrobiális fajgazdagsága nagyon magas, ugyanakkor a rhizoszférában jóval alacsonyabb a bakteriális diverzitás, mint a kötött talajok esetében (Marilley & Aragno, 1999) és összetétele is nagyban eltér (Bulgarelli és mtsai., 2012; Peiffer és mtsai., 2013), ami a gyökérzóna által kialakított erősen szelektív környezetre utal (Quiza és mtsai., 2015).

3.2. A szőlő és kórokozói kölcsönhatásai, a tőkebetegségekkel szembeni védekezési lehetőségek

A növény és a kórokozó közötti kapcsolat a kontaktus fázisával kezdődik, a növényi szövetek felszínén. Válaszként a fertőzött egyedek képesek több önvédelmi mechanizmust aktiválni,

vagyis a konstitutív védekezés mellett indukálható védekezési mechanizmusok is szerepet játszanak a szőlő kórokozókkal szembeni védekezésében..

Konstitutív védekezés esetében a növények már a patogén megjelenése előtt aktív állapotban vannak. Valószínűleg képesek korlátozni a paraziták belépését a gazdanövény szöveteibe közvetlenül, vagy a már megfertőzött szövetek elzárásával. Ez általában a levél, fűt és bogyók morfo-anatómiai jellemzőire utal, amelyek a gombatámadásoktól függetlenül alakulnak ki, vagy olyan anyagokat tartalmaznak, amelyek antimikrobiális hatásúak. Ezen molekulák szintézise fokozódhat fertőzés esetén, ami a stresszre adott növényi válaszként értelmezhető.

A levél abaxiális felületén található levélszőrök hidrofób gátként szolgálhatnak, csökkentve a kontaktus területét azáltal, hogy kevesebb mennyiségű vizet engednek a levéllemezhez. A levélszőrök nagy számban való jelenléte a levél felületének víztartókéességének csökkenéséhez vezet, ami döntő fontosságú a fertőzés szakaszában.

A sztómák a legfontosabb útvonala a patogének bejutásának a levélen. A patogén zoospórák az egészséges sztómákon kémiai vegyületek által (pl.: aminosav, izoflavonoidok, pektinek és sejtfalfragmentumok) regulált kemotaxist eredményeznek. A sztóma gyakorisága és a növény betegségre való fogékonysága között nem tárták még fel egyértelműen a kapcsolatot.

A kutikula egy védelmi funkciót betöltő membránja a levegővel érintkező növényi szöveteknek, amellyel stabilizálja a növény a formáját, csökkenti a vízvesztést és kontrolálja a gázcserét. Két rétegből áll, amiknek kvantitatív különbségeik figyelhetők meg a különböző fajtáknál, ennek aránya genetikailag kódolt és a környezeti tényezők által módosított. Elsődleges védelmi gát, ami sok növényi patogén esetében megállítja a növényi szövetek fertőzését, továbbá a különböző struktúra, összetétel és vastagság fontos szerepet játszik a védekezésben, utóbbiban való különbségek negatív korrelációt mutatnak a fajta fogékonyságával, ebből következik, hogy a kórokozók bejutására elsődlegesen a külső sérüléseknél van esély (Sladonja & Poljuha, 2013).

A modern fenntartható szőlőtermesztés célja a vegyszeres kezelések korlátozása, alternatív stratégiák alkalmazásával. Az egyik a szőlő rezisztenciájának kiváltása az immunitás stimulálásával. A növényi immunitást két fő védekezési útvonal szabályozza (Boller & Felix, 2009), melyek olyan növényi jelátviteli eseményeket indítanak el (Garcia-Brugger és mtsai., 2006; Jeworutzki és mtsai., 2010; Tsuda & Katagiri, 2010), amik nagyszabású transzkriptóm-átprogramozáshoz vezetnek (Galletti és mtsai., 2008; Pitzschke és mtsai., 2009). A növényi hormonok, mint például a szalicilsav, a jazmonsav és az etilén részt vesznek a védekezési

válaszok finomhangolásában (Koornneef és mtsai., 2008). E védekező jelátviteli útvonalak egyik eredménye az antimikrobiális másodlagos metabolitok, például a fitoalexinek termelése (Hammerschmidt, 1999), a sejtfal másodlagos vastagodása és a patogenezishez kapcsolódó fehérjék megjelenése, ill. koncentrációjuk növekedése (Loon és mtsai., 2006). A GTDk-kel szembeni ellenállóságot többek között a fás szövetekben mérhető lignintartalommal és az szállítószöveti elemek átmérőjével is összefüggésbe hozták (Pouzoulet és mtsai., 2014; Rolshausen és mtsai., 2008).

Antimikrobiális vegyületek közül fontos a rezveratrol, ami bár nem azonnali hatást mutat, de hosszú távú együttes inkubáció a patogénekkal azok kondídiumainak csírázását és csíratömlők növekedését gátolja. A sztilbének indukált védekezési mechanizmusokban való részvétele kimutatható. A pterosztilbén szerepet játszhat a penészesedés ellen, rezveratrollal komplexet alkotva pedig a peronoszpóra fertőzés során mutat toxicitást, ami a patogének sztómákból való kiszorításában és a fertőzött szövetekben való felhalmozódásában nyilvánul meg. Továbbá ez a legmérgezőbb sztilbén vegyület a liztharmattal szemben, mivel a kórokozó növekedésének és fejlődésének gátlását okozza. Átlagos konstitutív tartalma a szőlőben nagyon alacsony. Szintén erősen toxikus hatást mutatnak az ugyancsak a sztilbének közé tartozó viniferin molekulák (Sladonja & Poljuha, 2013).

A növényi hormonként számon tartott jázmonsav metilált formája növeli a növény összes fenol- és flavonoid tartalmát (Tao és mtsai., 2022). A fenolos vegyületek nagyon heterogén csoportja a növényi metabolitoknak, amik jelen vannak a szövetekben és adaptív válaszáért felelősek kedvezőtlen környezeti körülmények között. Fiziológiailag fontosak a szén tárolásában, a tápanyaghiány pótlásában és fénykárosodás elleni védelemben, valamint fertőzések esetén. Felhalmozódásuk a növény HR reakciójával függ össze. Gyors növényi válasz esetén koncentrációjuk megnő a nekrotikus foltokban, a fertőzött sztómákban és az azokhoz közeli szövetekben és gátolják a kórokozó növekedését. A hatékony indukálható védekezési mechanizmusok továbbá magukba foglalják a lokalizált H_2O_2 termelést és a lignin bioszintézisében részt vevő géneket.

GTDk-kel szemben jelenlegi védekezési lehetőségek közül az egyik legrégebb óta alkalmazott módszer az ún. „gyógyászati műtét”, mely során a fertőzés által érintett növényi részek eltávolításra kerülnek. Ennek sikere korlátozott, ha a fertőzés elérte a talajt vagy a belső szöveteket. Különösen igaz ez az Esca betegségre, ahol gyakran megfigyelhető belső nekrozis mind az érintett növények sarjfájában, mind pedig az alanyban (Epstein és mtsai., 2008).

Alkalmazható továbbá a metszési sebvédelem, ami magába foglalja a sebek pasztákkal, festékekkel és gombaölő szerekkel való kezelését (pl.: tiofanát-metil, bór) (Billones-Baaijens és mtsai., 2015; Rolshausen és mtsai., 2010, 2010; Rolshausen & Gubler, 2005; Sosnowski és mtsai., 2008, 2013). A fertőzések visszaszoríthatók a metszés késleltetésével, tehát a patogének számára kedvezőtlen környezetbe való sebképzéssel, valamint a talaj megfelelő nedvességtartalmának fenntartásával, mivel a túlöntözés kedvez a talajban terjedő patogéneknek és csökkenti a gyökérszóna légellátottságát (Toussoun és mtsai., 1970). Tisztított metszőollókról, oltógépekből és öntözőtartályokból is kimutatták a feketelábúság és a petri-betegség kórokozóinak szaporulatait (Agustí-Brisach és mtsai., 2013; Aroca és mtsai., 2010; Gramaje és mtsai., 2011; Retief és mtsai., 2006), így az eszközök gyakori fertőtlenítése is csökkentheti a fertőzések kockázatát. A kémiai kontroll alkalmazása nehézkes, mivel a külső kórokozók ellen alkalmazott fungicidek nem hatolnak be kellő mélységbe, így az szállítószövetben lévő gombákra hatástalanok (Gramaje és mtsai., 2009).

30 perces, 50 °C-os forró vízzel történő kezelés a nyugalmi állapotban lévő vesszők leghatékonyabb fertőtlenítési eljárása, azonban túl nagy veszteségeket okoz azáltal, hogy megnehezíti az így kezelt dugványok gyökeresedését (Ophel és mtsai., 1990; Wample, 1993).

Alternatív módszer pl. az elektrolizált savas víz dugványokra való kijuttatása a hidratációs szakaszban, a növény növekedésének befolyásolása nélkül, mely gyakorlat eredményesnek mutatkozott a Pch és a *P. minimum* konídiumcsírázásának csökkentése tekintetében; az ónozás azonban a Botryosphaeriaceae fajok és a Pch esetében hatástalannak bizonyultak (Di Marco & Osti, 2009). Az indiai mustármagliszt (*Brassica juncea*) a beteg tőkék alá temetve javította a terméshozamot, valamint csökkentette a betegségek terjedését a kalluszosodás időszakában és szignifikánsan csökkentette a patogének jelenlétét a talajban (Gramaje és mtsai., 2018).

A GTDk biológiai leküzdésére (biológiai kontrollálás, BCA = biocontrol agents) vonatkozó legtöbb tanulmány a *Bacillus subtilis*, a *Trichoderma atrovirens* és a *T. harzianum* alkalmazását vizsgálta. Jelenleg kereskedelmi forgalomban kapható por, granulátum, pellet, a fenti mikrobákat, mint hatóanyagokat tartalmazva. Ezek hatására a Pch és *Phaeacremonium* fajok előfordulása és nekrotikus hatása csökken (Fourie & Halleen, 2004, 2006; Osti & Di Marco, 2007). További bizonyítottan BCA hatással bíró mikrobák a *Pythium oligandrum* (Yacoub és mtsai., 2016), a *Rhizophagus irregularis*, valamint rizo- és/vagy endoférában megtalálható baktériumok, amik csökkentették a tökebetegségek hatásait, képesek csökkenteni a Pch által okozott léziók hosszát a fertőzött szőlődugványokon (Gramaje és mtsai., 2018).

Valószínűsíthető, hogy az integrált növényvédelem (IPM) megközelítés, amely az összes fenti védekezési lehetőség kombinációja, a legsikeresebb stratégia a GTD fertőzések minimalizálására.

3.3. Tőkebetegségek általános bemutatása

A *V. vinifera* 29 gombás megbetegedésre hajlamos, ezek közül a GTDk-et tartják a legpusztítóbbnak (Gramaje és mtsai., 2018). A korai tőkeelhalás esetében az aszkomikóta fajok, valamint bizonyos bazidiomikóta taxonok játszanak fontos szerepet (Cloete és mtsai., 2015; M. Fischer, 2002).

Bár a GTD relatív új fogalom, a betegség korán sem az (Mugnai és mtsai., 1999). 1912-ben Lionel Petri igazolta, hogy a nekrozist mutató szállítószövetekből izolált *Cephalosporium* és *Acremonium* fajok a tünetek megjelenéséért feleltek. Az 1900-as évek elején pedig Donald Reddick mutatta ki, hogy a *Diaporthe ampelina* kapcsolatba hozható a növényi sejtburjánzással, tőkeelhalással és a ma Fomopsziszos tőkeelhalás néven ismert betegségre jellemző tünetekkel (Gramaje és mtsai., 2018). 1964-ben Chamberlain és mtsai. azonosítottak több Botryosphaeriaceae családba tartozó fajt, mint patogént (Chamberlain és mtsai., 1964). Az Eutípás tőkeelhalást elsőként Ausztráliában kötötték az *Eutypa lata* nevű gombához (M. Carter, 1957). Már több, mint ötven éve használják a feketelábúság kifejezést a hasonló tüneteket (gyökérnekrozisok és általános hanyatlás) mutató betegségek leírására. Mindazonáltal, hogy régóta ismertek ezen betegségek, a kórokozók fontosságát és hozzájárulását a növény egészségi állapotához csak az utóbbi időben vizsgálják részleteiben (Gramaje és mtsai., 2018).

A GTDk növekvő gyakorisága több különböző faktor eredménye. Először a '90-es évek alatti intenzív szőlőtelepítés fokozta a patogének terjedésére, mely nemcsak a potenciálisan szennyezett szaporítóanyag gyors mozgása miatt mutatkozott, hanem a nagyobb területű, idősebb ültetvények kialakulása következtében, ami okán világszerte szembetűnő mértékben jelentek meg a tünetek. Másodszor a termelési módszerek drasztikus változásai, végül bizonyos fungicid szerek betiltása kedveztek a gombás fertőzéseknek (Gramaje és mtsai., 2011, 2018).

A GTD modern meghatározását a '90-es évek végén írta le több tudós közösen (Mugnai, 2011). Megfigyeléseik között szerepelt, hogy bizonyos gombacsoportok számára elsősorban a nyílt, fás szövetek jelentik a belépési pontot, beleértve minden mezőgazdasági folyamat által okozott sebet. A kórokozók ezeket fertőzve jutnak be a növényi szervezetbe és kolonizálják, károsítják a szállítószöveteket és levéltüneteket is okoznak. Továbbá sok GTD-hez kapcsolt patogénként ismert fajról megállapították, hogy sejtburjánzást és korai elhalást okoznak az évelő növények

széles körében (Gramaje és mtsai., 2016, 2018). Ezen kórokozók elsősorban a levegőben terjedő spórák szétszóródásával, de fertőzött dugványok használatával is tovább terjedhetnek. A gombafajtól függően, az aszkospóra (ivaros spóra) vagy a konídium (ivartalan spóra) a kéregbe és/vagy az elhalt fás szövetek felületébe beágyazódott peritéciumokból vagy piknídiumokból szabadul fel. Az aszkospórák és konídiumok kialakulása kedvező környezeti feltételek mellett megy végbe, amik elsősorban csapadékos időjáráshoz vagy magas relatív páratartalomhoz kapcsolódnak, abban az esetben, ha a hőmérséklet fagypont felett van (Gubler & Eskalen, 2001; Rooney-Latham és mtsai., 2005; Úrbez-Torres, Battany, és mtsai., 2010; Úrbez-Torres, Bruez, és mtsai., 2010; van Niekerk és mtsai., 2010). Ezt követően az eső, a szél vagy ízeltlábúak terjesztik a spórákat, amíg azok a behatolás szempontjából érzékeny sebekhez nem jutnak, majd kicsírázásuk vezet a xilémben és belparenchima sejtekben való megtelepedéshez (Moyo és mtsai., 2014). Ugyanakkor szerencsére a fertőzési ráták relatív alacsonyak (3,6% és 28,6% között mozognak, a patogének függvényében) és csak abban az esetben valósulnak meg, ha az inokulum koncentráció 10^4 és 10^6 spóra/ml között helyezkedik el (Carter & Moller, 1971).

Kimutatásra került, hogy a spórafelszabadulások, ebből következően a nagy kockázatú fertőzési időszakok, a tenyészidőszak során függenek a kórokozóktól, a földrajzi elhelyezkedéstől és átfedésben vannak a nyugalmi metszési időszakokkal. A növény érzékenysége elsősorban a metszés idejétől, továbbá a metszés és az esetleges fertőzési események között eltelt időtől függ. A régiók közötti eltérések az éghajlati különbségekre vezethetők vissza. Nehéz egyértelmű következtetéseket levonni, hiszen a különböző kutatások eltérő patogéneket és szőlőfajtákat vizsgálnak, eltérő környezeti tényezők mellett (M. V. Carter & Moller, 1970; Price, 1973).

A magas hőmérséklet növénykárosító hatásán kívül egyéb szélsőséges környezeti viszonyok (pl.: nagy esőzések vagy aszályok, tavaszi fagy stb.) is befolyásolják a gazdanövény fiteneszén túl a patogén gombák terjedését is (Van Niekerk és mtsai., 2011). Az Esca betegség tünetei súlyosbodnak vízterhelés alatt, amint a Pch esetében kimutatták (Edwards és mtsai., 2007a, 2007b; Ferreira és mtsai., 2017). A magas páratartalommal, alacsonyabb átlaghőmérséklettel leírható, csapadékosabb évjáratokban megemelkedett a GTD-fertőzött tőkék száma, így logikus, hogy ezen időjárási körülmények kedveznek a fertőzésnek.

Feltételezhetően számos, a kórokozó által kiválasztott, különböző molekula részt vesz a fertőzési folyamatban, például extracelluláris fehérjék (Luini és mtsai., 2010), szekunder metabolitok és poliszacharidok is (Bruno & Sparapano, 2006). A gombák termelik a legtöbb másodlagos metabolitot, melyekből sok vélhetőleg fitotoxinként működik, ezek lehetnek poliketidek, fenolpropinátok, fenolok, terpének, szteroidok és alkaloidok, jellemző ez a GTD

kórokozókra is (Andolfi és mtsai., 2011). Egy másik hipotézis szerint a fertőzött fában a xilémnedv áramlásának akadályozása tápanyaghiányt eredményez a lombozatban és ez felelős a levéltünetek kialakulásáért. A szállítószövet kórokozók által okozott közvetlen károsodása és elzáródása mellett, a rájuk adott növényi reakciók is hozzájárulhatnak a xilémben megfigyelhető rendellenességekhez, hiszen a gazdaszervezet úgy próbálja megakadályozni a kórokozók terjedését, hogy elzárja az érintett edénynyalábokat, ami csökkenti a xilémnedv áramlását (Bortolami és mtsai., 2023).

3.4. A szőlő tökebetegségek csoportjába tartozó kórképek

A szőlőtőkék megbetegedését egy, vagy több GTD is okozhatja egyszerre, a különböző patogéneknek többszörös fertőzési lehetőségei vannak szezonálisan és egész évben egyaránt. Továbbá bizonyos tünetek átfedést mutatnak a különböző GTDk között, ami megnehezíti ezek szabadföldön történő azonosítását. A három fő tökebetegség jellemzőit tárgyaljuk.

3.4.1. Botrioszfériás tökeelhalás

A hajtások késleltetett tavaszi növekedésében, a hajtás elhalásában, a rügy és a xylém nekrozisában nyilvánul meg. A piknídiumok elhalt fából fejlődnek ki. Fő tünete a fás szöveteken megjelenő ék alakú rákos sejtszaporulat vagy körkörös/egyenletlen központi foltosodás. 1-2 évvel az infekció után jelennek meg a betegség jelei, főként idősebb dűlőkön.

3.4.2. Eutipás tökeelhalás

Tünetei a klorotikus levelek, melyre begöngyölt szél és nekrotikus vonalak jellemzőek. Főként 3 és 8 éves kor közötti növényeket támad és évenként megjelenik. A csökevényes hajtásokon a fürtök egyenetlenül érnek, kicsik és súlyos esetben a bogyók töppedését, majd pusztulását okozza. A fás szövet tünetei közé tartozik a kordon elhalása, ezek belsejében megjelenő ék alakú nekrotikus foltosodás. A kordonok pusztulását követően külső sejtburjánzások jelennek meg, jellemzően a kérek nélküli területeken. Számos a Diatrypaceae taxonba tartozó faj okozhatja, ezek közül az *E. lata* a legvirulensebb és az egyetlen, ami a levéltünetekért felelős.

3.4.3. A szőlőnövény Esca betegsége

A betegségnek két típusát különítjük el, a krónikus (enyhe) és az akut („gutaütés”, apoplexia). Az előbbi esetében a levéltünetek nagyon változatosak, száradás, lehullás, pirosodás vagy sárgulás jelentkezhet (Beris és mtsai., 2022; Lecomte és mtsai., 2012), a legjellegzetesebb megjelenési formája az ún. tigris-csíkoság (Surico, 2009). A levélfelület elszíneződésével egyidőben száradnak a levelek, világos vagy pirosas-barna nekrotikus szövetek keletkeznek,

gyakran ezeket vékony piros vagy sárga klorotikus sávok határolják. A piros színezettség valamint a leveleken, vagy akár a bogyó héján megjelenő sötét foltok a fehérszőlő esetében gyakoribbak (Mugnai és mtsai., 1999). Az akut típusra az egész tőke, vagy egy kordon zöldhajtásainak hirtelen száradása jellemző, levéltünetként a perzselődést, hullást és zsugorodást írták le. Mindkét esetben a levéltünetek késő tavasszal, vagy nyáron jelennek meg. Jellemző a xylémekben megfigyelhető fekete foltok, amiket rózsaszíntől barnáig tartó átmenettel jellemezhető elszíneződések határolnak, barnától feketéig terjedő ércsíkok, vagy az elszáradt fák esetében ezüstös szín megjelenése. Idősebb szőlőben a fa fehéres-sárgás lágy korhadását okozhatja (Fischer, 2002).

Az Esca vita tárgyát képezte az elmúlt évtizedekben, hiszen számos taxonómiai nem rokon gombafajt, valamint sok endofita baktériumot izoláltak a betegségben érintett tőkék fás szöveteiből (Bruez és mtsai., 2014, 2015, 2016; Hofstetter és mtsai., 2012). Azonban ezeknek a mikroorganizmusoknak a szerepe és az, hogy hogyan lépnek kölcsönhatásba a betegség tüneteivel felelős elsődleges gombákkal, még mindig kérdéses. A legelterjedtebb hipotézis szerint a Pch és/vagy a *Phaeoacremonium* fajokkal fertőzött tőkékben később kialakulhatnak a tünetek, amennyiben további bazidiumos gombák (*Inocutis*, *Inonotus*, *Fomitiporella*, *Fomitiporia*, *Phellinus* és *Sterum* nemzetségek) is kolonizálják a gazdanövényt (Cloete és mtsai., 2015). Az Esca-kór – vagy általában a szőlőtőke-betegség – patogenezise még mindig tisztázatlan. A levéltünetek kialakulásának molekuláris és fiziológiai hátterében már említett bizonytalanságok mellett az Esca néhány jellemzője nagyon nehezen érthetővé teszi kialakulását. Az egyik ilyen tulajdonság a külső tünetek ingadozó kifejeződése, ami hiányozhat a fanekrózisban szenvedő gazdaszervezetből, ill. a betegség nagyon hosszú látenciája, amely több évig is eltarthat (Beris és mtsai., 2022). Egy másik zavaró tény, hogy a kórokozók mennyisége a gazdaszervezetben és a tünetek kifejeződése közötti várható összefüggés gyakran nem mutatható ki természetesen fertőzött növényekben (Bruez és mtsai., 2014; Mondello és mtsai., 2018), ami arra utal, hogy a kórokozók tagjai a szőlő egészséges endofita mikrobiómjának. A fenti ellentmondások miatt a külső tényezők és a ritka események az Esca-tünetek kialakulásában döntő jelentőségűnek vélhetők. Egyes kutatók olyan külső kiváltó tényezőkre összpontosítanak, mint a csapadék és a hőmérséklet (Calzarano és mtsai., 2018), vagy a metszési gyakorlat (Lecomte és mtsai., 2018). Mások a kórokozók között létrejött mikrobiális kölcsönhatások szerepét hangsúlyozzák (Sparapano és mtsai., 2001), vagy akár a nem patogén baktériumok (Haidar és mtsai., 2021) vagy gombák (Karácsony és mtsai., 2023) szerepét. Egy másik elmélet azzal magyarázza az Esca kifejeződésének jellemzőit, hogy

feltételezi, hogy kritikus patogén biomasszának kell megvalósulnia a gazdaszervezetben ahhoz, hogy a tünetek kifejlődjenek (Hrycan és mtsai., 2020). Ez megvalósulhat akár a termelt patogenitási faktoroknak a növekvő kórokozó biomasszával arányos mennyiségi növekedésével, vagy a gombáknak az ártalmatlan endofita növekedésről a patogén viselkedésre való áttéréssel egy adott sejtsűrűség mellett. Számos tanulmány sugallja bizonyos GTD gombák, pl. a Pch, a *P. minimum* és több *Botryosphaeriaceae* faj endofita fázisát szőlőnövényben (González & Tello, 2011), mivel ezek izolálása megvalósítható tünetmentes, kifejlett növényekből (Aroca és mtsai., 2010; Edwards & Pascoe, 2004; Hofstetter és mtsai., 2012). Valószínűsíthető, hogy a gombák különböző biotikus és/vagy abiotikus stressztényezők hatására válnak kórokozókká, tehát látens patogénként is szerepet játszhatnak a szőlőben. További vizsgálatok szükségesek, hogy meghatározhassuk, milyen folyamatok váltják ki ezen endofita mikroorganizmusok kórokozóként való megjelenését (Ferreira és mtsai., 2017).

A vizsgálataink tárgyát képező Pch konídiumainak több, mint 90 %-a fejlesztett csíratömlőt 20 és 30 °C közötti hőmérsékleten, de még 40 °C felett is képes volt csírázni. A csírázáshoz szükséges nedves időszakok hossza Pch esetében maximum 24 óra, ezek 50 %-nak megjelenéséhez 17,2 óra volt szükséges (Ji, Altieri, és mtsai., 2023; Ji, Salotti, és mtsai., 2023). A Pch szignifikánsan magasabb arányban van jelen a télen csapadékos régiókban (24,5%), mint a nyáron csapadékos (5,4%) régiókban, kiderült, hogy a régió-tünet-patogén kölcsönhatás alapján a Pch volt a legszélesebb tünetprofilal rendelkező patogén a téli csapadékos régiókban. Leggyakrabban csapadékos területeken, fekete (29,7% és 42,9% között) és barna nekrotikus foltokból (15,8%), ill. az ék alakú nekrozisokból (12,5%) izolálták vissza. A Pch spórákibocsátása szorosan összefügg a csapadék előfordulásával, hyphomycete és piknidiális szinanamorfjait is megfigyelték a szőlőtörzsek repedéseiben lévő védett felületeken spórázva (van Niekerk és mtsai., 2010).

A szekretált sejtfalbontó enzimek (Fleurat-Lessard és mtsai., 2023) valamint a reaktív hidroxilgyökök nem enzimes termelésének (Perez-Gonzalez és mtsai., 2022) hatására a gombák károsítják a fertőzött fás szöveteket, ami fekete nekrozist okoz. Amikor a *Fomitiporia* fajok (másodlagos kolonizálók) elérik a megfelelő kolonizációs fokot, létrejön az Esca proper-szindróma (Beris és mtsai., 2022), mely a farész másodlagos fehér korhadásaként jelentkezik. A fában jelentkező helyi tünetek mellett az Esca a fertőzött növények egynyári részében is kifejeződik. A tünetek kialakulásának háttere a gazda zöld részein sem tisztázott, mivel maguk a kórokozók nem kolonizálják ezeket a szerveket. Valószínűleg a fitotoxikus metabolitok a

fertőzött farészben szállítódnak, eljutnak a levelekbe és hozzájárulnak az ottani tünetek kialakulásához (Bertsch és mtsai., 2013).

A naftalén poliketidek másodlagos metabolitok, amelyeket általában gombák és növények állítanak elő. A GTD patogének esetében leggyakrabban kimutatott ilyen molekulák a szkitalon és izoszkleron. Ezek vizsgálata során azt tapasztalták, hogy előbbivel kezelve a növényt, azon világoszöldtől klorotikusig terjedő, szabálytalan foltokat okozott a levél érhalózata között, míg az izoszkleron nagy, összefüggő klorotikus és nekrotikus foltokat eredményezett, majd a lamina torzulásához és elszáradásához vezetett. Ezek és további két pentaketid is izolálva lett Pch-ból, amik összefüggésben lehetnek a tőkeelhalással. Feltételezhető, hogy a Pch hajlamosítja a szőlőt a fa nekrozisára azáltal, hogy lebontja a növény toxikus fenolvegyületeit és más, a gazdaszervezet által termelt anyagokat, amelyek gátolhatnák a fa rothadásáért felelős gombákat. Azonban a betegség tüneteinek előfordulását közvetítő mechanizmusok, valamint a fertőzés során a gazdaszervezetben és a kórokozóban bekövetkező változások kevésbé ismertek (Gubler és mtsai., 2004). A kumarinok és izokumarinok olyan természetes vegyületek, melyek a sikimisav bioszintézis-úton át szintetizálódnak és gyakori fitotoxikus metabolitjai a gombáknak (Cimmino és mtsai., 2015). A fentiek közül a szkitalon ismert melanin intermedier. Ez utóbbi molekula felelős a gombák pigmentációjáért, így feltételezhető, hogy a gombák erősebb pigmentációja indikátora lehet a magasabb virulenciának (Greenblatt & Wheeler, 1986).

Az Esca kórokozói esetén a másodlagos anyagcseretermékek mellett vélhetőleg fehérjék (Luini és mtsai., 2010) és szekretált poliszacharidok (pl.: pullulán, Bruno és mtsai. 2007) is részt vesznek a gazdanövény tüneteinek kialakításában.

Az Esca jellemző tünetei az 1. ábrán megtekinthetők, a másik két fő szőlő tőkebetegséggel együtt (Bertsch és mtsai., 2013).

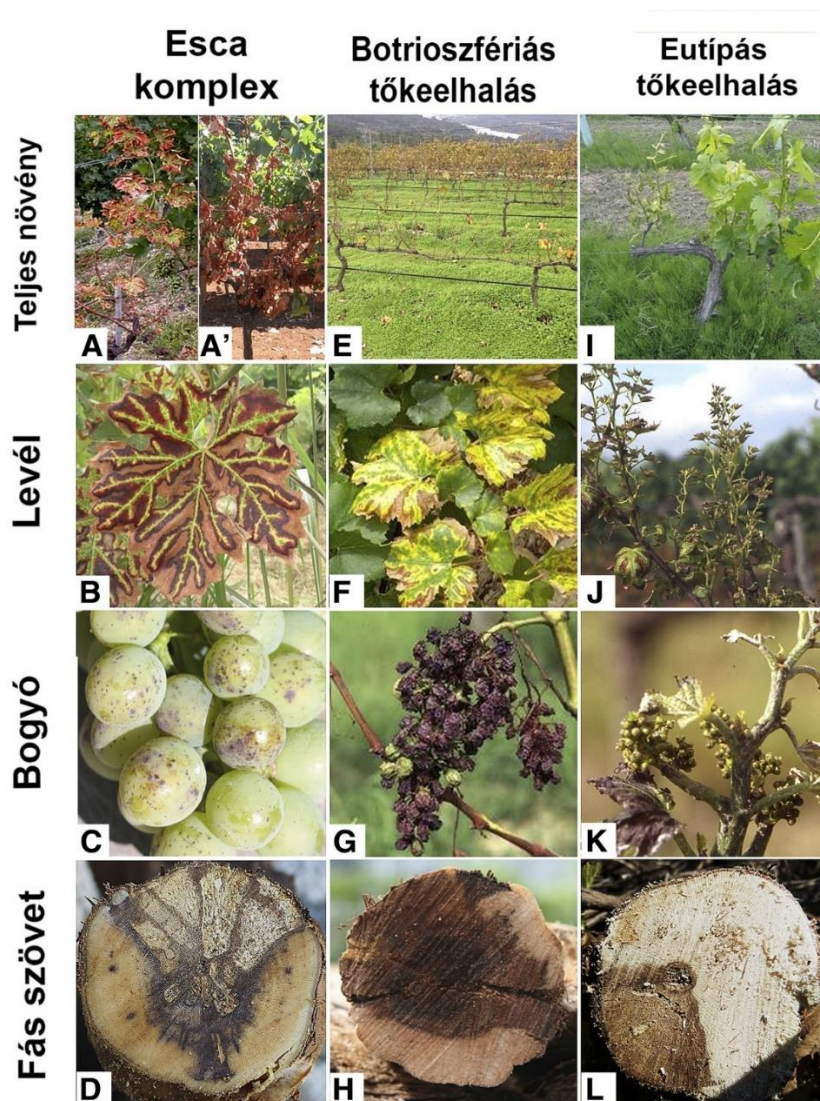
3.5. Az *Erwinia* nemzetség és az Ebi

Az *Erwinia* nemzetséget az Enterobacteriaceae családba sorolják, az ide tartozó taxonok fő fenotípusos jellemzői megegyeznek, savat termelnek cukorból, peritrikus flagellumokkal rendelkeznek, bizonyos szubsztrátok fermentálására képesek anaerob körülmények között. Négy csoportba sorolják őket, az egyik tagjait a D-glükózt szokatlan oxidatív metabolizmusa és az általuk létrehozott, sárgától mályva színig terjedő, telepek jellemzik. E genusznak sok tagja jellemzően növényi betegségeket okoz, ezeknek alapvetően négy típusa van, a gyors

nekrózis, a progresszív szövetmaceráció (puha rothadás), elzáródás (érrendszeri hervadás) és daganatképződéshez vezető hipertrófia.

A nekrogén csoport tagjai közül sok fertőz a gazdanövény virágzási időszakában, rovarok általi terjedéssel (*E. amylovora*) és a mezőgazdasági gyakorlatok által (*E. ribrifaciens*). A maceratív csoportba tartozó fajok jellemzően a rizoszférához kapcsolódnak. A vaszkuláris hervadásos csoport tagjai szisztémásan fertőzik a gazdanövényt, exopoliszacharid anyagok szekréciójával az érrendszer elzáródását okozzák, ami elhaláshoz és hervadási tünetekhez vezet, terjesztésükben bogarak vesznek részt, áttelelésük is rovarokban valósul meg. A sejtburjánzást okozó fajok bizonyos növényfajokat fertőznek, így az ide tartozó taxonok gazdaspecifikusak. Alma, körte, birs, dió, kukorica, gumós- és hagymás növények esetében leírásra került több patogén is.

A Mergaert és munkatársai által, 1999-ben leírt Ebi a hipertrófiát okozó csoportba tartozik, másodlagos kolonizáló, jellemzően a Rosaceae család taxonjait tartják gazdanövényüknek (Kado, 2006). Kutatások alapján az Ebi, mint lehetséges biokontroll ágens is le lett írva, hiszen magas védelmet biztosított körte gyümölcsében és alma virágában a tűzelhalás ellen (Mikiciński és mtsai., 2020).



1. ábra: A fő szőlőtőke-betegségek tünetei felnőtt szőlőültetvényeken. A különböző fertőzések okozta tünetek eltérőek a levelek és a bogyók tekintetében, de hasonlítanak a fás szövetek nekrózisában (Mondello és mtsai., 2018).

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1. A vizsgált mikroorganizmusok tenyésztése

A kísérletek során az alábbi táptalajok kerültek felhasználásra:

- **YG:** yeast extract - glucose, 1m/V% élesztőkivonat, 2 m/V% glükóz, 2 m/V% agar,
- **YGMB:** metilén-kékkel kiegészített YG,
- **CDA:** 1 m/V% szacharóz tartalmú Czapek-Dox Agar, 2 m/V% nátrium-nitrát (NaNO_3), 1 m/V% kálium-foszfát (KH_2PO_4), 0,5 m/V% magnézium-szulfát (MgSO_4), 0,5 m/V% kálium-klorid (KCl), 0,01 m/V% vas(II)-szulfát (FeSO_4), 2 m/V% agar]-,
- **LB:** baktériumok tenyésztésére Luria-Bertani, 1 pepton, 0,5 élesztőkivonat, 1 NaCl

Az inkubációk a gombák és kevert kultúrák esetében mindig sötétben, 25 °C-on történtek; a kizárólag baktériumot tartalmazó tenyészetek vagy szobahőmérsékleten, természetes fényviszonyok között, körkörös síkrázógépen (120 rpm) folyadékkultúrában, vagy a gombák esetében ismertetett körülmények között LB táptalajon (+2 m/V% agar) lettek nevelve.

A Pch és Ebi mikrobák közötti kölcsönhatások vizsgálata során szilárd tápközegre a mikobákat 10^5 sejt/ml szuszpenziókként (Pch esetén konídium-, Ebi esetén szejtsuszpenzió) inokuláltunk 5-5 μ l térfogatokkal. Folyadékkultúrák esetén a mikrobák 10^5 sejt/ml végkoncentrációkkal oltottuk be.

4.2. A vizsgált mikroorganizmusok izolálása és azonosítása

4.2.1. Szőlő endofita gombák

A kísérleteink során egy korábban leírt módszer szerint, szőlőtőke fás szövetéből izolált 3 Pch törzset (Pch46, Pch201 és Pch621) használtunk, melyeket a korábbiakban azok morfológiai bélyegei alapján, ill. ITS (internal transcribed spacer) régióinak ITS1f és ITS4 primerek alkalmazásával, PCR (polimeráz láncreakció) során történő felamplifikálásával azonosítottak (1. Táblázat), majd 50 %v/v glicerolban, -80 °C-on tárolva kerültek megőrzésre (Karácsony és mtsai., 2023).

4.2.2. Szőlő endofita baktériumok

A mintavétel 2022. augusztusában az Eszterházy Károly Katolikus Egyetem Szőlőbirtokán, 15 tünetmentes Cabernet sauvignon szőlőtőke xylém szövetéből, azok lokális nátrium-hipoklorittal (NaClO, 4% aktív klórtartalom) történő sterilizálását követően, a tőkék megfűrésével történt. Az így kinyert forgács egy részével lett inokulálva mintaként 5-5 ml LB tápoldat, melyeket 48 órán keresztül, 25 °C-on, 120 rpm rázatás mellett inkubáltunk. A baktériumkultúrák desztillált vízzel $\times 10^{-4}$, $\times 10^{-5}$, $\times 10^{-6}$ és $\times 10^{-7}$ -es mértékben lettek hígítva, majd hígításonként 50 μ l minta lett LB táptalajra szélesztve. 3 napos inkubációs időt követően az eltérő morfológiát mutató mikroorganizmus telepek kétszer egymás után kerültek szélesztésre, a tiszta csírvonalak kialakítása végett. Ezt követően az izolált baktériumok a GTD gombákkal azonos módon lettek megőrizve.

A törzsek DNS tartalmának izolálása 2 napos LB folyadékkultúrákból történt. 10 perces forró (100 °C) vízfürdővel valósult meg a sejtek feltárása, majd ezt követően a minták 5 percig tartó 1000 rpm-es centrifugálása során választottuk el egymástól a nehezebb sejtfragmentumokat és a DNS-t, utóbbit a felülúszó lepipettázásával nyertük ki (Ali A. és mtsai., 2009). A

baktériumizolátumok meghatározása a 16S rRNS-t kódoló gén (1. Táblázat) PCR során történő felamplifikálásával, majd szekvenálásával valósult meg (Wang és mtsai., 2022).

1. táblázat: A vizsgált izolátumok egyes génjeinek felamplifikálásához és szekvenciameghatározásához alkalmazott primerek.

Mikroorganizmus	Primer	Szekvencia
gomba	ITS1f	(5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3')
	ITS4	(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')
baktériumok	16S27F	(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3-')
	16S1392R	(5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3')

4.3. Berendezések és softwarek

A sterilizálási eljárások Raypa® steam sterilizer autokláv használatával, 30 perces programon. 121 °C-on történtek. A tenyészetek inkubálása Velp Scientifica FTC 90E termosztátban, sötétben vagy IKA® KS 4000 ic control típusú körkörös síkrázógépen természetes fényviszonyok mellett valósultak meg. A fluoreszcens méréseket DeNovix QFX Fluorometer, a spektroszkópiás vizsgálatok pedig UV-1800 Shimadzu UV spektrofotométerrel (UV Probe 2.42-es programmal) ill. Thermo scientific NanoDrop 2000 alkalmazásával mentek végbe. A fotódokumentáció a Biometra BioDocAnalyze A mikroszkópos felvételek Olympus BX53F2-es, differenciál interferencia kontraszt (DIC) optikai kiegészítővel felszerelt mikroszkóppal történtek.

A statisztikai analízisek a GraphPad Prism 8.0.1, a telepekről készült fotók területét Fiji ImageJ2 szoftverrel mértük le (Rueden és mtsai., 2017)i, a fényképszerkesztés a PhotoshopCS6Portable programok felhasználásával, a vizsgált törzsek szekvenciájának meghatározása online adatbázis segítségével (www.ncbi.nlm.nih.gov) valósultak meg.

4.4. Potenciális antagonisták, ill. szinergisták kimutatása

A Pch46-os törzsének spóraszuszpenziójával masszívan oltott, majd beszártott, YGMB táptalajra történt a fent leírtak során izolált baktériumtörzsek inokulálása; azok felszínén ~1 cm hosszúságú csíkokban, oltókaccsal történő felvitellel, inokulumként a baktérium izolátumok 2 napos LB tápoldatban készített tenyészetét felhasználva. A baktérium-Pch46 kölcsönhatások értékelése 5 napos inkubációs időt követően a baktériumkolóniák körül a kék festék színében bekövetkező változások vizsgálata alapján valósult meg. Több mikroorganizmus légzése során

alternatív elektronakceptort is elfogadnak, mint pl. a metilénkéket, ennek redukciójával színtelen, leuko-metilénkékké keletkezik. Az elhalt sejtek azonban erre nem képesek, így a festék által sötétkékre színeződnek. A baktériumkolóniák körüli micélium kék színének mélyülése gombaellenes aktivitást jelez (György, 2020).

4.5. A vizsgált mikroorganizmusok növekedési rátájának, sejtszámának és spóraszámának mérése

CDA táptalajra 10^5 sejt/ml koncentrációjú sejtuszuszenziók kerültek felpipettázással inokulálásra, 5-5 μ l térfogatú szuszpenziókként. A növekedési ráták, 21 napos inkubációs időt követően kerültek lemérésre, majd minden telepől azonos méretű, a kolóniák által teljesen lefedett, korongok ($d=5\text{mm}$) kivágásával és 0,01 V/V%-os Tween 80-ban való diszpergálásával fénymikroszkóp alatt, Bürker-kamra segítségével valósult meg a sejtszámok meghatározása. Minden mérés három párhuzamosban került megvalósításra. A mikroszkópos vizsgálatok során a szilárd táptalajon növesztett tenyészetekből szikével lettek kimetszve, a 3-5 mm oldalhosszúságú és 1-2 mm vastagságú szeletek. A mikroorganizmusokat közvetlenül a tárgylemezre helyezés után vizsgáltuk

4.6. Fenolvegyületek degradációjának mérése folyadékkultúrában

10 ml Czapek-Dox folyadékkultúrákban 10^5 sejt/ml koncentrációban inokuláltuk a három Pch és egy Ebi izolátumot külön-külön, illetve a gombákat a baktériummal együtt leoltva. 6 napos inkubációs időt követően steril szűrlet készült a tenyészetekből, melyekhez, továbbá a kontrolként alkalmazott inokulátatlan tápoldat 750 μ l térfogataihoz azonos térfogatú 0,01 mM fluoreszcein oldat lett hozzáadva, további egy napos inkubáció után a fluoreszcein koncentrációjában bekövetkező változás fluorometriás vizsgálata valósult meg (FITC beállítással, ahol az excitációs érték 470 nm, az emissziós tartomány pedig 514-567 nm volt) (Negm és mtsai., 2016). Minden mérés három párhuzamosban került megvalósításra.

4.7. Poliszacharid koncentráció

10 ml Czapek-Dox folyadékkultúrákban 10^5 sejt/ml koncentrációban inokuláltuk a három Pch és egy Ebi izolátumot külön-külön, illetve a gombákat a baktériummal együtt leoltva. 6 napos inkubációs időt követően a kultúrák 1 ml mennyiségeiből, 10 perces, 1000 rpm-es centrifugálást követően valósult meg a sejtek kiülepítése. A felülúszókból azonos térfogatú etanol hozzáadásával, 16 órán át, 4 °C-on lett kicsapva a minták poliszacharid tartalma. Ezt követően megismételtük a centrifugálást és a pelletet beszárítottuk. 100 μ l bidesztillált vízbe való

visszaoldás után hajtottuk végre a Dubois assay-t a cukortartalom meghatározása céljából, az alábbiak szerint. A visszaoldott 100 µl térfogatú mintákhoz 2,5 µl 80 %-os fenolt és 255 µl tömény kénsavat adtunk, majd tíz percig állni hagytuk. A mintákat 30 percen át 30 °C-on melegítettük, majd a bekövetkező színváltozást 490 nm-en mértük. A kapott értékekből a minták poliszacharid koncentrációját glükóz hígítási sor alapján határoztuk meg (DuBois és mtsai., 1956). Minden mérés három párhuzamosban került megvalósításra.

4.8. *In planta* kísérletek

A föld feletti növényi részek tekintetében a szőlőtőke leveleit kiemelten használják, mint a növény egészségügyi állapotának státuszát mérő szervet. A levelek a növény legnagyobb felszínű szervei, amelyek a vegetációs időszak teljes terjedelmében jelen lévő struktúrák. (Pinto és mtsai., 2014).

Cabernet sauvignon fajtájú szőlő zöldhajtás szekciók (1 szekció = a levél, egy nódusz és az ezek alatt elhelyezkedő internódium) a nódusz alatti sebzésbe juttatott, Czapek-Dox tápoldatban tenyésztett kultúrák (3 Pch és 1 Ebi izolátum szeparáltan, illetve a gombák a baktériummal kombináltan inokulálva és inkubálva 25 °C hőmérsékleten 2 napig) sebzésbe történő pipettázásával és azok parafilmmel való lezárásával valósult meg a fertőzés. Minden fertőzés 5 növényen került megvalósításra. Növényházban, természetes fényviszonyok között tartva a mintákat, 14 napos inkubációs időt követően történt a fotoszintetikus pigmentek vizsgálata. Levelenként öt-öt db, 0,5 cm-es sugarú korong kivágását követően, egyesével mikrocentrifuga csőbe és 16 órára -20 °C-ra helyezve kerültek feltárássra a növényi sejtek. Majd 1,5 ml 80%-os acetonban áztatva, szintén 16 órán át, szobahőmérsékleten lettek kioldva a növényi pigmentek, melyek 3 különböző hullámhosszon lettek mérve (klorofill-a – 663,6 nm; klorofill-b – 646,6 nm; karotinoidok – 470 nm). A kapott értékeket Yang és munkatársai (1998) által megalkotott képletekbe helyettesítettük be, majd az így kapott értékeket számítottuk át µg/mm²-re (Braniša és mtsai., 2014).

Az alkalmazott képletek a következők:

$$\text{Klorofill-a koncentráció} = 12,25 \times A_{663,6} - 2,25 \times A_{646,6}$$

$$\text{Klorofill-b koncentráció} = 20,31 \times A_{646,6} - 4,91 \times A_{663,6}$$

$$\text{Teljes karotinoid koncentráció} = (1000 \times A_{470} - 2,27 \times \text{Klorofill-a} - 81,4 \times \text{Klorofill-b}) / 227$$

Ahol A az adott hullámhosszon mért abszorbancia értéke.

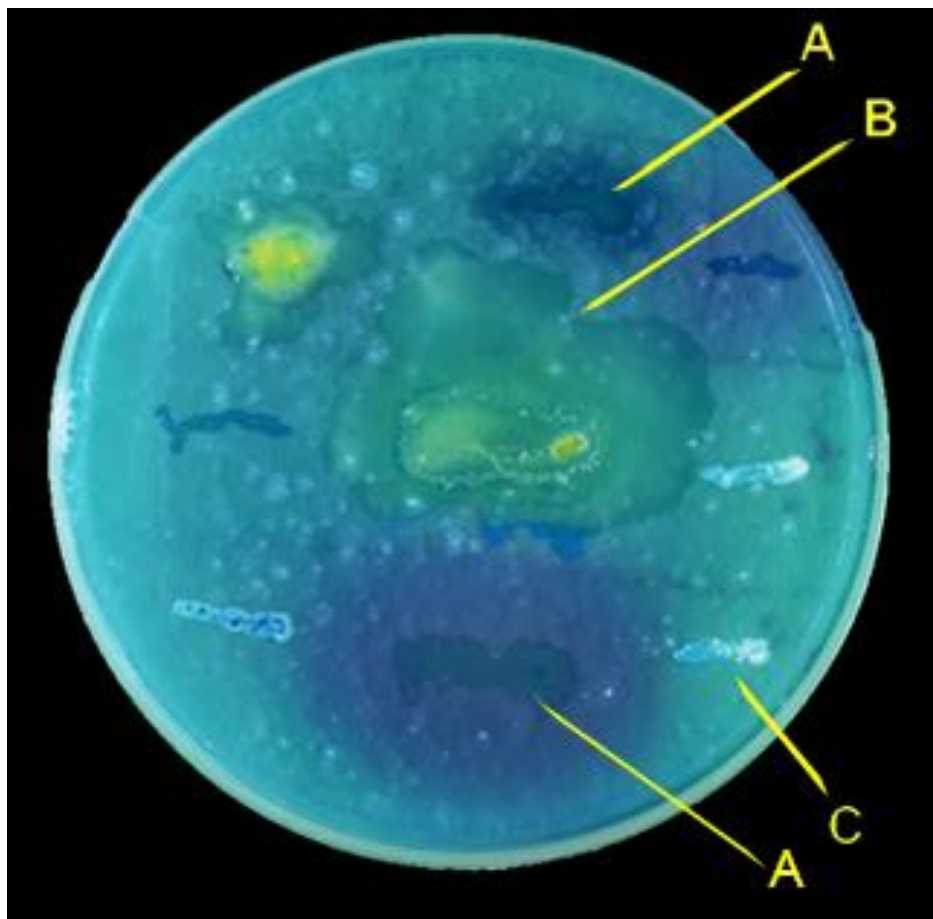
5. EREDMÉNYEK

5.1. Potenciális antagonisták, ill. szinergisták kimutatása

A Pch gomba Pch46-os törzsével masszívan oltott, ill. a különböző izolált endofita baktériumokkal inokulált táptalajon, öt napos inkubációs időt követően vizsgáltuk meg a metilénkék festék színében bekövetkező változásokat. A baktériumtelepek esetén három különböző típusú viszonyt azonosítottunk a Pch46 törzs tekintetében. A sötétebb kék árnyalatú táptalajrészletek azt mutatták, hogy valószínűleg a baktérium hatására a gomba elpusztult, tehát adott baktérium jelenléte negatív hatással bírt a Pch46 törzsre (2. ábra, A jelölés). Ugyanakkor, néhány esetben egyes baktériumok a Pch46 törzs által képzett micéliumpázsiton szokatlanul intenzív növekedést mutattak a gombasejtek pusztulását jelző sötétkék elszíneződés hiánya mellett, mint az a 2. ábra B jelzésénél is megfigyelhető. Ez jelentheti az adott baktérium-izolátum neutrális/pozitív viszonyát a Pch vizsgált törzse tekintetében. Kutatásunk során ezen csoportba tartozó mikroorganizmusokat vizsgáltuk tovább egy esetleges szinergista, endofita baktérium meghatározása érdekében. A fent leírt jelenségek mellett a legtöbb baktérium esetén a vizsgált gombatörzs tekintetében nem volt megfigyelhető egyértelmű kölcsönhatás (2. Ábra, C jelölés).

5.2. A vizsgált baktérium azonosítása

A baktériumból kinyert 16S riboszómális DNS szekvenciája alapján, a további vizsgálatokra kiválasztott, a Pch-val vélhetőleg szinergizmust mutató baktériumtörzs (2. Ábra, B jelölés) 100 %-os lefedettséggel, 99,90%-os egyezést mutatott az NCBI adatbázisában szereplő *Erwinia billingiae* Eb661-es törzsével.

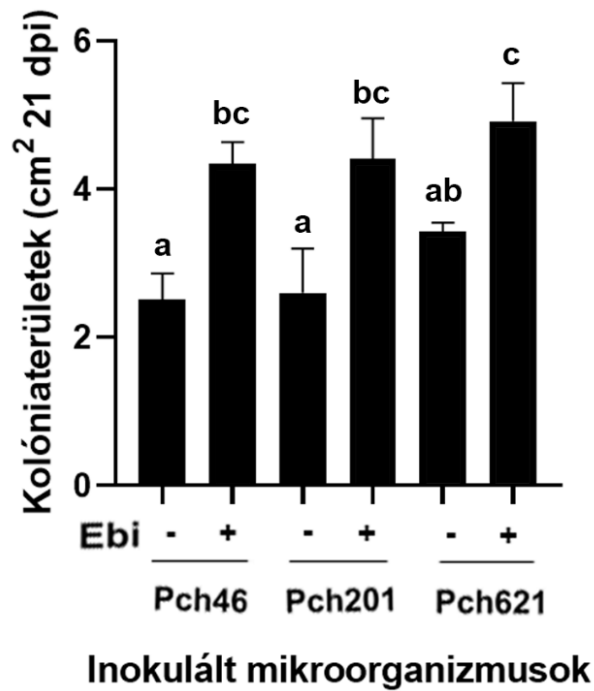


2. ábra: Metilénkéssel festett táptalajra szélesztett Pch46 micéliumpázsit és a ráoltott endofita baktériumtörzsek közötti kölcsönhatások kimutatása a festék színváltozása alapján, ahol A: gombaellenes aktivitás, B: valószínűsíthető szinergizmus, erős bakteriális szekréció, C: mikroorganizmusok közötti interakció hiánya.

5.3. A vizsgált mikroorganizmusok növekedési rátájának, sejtszámának és spóraszámának mérése

5.3.1. A növekedési ráták összehasonlítása tiszta és kevert kultúrák esetében

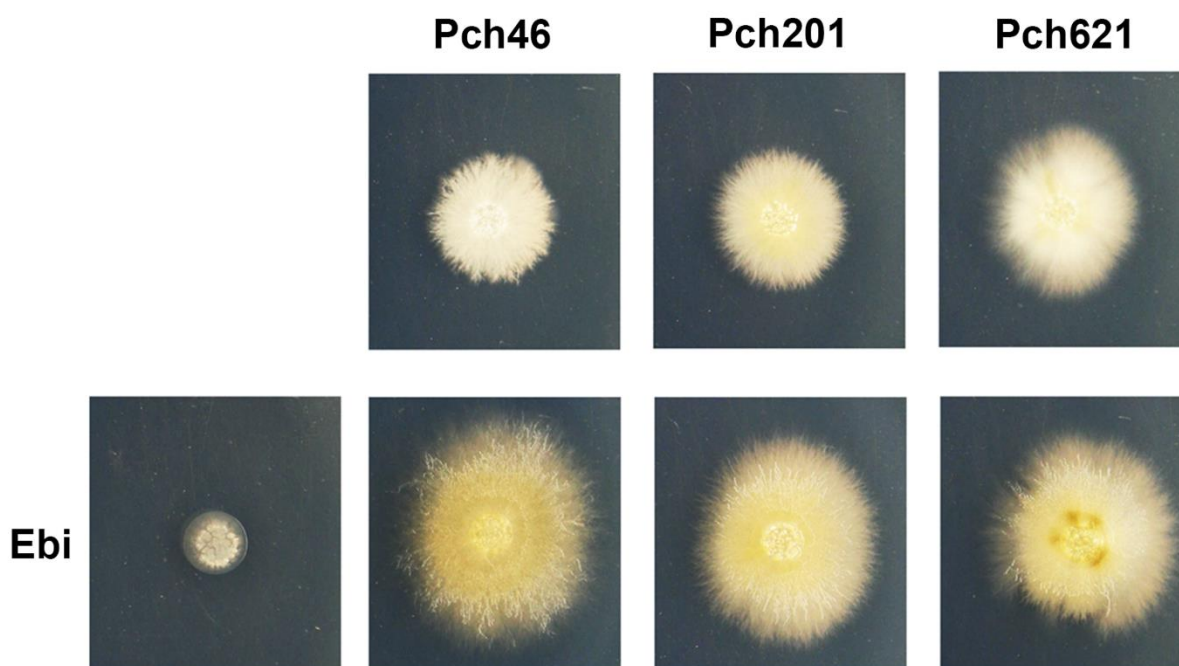
A CDA táptalajon nevelt Ebi, Pch és kevert kultúrák növekedésében bekövetkező változásokat, folyamatos monitorozás után, 21 nappal az inokulációt követően mértük le. A mindkét mikroorganizmust tartalmazó tenyészetek esetében az intenzívebb növekedés szemmel is látható volt. A telepekről készült fotók területét Fiji szoftverrel mértük le és cm^2 -re átszámítva adtuk meg. Mint az a 3. ábrán is látszik, mind a három vizsgált patogén gombatörzs szignifikánsan nagyobb telepméretet mutatott az Ebi-vel kevert kultúrák esetében, a kizárólag Pch-vel inokulált telepekhez viszonyítva. Két törzs, a Pch46 és Pch201 esetében nagyobb mértékű volt ez a szignifikáns eltérés, míg a Pch621 esetében kevésbé.



3. ábra: A Pch 3 törzsének növekedése tiszta tenyészetben (Ebi -), vagy az Ebi baktériummal együtt (Ebi +) inokulálva CDA táptalajon, 25 °C-on inkubálva 21 napig. A betűk a szignifikánsan ($p < 0,05$) különböző adatsorokat jelölik.

5.3.2. A mikroorganizmus-telepek morfológiájának megfigyelése

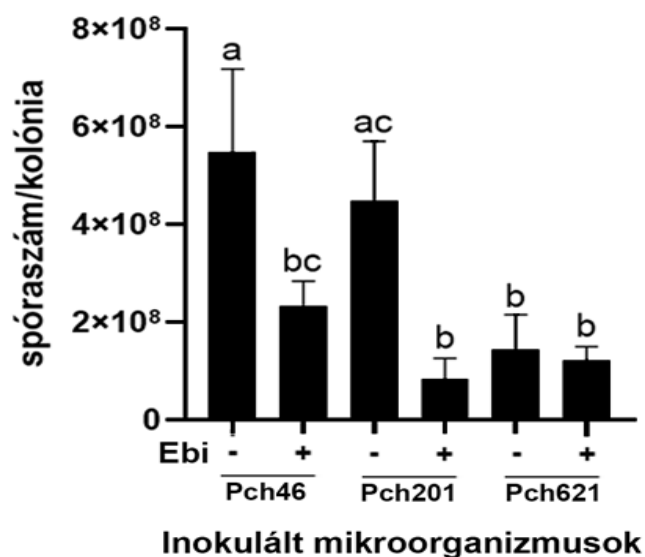
A 21 napos inkubációs időt követően nem csupán a telepek területének pontos lemérése valósult meg, hanem azok morfológiai bélyegeinek megfigyelése is. Látható a 4. ábrán, hogy a kizárólat az Ebi alkotta telep, a CDA táptalajon minimális növekedést mutatott, telepterülete megközelítőleg azonos volt az inkubációkor felvitt sejtszuszpenzió felpipettázásakor kialakult méretével. Ezzel szemben a Pch törzsekkel közösen történő inkubáció, a gombák telepének nagyobb méretén kívül, azok pigmentációjának erősítésében is megnyilvánult a baktérium feltételezhető szinergista hatása, amit a 4. ábrán láthatunk. A megfigyelhető sötétebb pigmentáció a magasabb melanintartalom következtében alakult ki, melynek mennyisége összefüggésben állhat, a szakirodalmi áttekintésben már említett, szkitalon molekulával, ami az egyik legnagyobb mértékben szekretált fitotoxikus hatással bíró szekunder metabolit a Pch esetében. Tehát az Ebi jelenléte nem csupán a növekedés mértékére volt pozitív hatással, hanem vélhetőleg a patogén egy jelentős virulenciafaktorára is. Továbbá a telepek szélének nagyobb fokú szeldeltsége összhangban van a baktérium által serkentett micéliális növekedéssel kapcsolatos megfigyeléseinkkel.



4. ábra: CDA táptalajon megfigyelhető különbségek a Pch és az Ebi tiszta és kevert kultúráinak növekedésében és a telepek pigmentációjának erősségében, 25 °C-on történő, 21 napos inkubációt követően.

5.3.3. *Pch* spóraszámának meghatározása

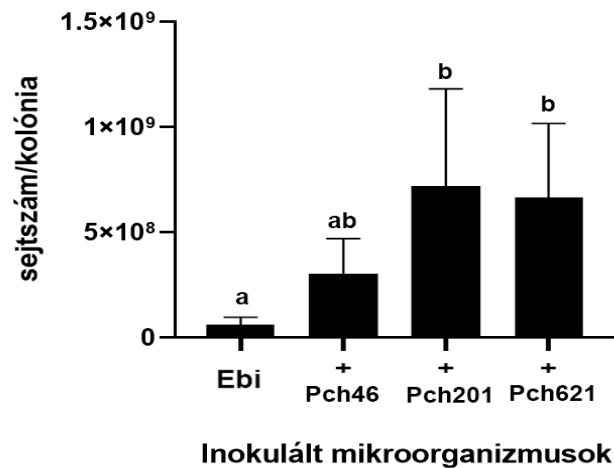
A 21 napos inkubáció után megvalósított telepnövekedés meghatározását és annak fotódokumentációját követően, a kultúrák sporulációjának mérését is megvalósítottuk. A három vizsgált Pch törzsből a Pch621-es nem mutatott szignifikáns csökkenést az Ebi-vel kevert kultúrák esetében, a kizárólag a gombát tartalmazó telepekhez viszonyítva, ugyanakkor a Pch46-os és Pch201-es törzsek spóraszámuk szignifikánsan csökkent az Ebi-vel való közös inkubáció esetében. Ez megerősíti a fentebb leírtakat, miszerint az általunk vizsgált endofita baktérium jelenléte a micéliális növekedést erősíti; továbbá, mint azt az 5. ábra is jól mutatja, csökkenti a sporuláció mértékét, ami szintén arra utal, hogy az Ebi jelenléte a Pch környezetében, pozitív hatással bír annak vitalitására.



5. ábra: 25 °C-on, 21 napon át tartó inkubációs időt követően, a CDA táptalajból kivágott és Tween 80-ban diszpergált Pch telepek gombaspóra-tartalma kolóniaterületre levetítve, tiszta (Ebi -) és kevert (Ebi +) kultúrákban. A betűk a szignifikánsan ($p < 0,05$) különböző adatsorokat jelölik.

5.3.4. Ebi sejtszámának meghatározása

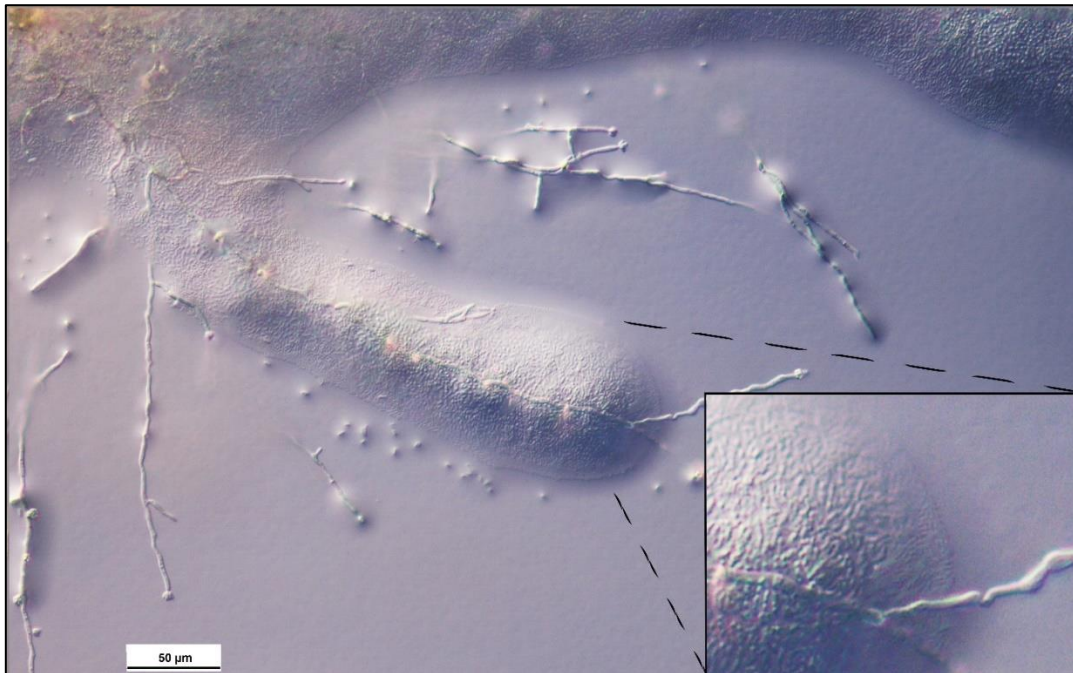
A fenti mérésekkel azonos időben és módon valósult meg az Ebi sejtszámában bekövetkező változások leírása, tiszta és kevert kultúrák esetében. A három gombatörzsből kettő, a Pch201 és a Pch62 jelenléte szignifikáns növekedést okozott a baktérium sejtszámában, míg a harmadik törzs, a Pch46 ugyan nem szignifikánsan, de szintén növelte a bakteriális sejtszámot a kevert kultúrákban (6. ábra). Ez az eredmény azt mutatja, hogy nem csupán az Ebi van pozitív hatással a gomba növekedésére, hanem a Pch-val való közös inkubáció is növeli az endofita baktérium sejtszámát a kevert kolóniákban. Mivel mind a két mikroorganizmus nagyobb növekedést mutat a másik jelenlétében, valószínűsíthető a köztük megvalósuló szinergista kölcsönhatás.



5. ábra: 25 °C-os, 21 napon át tartó inkubációs időt követően, a CDA táptalajból kivágott és Tween 80-ban visszaoldott Ebi telepek bakteriális sejtszáma, tiszta és kevert (+ Pch) kultúrákban. A betűk a szignifikánsan ($p < 0,05$) különböző adatsorokat jelölik.

5.3.5. A Pch és Ebi együttes növekedésének mikroszkópos megfigyelése

A mikroszkópos vizsgálatok során láthatóvá vált, hogy a kevert kultúrák esetében megfigyelhető a Pch és az Ebi asszociált növekedése. A baktérium intenzív szaporodást mutatott a gombafonalak mentén. Ez az eredményünk is tovább erősíti azt a feltételezést, hogy az Ebi számára is előnyös a közös növekedés.



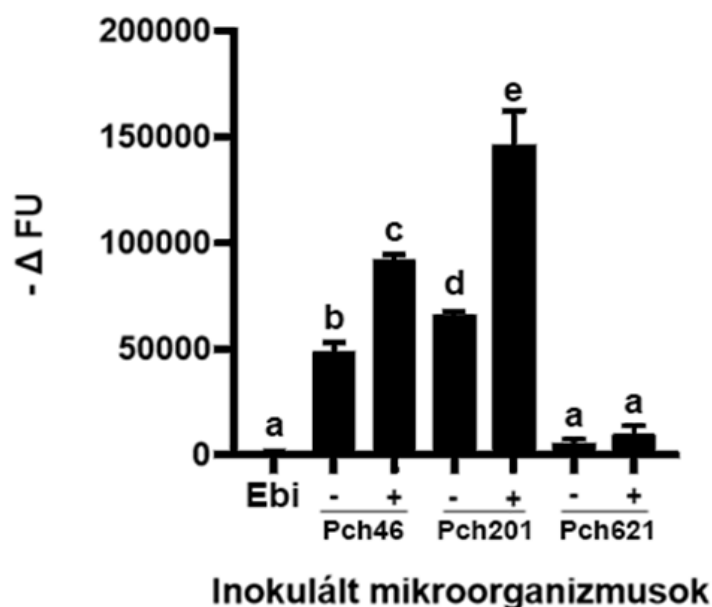
7. ábra: Az Ebi növekedése a Pch46 fonalainak mentén, CDA táptalajon, a 21 napon át tartó, 25 °C-on történő inkubálást követően (bar = 50 μm).

5.4. Fenolvegyületek degradációjának vizsgálata

A fenolvegyületek degradációja vélhetőleg nagyban hozzájárul a Pch sikeres kolonizációjához a szőlőben, hiszen mind a sejtfalalkotókban, mind a növény által, a védekezés érdekében szekretált másodlagos anyagcseretermékekben megtalálhatóak fenolos molekulák. Ezek lebontása elengedhetetlen a kórokozó számára az fertőzés, kolonizáció és terjedés tekintetében egyaránt.

Annak vizsgálata érdekében, hogy az Ebi milyen módon járul hozzá ennek a virulenciafaktornak a kifejeződéséhez, egy szintén fenolos molekula lebomlásának mértékét vizsgáltuk, ez a vegyület a fluoreszcein. A molekula zöld színű fluoreszcenciájának csökkenése a fluoreszcein mikrobiális degradációjának következtében valósult meg.

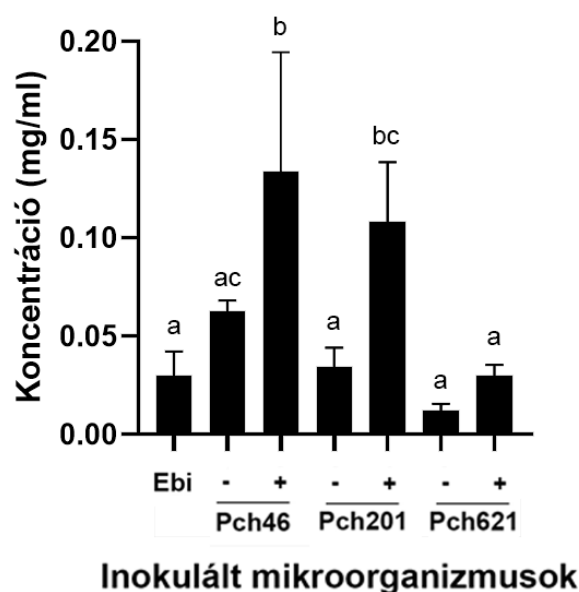
A kapcsolódó méréseink eredményei (8. ábra) azt mutatják, hogy az Ebi önmagában szinte egyáltalán nem degradálja a fluoreszceint, míg a Pch46-os és a Pch201-es törzsek szignifikánsan több fluoreszcein lebontására képesek kevert kultúrákban, mint a kizárólag a Pch-t tartalmazó tenyészetek esetében. Azonban a Pch621-es törzsnél csak kis mértékű változás volt megfigyelhető, egy a többi gombatörzshöz viszonyítva eleve alacsony, tisztatenyésztében mért érték mellett.



8. ábra: A fluoreszcein molekula bontásának mértéke tiszta Ebi, valamint Pch törzsek tiszta (Ebi -) és kevert (Ebi +) 3 napos kultúráiban, 24 órával a fluoreszcein hozzáadása után mérve a fluoreszcencia érték változását a kiindulási állapothoz képest. Az Y tengely a fluoreszcencia egység (FU) változását mutatja. A betűk a szignifikánsan ($p < 0,05$) különböző adatsorokat jelölik.

5.5. Poliszacharid termelés

Méréseink alapján a Pch46-os és Pch201-es törzsek esetében az Ebi jelenléte szignifikánsan növelte a minták poliszacharid tartalmát a tiszta Pch kultúrákéhoz képest. A Pch621-es törzs esetében is megfigyelhető különbség a tiszta és kevert kultúrák között, azonban ez a növekedés nem szignifikáns (9. ábra). A gomba tisztatenyészetek értékei tekintetében a fenolos vegyületek degradációjában megmutatkozó viszonyokhoz hasonlóan, a Pch621 törzs mutatta a legalacsonyabb értéket.



9. ábra: Czapek Dox folyadékkultúrában 6 napon át inkubált tiszta Ebi, valamint Pch törzsek tiszta (Ebi -) ill. kevert (Ebi +) kultúráinból kivont poliszacharid tartalom. A betűk a szignifikánsan ($p < 0,05$) különböző adatsorokat jelölik.

5.6. *In planta* vizsgálatok

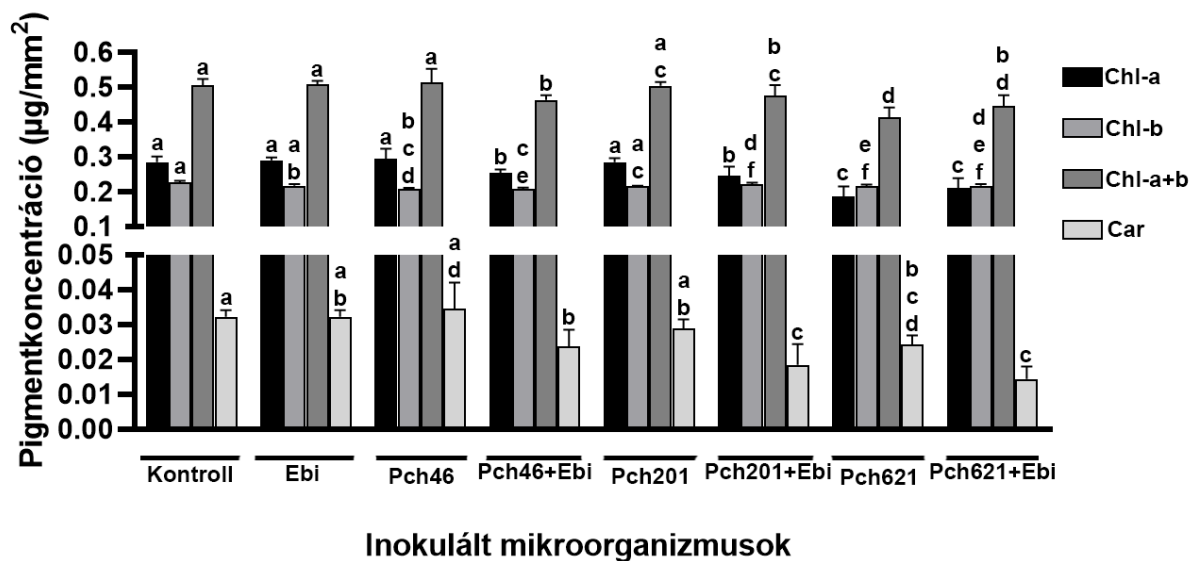
Arra való tekintettel, hogy a növények egészségi állapotának státuszát leginkább a levelek vizsgálatával állapítják meg, ill. a szőlőtőke-betegségek levéltüneteket is produkálnak, kutatásunk során a mesterségesen fertőzött zöldhajtások leveleinek fotoszintetikus pigmenttartalmát hasonlítottuk össze egyrészt a kontrollal, tehát a nem fertőzött növényel, másrészt a kevert és önálló kultúrákkal való fertőzés eredményét egymással, 14 napos inkubációs időt követően. Mind a négy mért paraméter esetében látszik, hogy az Ebi önmagában nincsen fitotoxikus hatással, nem befolyásolta a klorofill- és karotinoid vegyületek mennyiségét.

Méréseink alapján a Pch46-os és Pch201-es törzsek Ebi-vel közös inokulálás során szignifikánsan csökkentik a levelek klorofill-a tartalmát, míg önmagukban erre a gombatörzsek nem voltak képesek a két hetes inkubációs idő lejárta után. Érdekes eredmény, hogy ezzel szemben a Pch621-es törzs mind önálló, mind kevert kultúrában szignifikánsan csökkentette a klorofill-a tartalmát, de a két kondíció között nem figyeltünk meg szignifikáns különbséget. A kontrollhoz képest, ebben az esetben, a kizárólag kórokozóval mesterségesen fertőzött minták közül csak a Pch621-es törzs mutat szignifikáns eltérést (10. ábra Chl-a oszlopai).

A klorofill-b mennyiséget a Pch46 és Pch 621 gombatörzs képes volt szignifikánsan csökkenteni önmagában is, mely tulajdonságra az Ebi jelenléte nem volt hatással. Ez a tulajdonság a Pch201 törzs esetében csak az Ebi jelenlétében valósult meg (10. ábra Chl-b oszlopai).

Amennyiben a levélminták összklorofill koncentrációját vizsgáltuk (10. ábra Chl-a+b oszlopai), azt tapasztaltuk, hogy a gombák közül tisztatenyészetben csak a Pch621 törzs okozta a vizsgált paraméter csökkenését. Az Ebi-vel együttesen leoltva azonban mindhárom gombatörzs képes volt az összklorofill tartalom csökkentésére. A gomba tisztatenyészet és a kevert kultúra közt a mért paraméter tekintetében csak a Pch621 törzs nem mutatott szignifikáns különbséget.

A fotoszintézis során keletkező fel nem hasznosuló energia elvezetésében, s ezzel együtt a növény hő- és fénystresszel szembeni védelmében fontos pigmentmolekula esetében azt tapasztaltuk, hogy ugyan nem szignifikánsan, de már önmagában, az Ebi is képes volt csökkenteni ennek mennyiségét a levelekben; ez igaz a Pch621-es törzsre is. A Pch46-os és Pch201-es törzsek esetében is szignifikáns csökkenés mutatkozik a karotinoid tartalomban, azonban csak a kevert kultúráknál. A kontrollhoz képest, ebben az esetben, a kizárólag kórokozóval mesterségesen fertőzött minták közül csak a Pch621-es törzs mutat szignifikáns eltérést (10. ábra Car oszlopai).



10. ábra: A kontroll és fertőzött Cabernet sauvignon zöldhajtások leveleinek fotoszintetikus pigmenttartalma (klorofill a = Chl-a, klorofill b = Chl-b, összklorofill = Chl-a+b, karotinoid = Car) a sebzést és fertőzést követő 14. napon, a negatív kontroll, az Ebi, illetve a Pch tiszta (Ebi -) és kevert (Ebi+) kultúráinak esetében. A betűk a szignifikánsan ($p < 0,05$) különböző adatsorokat jelölik adott pigmenttartalom szempontjából. Az adatsorok közötti szignifikanciaviszonyok egy-egy fotoszintetikus pigment tekintetében külön kerültek vizsgálatra.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

A kutatásunk során megvalósított kísérletek eredményei alapján kijelenthetjük, hogy *in vitro* körülmények közt az Ebi baktérium egy vizsgált izolátuma szinergista kölcsönhatást mutatott az Esca betegséget okozó Pch gomba három vizsgált törzsével. A két mikroba kölcsönösen fokozni volt képes egymás szaporodási rátáját, a gombák esetében pedig megfigyelhető volt az ivartalan spóráképzés kisebb mértékű megnyilvánulása a baktérium jelenlétében, ami a micéliális növekedés fokozott mértékével van összhangban. Ennek a megfigyelésnek némileg ellentmondva a gombatelepek intenzívebb pigmentációja valósult meg a baktériummal kivitelezett kevert kultúrákban. A kolóniák színeződését okozó melanin egy másodlagos anyagcseretermék, mely vegyületek jellemzően a tenyészetek stacioner fázisában, a sporulációval párhuzamosan termelődnek (Calvo és mtsai., 2002). A látszólagos ellentmondást feloldhatja az Ebi által a Pch tekintetében kiváltott biotikus stressz, mivel a melanin termelésével a gombák számos negatív behatással szemben védekeznek (Cordero & Casadevall, 2017). Emellett az is említésre méltó, hogy a melanin bioszintézis egyik közterméke, a szkitalon a Pch patogenezisében vélhetőleg szerepet játszó molekula. Az Ebi

jelenlétében megvalósuló fokozott melanizáció vélhetőleg ennek a patogenitási faktornak az intenzív termelésével is együtt jár, fokozva a Pch virulenciáját (Bruno és mtsai., 2007). Megvizsgáltuk a Pch virulenciája tekintetében fontosnak gondolt más folyamatokat is, nevezetesen a fenolvegyületek degradációjának mértékét, és a poliszacharidok szekrécióját. A vizsgált Pch törzseknek ezeket tulajdonságait az Ebi fokozni volt képes egy törzs (Pch621) kivételével. Ennek vélhető oka, hogy a mért tulajdonságok a nevezett törzs esetében eleve nagyon alacsony szinten mutatkoztak meg. Hasonló különbség volt tapasztalható a gombatörzsek Ebi-vel mutatott kölcsönhatása tekintetében a kölcsönhatások *in planta* vizsgálata során is. A háromból két törzs (Pch46 és Pch201) esetén az Ebi-vel megvalósított együttes fertőzések a fertőzött növények fotoszintetikus pigmenttartalmának szignifikánsan nagyobb mértékű csökkenését okozták, mint a gombák tisztatenyészteteivel magvalósított fertőzések. Ilyen tekintetben a Pch621 gombatörzs ismét kivételnek bizonyult, azonban tisztatenyésztete eleve virulensebbnek mutatkozott a másik két törzshöz képest. Összességében eredményeink azt sugallják, hogy az Ebi és Pch mikrobák közt megvalósuló kölcsönhatás fokozni képes a Pch által kialakított Esca kórkép levéltüneteinek erősségét a kölcsönhatásban résztvevő Pch törzs függvényében. Az ilyen tekintetben kivételt képező gombatörzs esetében vélhetőleg eleve olyan magas szinten fejeződnek ki a patogenitás szempontjából lényeges tulajdonságok, hogy azt a baktérium jelenléte érdemben már nem fokozza. A gombatörzsek közt tapasztalható különbségek rávilágítanak arra is, hogy az Esca levéltüneteinek kialakulásában vélhetőleg kis szerepe van a Pch fenolbontó képességének és poliszacharid termelésének, hiszen ilyen tekintetben a Pch621 törzs különösen kis potenciált mutatott, míg a fertőzött növények leveleinek károsítását legnagyobb mértékben valósította meg. Mindemellett fontos megjegyezni azt is, hogy a törzsek közötti különbségeket nem feltétlenül tükrözik az *in vitro* tenyészetekben mért értékek.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A *V. vinifera*, mely kiemelkedő jelentőséggel bír a mezőgazdaságban, rengeteg, különböző kórokozó által veszélyeztetett. 29 gombás megbetegedésre hajlamos ezek, közül a legpusztítóbb kórképek közé tartoznak, a világ összes szőlőtermő területén jelen lévő és kimagasló anyagi károkat okozó gombás tőkebetegségek, mellyekkel eddig több, mint 170 taxont hoztak összefüggésbe, azonban ez a szám folyamatosan nő.

Ezen kórokozók különféle anyagcserezavarokat okozhatnak, jellemző a tőke belsejében megfigyelhető nekrotikus szövetelhalás, valamint a leveleken másodlagosan megjelenő tünetek, mint a száradás, nekrózis, klorózis, elhullás. Jellemzően a sérült növényi felületeken át

fertőzik meg a növényt, elsődlegesen a vaszkuláris rendszert kolonizálva. Ezek a betegségek hosszan lappanghatnak, de súlyos esetben letálisak, akár akut pusztulást is előidézhetnek.

Jelenlétük mégsem minden esetben vezet a növény halálához vagy akár a tünetek megjelenéséhez. Azt, hogy fellép-e egészségkárosodás a növényben, több tényezőre lehet visszavezetni, ilyen például a növény védelmi mechanizmusai, az éghajlat befolyása a szőlő vitalitására, a tőke környezetében, ill. annak belsejében kialakult gomba- és baktériumbiomra. Továbbá a mikrobiom tagjainak egymásra gyakorolt hatása is fontos tényező, hiszen a különböző mikroorganizmusok gátolhatják, vagy éppen serkenthetik a kórokozók anyagcseréjét, amely az ellenük való védekezésben kulcsfontosságú lehet, mivel az egyetlen hatékony vegyületet, a nátrium-arsenátot betiltották. Emiatt a GTD-k kezelését évtizedek óta intenzíven tanulmányozták és jelentős előrelépést tettünk a kórokozók, epidemiológiájuk, hatásuk és ellenőrzésük megértésében. A probléma kiterjedtsége és összetettsége miatt azonban nem sikerült egyetlen hatékony ellenőrzési, kezelési vagy megelőzési intézkedést kidolgozni (Fontaine és mtsai., 2016; Gramaje és mtsai., 2018).

Kutatásunk során izoláltunk és azonosítottunk egy olyan endofita baktériumot, a szőlő fás szövetéből, ami több kísérlet alapján szinergistája az Esca betegségért elsősorban felelős Pch-nak. Ezt alátámasztják a mikroorganizmusok növekedési, sejtosztódási, pigmentációs és metabolikus vizsgálatainak eredményei, valamint a kevert kultúrák esetében megfigyelhető szignifikánsan növekvő patogenitási faktorok *in vitro* és *in planta*.

A jelen tanulmányban leírt, az Esca kifejeződését pozitívan befolyásoló mikrobiális kölcsönhatáshoz hasonlót keveset ismer a szakirodalom. Az ismert kórokozók jól jellemzett kölcsönhatásai mellett csak néhány, alapvetően nem növénypatogén baktérium és gombafaj esetén írták le azok pozitív hatását az Esca kialakulására.

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A szakdolgozatom elkészüléséért szeretnék köszönetet mondani elsősorban konzulenseimnek, Dr. Karácsony Zoltánnak és Dr. Szemán-Nagy Gábornak, valamint mindazoknak, akik a munkám során segítségemre voltak.

9. IRODALOMJEGYZÉK

- Agustí-Brisach, C., Gramaje, D., García-Jiménez, J., & Armengol, J. (2013). Detection of black-foot disease pathogens in the grapevine nursery propagation process in Spain. *European Journal of Plant Pathology*, 137(1), 103–112. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0221-8>
- Ali A., D., Mehrez M., J., Abdulsamad M., A., & Hussein M., D. (2009). Heat treatment of bacteria: A simple method of DNA extraction for molecular techniques. 117–122.
- Aroca, Á., Gramaje, D., Armengol, J., García-Jiménez, J., & Raposo, R. (2010). Evaluation of the grapevine nursery propagation process as a source of *Phaeoacremonium* spp. And *Phaeomoniella chlamydospora* and occurrence of trunk disease pathogens in rootstock mother vines in Spain. *European Journal of Plant Pathology*, 126(2), 165–174. <https://doi.org/10.1007/s10658-009-9530-3>
- Bekris, F., Vasileiadis, S., Papadopoulou, E., Samaras, A., Testempasis, S., Gkizi, D., Tavlaki, G., Tzima, A., Paplomatas, E., Markakis, E., Karaoglani, G., Papadopoulou, K. K., & Karpouzas, D. G. (2021). Grapevine wood microbiome analysis identifies key fungal pathogens and potential interactions with the bacterial community implicated in grapevine trunk disease appearance. *Environmental Microbiome*, 16(1), 23. <https://doi.org/10.1186/s40793-021-00390-1>
- Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M.-C. C., Charles, T., Chen, X., Cocolin, L., Eversole, K., Corral, G. H., Kazou, M., Kinkel, L., Lange, L., Lima, N., Loy, A., Macklin, J. A., Maguin, E., Mauchline, T., McClure, R., ... Schlöter, M. (2020). Microbiome definition re-visited: Old concepts and new challenges. *Microbiome*, 8(1), 103. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0>
- Beris, E., Selim, M., Kechagia, D., & Evangelou, A. (2022). Overview of the Esca Complex as an Increasing Threat in Vineyards Worldwide: Climate Change, Control Approaches and Impact on Grape and Wine Quality. <https://doi.org/10.5772/intechopen.105897>
- Bertsch, C., Ramírez-Suero, M., Magnin-Robert, M., Larignon, P., Chong, J., Abou-Mansour, E., Spagnolo, A., Clément, C., & Fontaine, F. (2013). Grapevine trunk diseases: Complex and still poorly understood. *Plant Pathology*, 62(2), 243–265. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2012.02674.x>
- Billones-Baaijens, R., Jaspers, M., Allard, A., Hong, Y., Ridgway, H., & Jones, E. (2015). Management of *Botryosphaeriaceae* species infection in grapevine propagation materials. *Phytopathologia Mediterranea*, 54(2), 355–367.
- Boller, T., & Felix, G. (2009). A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annual Review of Plant Biology*, 60(Volume 60, 2009), 379–406. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346>
- Bortolami, G., Ferrer, N., Baumgartner, K., Delzon, S., Gramaje, D., Lamarque, L. J., Romanazzi, G., Gambetta, G. A., & Delmas, C. E. L. (2023). Esca grapevine disease involves leaf hydraulic failure and represents a unique premature senescence process. *Tree Physiology*, 43(3), 441–451. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpac133>
- Böhm, H., Albert, I., Oome, S., Raaymakers, T. M., Van Den Ackerveken, G., & Nürnberger, T. (2014). A Conserved Peptide Pattern from a Widespread Microbial Virulence Factor Triggers Pattern-Induced Immunity in *Arabidopsis*. *PLoS Pathogens*, 10(11), e1004491. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004491>
- Braniša, J., Jenisová, Z., Porubská, M., Jomová, K., & Valko, M. (2014). SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF CHLOROPHYLLS AND CAROTENOIDS. AN EFFECT OF SONICATION AND SAMPLE PROCESSING. 2.
- Bruez, E., Baumgartner, K., Bastien, S., Travadon, R., Guérin-Dubrana, L., & Rey, P. (2016). Various fungal communities colonise the functional wood tissues of old grapevines externally free from grapevine trunk disease symptoms: Fungal microflora of GTD-free old vines. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 22(2), 288–295. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12209>
- Bruez, E., Haidar, R., Alou, M. T., Vallance, J., Bertsch, C., Mazet, F., Fermaud, M., Deschamps, A., Guérin-Dubrana, L., Compant, S., & Rey, P. (2015). Bacteria in a wood fungal disease: Characterization of bacterial communities in wood tissues of esca-foliar symptomatic and asymptomatic grapevines. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01137>
- Bruez, E., Vallance, J., Gerbore, J., Lecomte, P., Costa, J.-P. D., Guérin-Dubrana, L., & Rey, P. (2014). Analyses of the Temporal Dynamics of Fungal Communities Colonizing the Healthy Wood Tissues of Esca Leaf-Symptomatic and Asymptomatic Vines. *PLOS ONE*, 9(5), e95928. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095928>

- Bruno, G., & Sparapano, L. (2006). Effects of three esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L.: I. Characterization of secondary metabolites in culture media and host responses to the pathogens in calli. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 69(4–6), 209–223. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2007.04.008>
- Bruno, G., Sparapano, L., & Graniti, A. (2007). Effects of three esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L.: IV. Diffusion through the xylem of metabolites produced by two tracheiphilous fungi in the woody tissue of grapevine leads to esca-like symptoms on leaves and berries. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 71(1), 106–124. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2007.12.004>
- Bulgarelli, D., Rott, M., Schlaeppi, K., Ver Loren Van Themaat, E., Ahmadinejad, N., Assenza, F., Rauf, P., Huettel, B., Reinhardt, R., Schmelzer, E., Peplies, J., Gloeckner, F. O., Amann, R., Eickhorst, T., & Schulze-Lefert, P. (2012). Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature*, 488(7409), 91–95. <https://doi.org/10.1038/nature11336>
- Calvo, A. M., Wilson, R. A., Bok, J. W., & Keller, N. P. (2002). Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 447–459. <https://doi.org/10.1128/mmr.66.3.447-459.2002>
- Calzarano, F., Osti, F., Baránek, M., & Di Marco, S. (2018). Rainfall and temperature influence expression of foliar symptoms of grapevine leaf stripe disease (esca complex) in vineyards. *Phytopathologia Mediterranea*, 57(3), 488–505.
- Carter, M. (1957). *Eutypa armeniacae* Hansf. & Carter, sp. Nov., an airborne vascular pathogen of *Prunus armeniacae* L. in southern Australia. *Australian Journal of Botany*, 5(1), 21. <https://doi.org/10.1071/BT9570021>
- Carter, M., & Moller, W. (1971). The quantity of inoculum required to infect apricot and other *Prunus* species with *Eutypa armeniacae*. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 11(53), 684. <https://doi.org/10.1071/EA9710684>
- Carter, M. V., & Moller, W. J. (1970). Duration of susceptibility of apricot pruning wounds to infection by *Eutypa armeniacae*. *Australian Journal of Agricultural Research*, 21(6), 915–920. <https://doi.org/10.1071/ar9700915>
- Chamberlain, G. C., Willison, R. S., Townshend, J. L., & Ronde, J. H. D. (1964). TWO FUNGI ASSOCIATED WITH THE DEAD-ARM DISEASE OF GRAPES. *Canadian Journal of Botany*, 42(4), 351–355. <https://doi.org/10.1139/b64-034>
- Cimmino, A., Masi, M., Evidente, M., Superchi, S., & Evidente, A. (2015). Fungal phytotoxins with potential herbicidal activity: Chemical and biological characterization. *Natural Product Reports*, 32(12), 1629–1653. <https://doi.org/10.1039/C5NP00081E>
- Cloete, M., Fischer, M., Mostert, L., & Halleen, F. (2015). Hymenochaetales associated with esca-related wood rots on grapevine with a special emphasis on the status of esca in South African vineyards. *Phytopathologia Mediterranea*, 54(2), 299–312.
- Cobos, R., Ibañez, A., Díez-Galán, A., Calvo-Peña, C., Ghorehshizadeh, S., & Coque, J. J. R. (2022). The Grapevine Microbiome to the Rescue: Implications for the Biocontrol of Trunk Diseases. *Plants*, 11(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/plants11070840>
- Cordero, R. J. B., & Casadevall, A. (2017). Functions of fungal melanin beyond virulence. *Fungal Biology Reviews*, 31(2), 99–112. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.12.003>
- Del Frari, G., Gobbi, A., Aggerbeck, M. R., Oliveira, H., Hansen, L. H., & Ferreira, R. B. (2019). Characterization of the Wood Mycobiome of *Vitis vinifera* in a Vineyard Affected by Esca. Spatial Distribution of Fungal Communities and Their Putative Relation With Leaf Symptoms. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00910>
- Deyett, E., & Rolshausen, P. E. (2020). Endophytic microbial assemblage in grapevine. *FEMS Microbiology Ecology*, 96(5), fiae053. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiae053>
- Di Marco, S., & Osti, F. (2009). Effect of biostimulant sprays on *Phaeomoniella chlamydospora* and esca proper infected vines under greenhouse and field conditions. *Phytopathologia Mediterranea*, 48(1), 47–58.
- Dissanayake, A. J., Liu, M., Zhang, W., Chen, Z., Udayanga, D., Chukeatirote, E., Li, X., Yan, J., & Hyde, K. D. (2015). Morphological and molecular characterisation of *Diaporthe* species associated with grapevine trunk disease in China. *Fungal Biology*, 119(5), 283–294. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2014.11.003>
- Dissanayake, A. J., Purahong, W., Wubet, T., Hyde, K. D., Zhang, W., Xu, H., Zhang, G., Fu, C., Liu, M., Xing, Q., Li, X., & Yan, J. (2018). Direct comparison of culture-dependent and culture-independent molecular

approaches reveal the diversity of fungal endophytic communities in stems of grapevine (*Vitis vinifera*). *Fungal Diversity*, 90(1), 85–107. <https://doi.org/10.1007/s13225-018-0399-3>

DuBois, Michel., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, Fred. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>

Edwards, J., & Pascoe, I. G. (2004). Occurrence of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* associated with Petri disease and esca in Australian grapevines. *Australasian Plant Pathology*, 33(2), 273–279. <https://doi.org/10.1071/AP04016>

Edwards, J., Pascoe, I. G., Thomson, F., & Salib, S. (2007a). The Impact of „*Phaeomoniella chlamydospora*” Infection on the Grapevine’s Physiological Response to Water Stress - Part 1: Zinfandel. *Phytopathologia Mediterranea*. APRIL, 2007, 1000–1012. <https://doi.org/10.1400/68064>

Edwards, J., Pascoe, I. G., Thomson, F., & Salib, S. (2007b). The Impact of „*Phaeomoniella chlamydospora*” Infection on the Grapevine’s Physiological Response to Water Stress - Part 2: Cabernet Sauvignon and Chardonnay. *Phytopathologia Mediterranea*. APRIL, 2007, 1000–1012. <https://doi.org/10.1400/68066>

Epstein, L., Kaur, S., & VanderGheynst, J. S. (2008). Botryosphaeria-related dieback and control investigated in noncoastal California grapevines. *California Agriculture*, 62(4). <https://escholarship.org/uc/item/3kq7t803>

Fischer, J., Beckers, S. J., Yiamsawas, D., Thines, E., Landfester, K., & Wurm, F. R. (2019). Targeted Drug Delivery in Plants: Enzyme-Responsive Lignin Nanocarriers for the Curative Treatment of the Worldwide Grapevine Trunk Disease Esca. *Advanced Science*, 6(15), 1802315. <https://doi.org/10.1002/advs.201802315>

Fischer, M. (2002). A new wood-decaying basidiomycete species associated with esca of grapevine: *Fomitiporia mediterranea* (Hymenochaetales). *Mycological Progress*, 1(3), 315–324. <https://doi.org/10.1007/s11557-006-0029-4>

Fleurat-Lessard, P., Luini, E., La Camera, S., Thibault, F., Roblin, G., & Berjeaud, J.-M. (2023). Fungal wood-degrading enzymes in esca-diseased grapevine and effects of carbohydrate environment on fungal development. *Archives of Microbiology*, 205(5), 194. <https://doi.org/10.1007/s00203-023-03544-6>

Fontaine, F., Gramaje, D., Armengol, J., Smart, R., Nagy, Z. A., Borgo, M., Rego, C., & Corio-Costet, M.-F. (2016). Grapevine trunk diseases. A review. OIV Publications. <https://hal.science/hal-01604038>

Fourie, P. H., & Halleen, F. (2004). Proactive Control of Petri Disease of Grapevine Through Treatment of Propagation Material. *Plant Disease*, 88(11), 1241–1245. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.11.1241>

Fourie, P. H., & Halleen, F. (2006). Chemical and biological protection of grapevine propagation material from trunk disease pathogens. *European Journal of Plant Pathology*, 116(4), 255–265. <https://doi.org/10.1007/s10658-006-9057-9>

Galletti, R., Denoux, C., Gambetta, S., Dewdney, J., Ausubel, F. M., De Lorenzo, G., & Ferrari, S. (2008). The AtrbohD-Mediated Oxidative Burst Elicited by Oligogalacturonides in Arabidopsis Is Dispensable for the Activation of Defense Responses Effective against Botrytis cinerea. *Plant Physiology*, 148(3), 1695–1706. <https://doi.org/10.1104/pp.108.127845>

Garcia-Brugger, A., Lamotte, O., Vandelle, E., Bourque, S., Lecourieux, D., Poinssot, B., Wendehenne, D., & Pugin, A. (2006). Early Signaling Events Induced by Elicitors of Plant Defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(7), 711–724. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-0711>

González, V., Sánchez-Torres, P., Hinarejos, R., & Tuset, J. J. (2009). *Inonotus hispidus* fruiting bodies on grapevines with esca symptoms in mediterranean areas of Spain. *JOURNAL OF PLANT PATHOLOGY*, 91. <https://doi.org/10.4454/jpp.v91i2.979>

González, V., & Tello, M. L. (2011). The endophytic mycota associated with *Vitis vinifera* in central Spain. *Fungal Diversity*, 47(1), 29–42. <https://doi.org/10.1007/s13225-010-0073-x>

Gramaje, D., & Armengol, J. (2011). Fungal Trunk Pathogens in the Grapevine Propagation Process: Potential Inoculum Sources, Detection, Identification, and Management Strategies. *Plant Disease*, 95(9), 1040–1055. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-11-0025>

Gramaje, D., Aroca, Á., Raposo, R., García-Jiménez, J., & Armengol, J. (2009). Evaluation of fungicides to control Petri disease pathogens in the grapevine propagation process. *Crop Protection*, 28(12), 1091–1097. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2009.05.010>

- Gramaje, D., Baumgartner, K., Halleen, F., Mostert, L., Sosnowski, M., Úrbez-Torres, J. R., & Armengol, J. (2016). Fungal trunk diseases: A problem beyond grapevines? *Plant Pathology*, 65, 355–356. <https://doi.org/10.1111/ppa.12486>
- Gramaje, D., Mostert, L., & Armengol, J. (2011). Characterization of *Cadophora luteo-olivacea* and *C. melinii* isolates obtained from grapevines and environmental samples from grapevine nurseries in Spain. *Phytopathologia Mediterranea*, 50, S112–S126.
- Gramaje, D., Úrbez-Torres, J. R., & Sosnowski, M. R. (2018). Managing Grapevine Trunk Diseases With Respect to Etiology and Epidemiology: Current Strategies and Future Prospects. *Plant Disease*, 102(1), 12–39. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-17-0512-FE>
- Greenblatt, G. A., & Wheeler, M. H. (1986). HPLC Analysis of Fungal Melanin Intermediates and Related Metabolites. *Journal of Liquid Chromatography*, 9(5), 971–981. <https://doi.org/10.1080/01483918608076683>
- Gubler, W. D., Baumgartner, K., Browne, G. T., Eskalen, A., Latham, S. R., Petit, E., & Bayramian, L. A. (2004). Root diseases of grapevines in California and their control. *Australasian Plant Pathology*, 33(2), 157. <https://doi.org/10.1071/AP04019>
- Gubler, W. D., & Eskalen, A. (2001). Association of Spores of „*Phaeoconiella chlamydospora*”, „*Phaeoacremonium inflatipes*”, and „*Pm. Aleophilum*” with Grapevine Cordons in California. *Phytopathologia Mediterranea*. Volume 40, Supplement, 2001, 1000–1004. <https://doi.org/10.1400/14660>
- György É. (2020). Élelmiszer-mikrobiológia laboratóriumi gyakorlatok. *Scientia Kiadó*. <https://real.mtak.hu/118351/>
- Haidar, R., Yacoub, A., Vallance, J., Compant, S., Antonielli, L., Saad, A., Habenstein, B., Kauffmann, B., Grélard, A., Loquet, A., Attard, E., Guyoneaud, R., & Rey, P. (2021). Bacteria associated with wood tissues of Esca-diseased grapevines: Functional diversity and synergy with *Fomitiporia mediterranea* to degrade wood components. *Environmental Microbiology*, 23(10), 6104–6121. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15676>
- Hammerschmidt, R. (1999). Induced disease resistance: How do induced plants stop pathogens? *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55(2), 77–84. <https://doi.org/10.1006/pmpp.1999.0215>
- Hofstetter, V., Buyck, B., Croll, D., Viret, O., Couloux, A., & Gindro, K. (2012). What if esca disease of grapevine were not a fungal disease? *Fungal Diversity*, 54(1), 51–67. <https://doi.org/10.1007/s13225-012-0171-z>
- Hrycan, J., Hart, M., Bowen, P., Forge, T., & Úrbez-Torres, J. R. (2020). Grapevine trunk disease fungi: Their roles as latent pathogens and stress factors that favour disease development and symptom expression. *Phytopathologia Mediterranea*, 59, 395–424. <https://doi.org/10.14601/Phyto-11275>
- Jablonowski J. (1895). A szőlő betegségei és ellenségei. Kiadja a K.M. Természettudományi Társulat.
- Jayawardena, R. S., Liu, M., Maharachchikumbura, S. S. N., Zhang, W., Xing, Q., Hyde, K. D., Nilthong, S., Li, X., & Yan, J. (2016). *Neopestalotiopsis vitis* sp. Nov. Causing grapevine leaf spot in China. *Phytotaxa*, 258(1), 63. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.258.1.4>
- Jayawardena, R. S., Purahong, W., Zhang, W., Wubet, T., Li, X., Liu, M., Zhao, W., Hyde, K. D., Liu, J., & Yan, J. (2018). Biodiversity of fungi on *Vitis vinifera* L. revealed by traditional and high-resolution culture-independent approaches. *Fungal Diversity*, 90(1), 1–84. <https://doi.org/10.1007/s13225-018-0398-4>
- Jeworutzki, E., Roelfsema, M. R. G., Anschutz, U., Krol, E., Elzenga, J. T. M., Felix, G., Boller, T., Hedrich, R., & Becker, D. (2010). Early signaling through the Arabidopsis pattern recognition receptors FLS2 and EFR involves Ca²⁺-associated opening of plasma membrane anion channels: Flagellin-activated ion channels. *The Plant Journal*, 62(3), 367–378. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04155.x>
- J.H.S., F., & P.S., V. W. (2017). Slow Dieback of Grapevine in South Africa: Stress-Related Predisposition of Young Vines for Infection by *Phaeoacremonium chlamydosporum*. *South African Journal of Enology & Viticulture*, 20(2). <https://doi.org/10.21548/20-2-2228>
- Ji, T., Altieri, V., Salotti, I., & Rossi, V. (2023). Effects of Temperature and Moisture Duration on Spore Germination of Four Fungi that Cause Grapevine Trunk Diseases. *Plant Disease*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-22-1802-SC>
- Ji, T., Salotti, I., Altieri, V., Li, M., & Rossi, V. (2023). Temperature-Dependent Growth and Spore Germination of Fungi Causing Grapevine Trunk Diseases: Quantitative Analysis of Literature Data. *Plant Disease*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-22-2249-RE>

- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Kado, C. (2006). *Erwinia* and Related Genera (Köt. 6, o. 443–450). https://doi.org/10.1007/0-387-30746-X_15
- Karácsony, Z., Mondello, V., Fontaine, F., & Váczy, K. Z. (2023). The potential role of *Aureobasidium pullulans* in the development of foliar symptoms of Esca disease in grapevine. *OENO One*, 57(3), Article 3. <https://doi.org/10.20870/oenone.2023.57.3.7463>
- Koornneef, A., Leon-Reyes, A., Ritsema, T., Verhage, A., Den Otter, F. C., Van Loon, L. C., & Pieterse, C. M. J. (2008). Kinetics of Salicylate-Mediated Suppression of Jasmonate Signaling Reveal a Role for Redox Modulation. *Plant Physiology*, 147(3), 1358–1368. <https://doi.org/10.1104/pp.108.121392>
- Lecomte, P., Darrieutort, G., Liminana, J.-M., Comont, G., Muruamendiaraz, A., Legorburu, F.-J., Choueiri, E., Jreijiri, F., El Amil, R., & Fermaud, M. (2012). New Insights into Esca of Grapevine: The Development of Foliar Symptoms and Their Association with Xylem Discoloration. *Plant Disease*, 96(7), 924–934. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-11-0776-RE>
- Lecomte, P., Diarra, B., Carbonneau, A., Rey, P., & Chevrier, C. (2018). Esca of grapevine and training practices in France: Results of a 10-year survey. *Phytopathologia Mediterranea*, 57(3), 472–487.
- Li, Y., Li, X., Zhang, W., Zhang, J., Wang, H., Peng, J., Wang, X., & Yan, J. (2023). Belowground microbiota analysis indicates that *Fusarium* spp. Exacerbate grapevine trunk disease. *Environmental Microbiome*, 18(1), 29. <https://doi.org/10.1186/s40793-023-00490-0>
- Loon, L. C. van, Rep, M., & Pieterse, C. M. J. (2006). Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annual Review of Phytopathology*, 44(Volume 44, 2006), 135–162. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425>
- Luini, E., Fleurat-Lessard, P., Rousseau, L., Roblin, G., & Berjeaud, J.-M. (2010). Inhibitory effects of polypeptides secreted by the grapevine pathogens *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* on plant cell activities. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 74(5), 403–411. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2010.06.007>
- Marilley, L., & Aragno, M. (1999). Phylogenetic diversity of bacterial communities differing in degree of proximity of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* roots. *Applied Soil Ecology*, 13(2), 127–136. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(99\)00028-1](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(99)00028-1)
- Mendes, R., Kruijt, M., de Bruijn, I., Dekkers, E., van der Voort, M., Schneider, J. H. M., Piceno, Y. M., DeSantis, T. Z., Andersen, G. L., Bakker, P. A. H. M., & Raaijmakers, J. M. (2011). Deciphering the Rhizosphere Microbiome for Disease-Suppressive Bacteria. *Science*, 332(6033), 1097–1100. <https://doi.org/10.1126/science.1203980>
- Mikiciński, A., Puławska, J., Molzhigitova, A., & Sobiczewski, P. (2020). Bacterial species recognized for the first time for its biocontrol activity against fire blight (*Erwinia amylovora*). *European Journal of Plant Pathology*, 156(1), 257–272. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01885-x>
- Mondello, V., Songy, A., Battiston, E., Pinto, C., Coppin, C., Trotel-Aziz, P., Clément, C., Mugnai, L., & Fontaine, F. (2018). Grapevine Trunk Diseases: A Review of Fifteen Years of Trials for Their Control with Chemicals and Biocontrol Agents. *Plant Disease*, 102(7), 1189–1217. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-17-1181-FE>
- Moyo, P., Allsopp, E., Roets, F., Mostert, L., & Halleen, F. (2014). Arthropods Vector Grapevine Trunk Disease Pathogens. *Phytopathology*, 104(10), 1063–1069. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-11-13-0303-R>
- Mugnai, L. (2011). Editors note, and Dedication. *Phytopathologia Mediterranea*, 3–4. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-10446
- Mugnai, L., Graniti, A., & Surico, G. (1999). Esca (Black Measles) and Brown Wood-Streaking: Two Old and Elusive Diseases of Grapevines. *Plant Disease*, 83(5), 404–418. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.5.404>
- Negm, N. A., Abou Kana, M. T. H., Abd-Elaal, A. A., & Elwahy, A. H. M. (2016). Fluorescein dye derivatives and their nanohybrids: Synthesis, characterization and antimicrobial activity. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 162, 421–433. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.07.014>
- Niem, J. M., Billones-Baaijens, R., Stodart, B., & Savocchia, S. (2020). Diversity Profiling of Grapevine Microbial Endosphere and Antagonistic Potential of Endophytic *Pseudomonas* Against Grapevine Trunk Diseases. *Frontiers in Microbiology*, 11, 477. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00477>

- Ophel, K., Nicholas, P. R., Magarey, P. A., & Bass, A. W. (1990). Hot Water Treatment of Dormant Grape Cuttings Reduces Crown Gall Incidence in a Field Nursery. *American Journal of Enology and Viticulture*, 41(4), 325–329. <https://doi.org/10.5344/ajev.1990.41.4.325>
- Osti, F., & Di Marco, S. (2007). Application of „Trichoderma” to Prevent „Phaeomoniella chlamydospora” Infections in Organic Nurseries. *Phytopathologia Mediterranea*. APRIL, 2007, 1000–1011. <https://doi.org/10.1400/68074>
- Peiffer, J. A., Spor, A., Koren, O., Jin, Z., Tringe, S. G., Dangl, J. L., Buckler, E. S., & Ley, R. E. (2013). Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(16), 6548–6553. <https://doi.org/10.1073/pnas.1302837110>
- Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P., & Van Der Putten, W. H. (2013). Going back to the roots: The microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), 789–799. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3109>
- Pinto, C., Pinho, D., Sousa, S., Pinheiro, M., Egas, C., & C. Gomes, A. (2014). Unravelling the Diversity of Grapevine Microbiome. *PLoS ONE*, 9(1), e85622. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085622>
- Pitzschke, A., Schikora, A., & Hirt, H. (2009). MAPK cascade signalling networks in plant defence. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(4), 421–426. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.06.008>
- Pouzoulet, J., Pivovarov, A. L., Santiago, L. S., & Rolshausen, P. E. (2014). Can vessel dimension explain tolerance toward fungal vascular wilt diseases in woody plants? Lessons from Dutch elm disease and esca disease in grapevine. *Frontiers in Plant Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00253>
- Price, T. V. (1973). Studies on the Microbial Colonization of Sapwood of Pruned Apricot Trees. *Australian Journal of Biological Sciences*, 26(2), 379–388. <https://doi.org/10.1071/bi9730379>
- Quiza, L., St-Arnaud, M., & Yergeau, E. (2015). Harnessing phytomicrobiome signaling for rhizosphere microbiome engineering. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00507>
- Retief, E., McLeod, A., & Fourie, P. H. (2006). Potential Inoculum Sources of *Phaeomoniella chlamydospora* in South African Grapevine Nurseries. *European Journal of Plant Pathology*, 115(3), 331–339. <https://doi.org/10.1007/s10658-006-9025-4>
- Rolshausen, P. E., Greve, L. C., Labavitch, J. M., Mahoney, N. E., Molyneux, R. J., & Gubler, W. D. (2008). Pathogenesis of *Eutypa lata* in Grapevine: Identification of Virulence Factors and Biochemical Characterization of Cordon Dieback. *Phytopathology*, 98(2), 222–229. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-98-2-0222>
- Rolshausen, P. E., & Gubler, W. D. (2005). Use of Boron for the Control of *Eutypa* Dieback of Grapevines. *Plant Disease*, 89(7), 734–738. <https://doi.org/10.1094/PD-89-0734>
- Rolshausen, P. E., Úrbez-Torres, J. R., Rooney-Latham, S., Eskalen, A., Smith, R. J., & Gubler, W. D. (2010). Evaluation of Pruning Wound Susceptibility and Protection Against Fungi Associated with Grapevine Trunk Diseases. *American Journal of Enology and Viticulture*, 61(1), 113–119. <https://doi.org/10.5344/ajev.2010.61.1.113>
- Rooney-Latham, S., Eskalen, A., & Gubler, W. D. (2005). Occurrence of *Togninia minima* Perithecia in Esca-Affected Vineyards in California. *Plant Disease*, 89(8), 867–871. <https://doi.org/10.1094/PD-89-0867>
- Rueden, C. T., Schindelin, J., Hiner, M. C., DeZonia, B. E., Walter, A. E., Arena, E. T., & Eliceiri, K. W. (2017). ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics*, 18(1), 529. <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1934-z>
- Sladonja, B., & Poljuha, D. (2013). The Mediterranean Genetic Code: Grapevine and Olive. *BoD – Books on Demand*.
- Songy, A., Vallet, J., Gantet, M., Boos, A., Ronot, P., Tarnus, C., Clément, C., Larignon, P., Goddard, M.-L., & Fontaine, F. (2019). Sodium arsenite effect on *Vitis vinifera* L. Physiology. *Journal of Plant Physiology*, 238, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2019.05.010>
- Sosnowski, M. R., Creaser, M. L., Wicks, T. J., Lardner, R., & Scott, E. S. (2008). Protection of grapevine pruning wounds from infection by *Eutypa lata*. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 14(2), 134–142. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2008.00015.x>
- Sosnowski, M. R., Loschiavo, A. P., Wicks, T. J., & Scott, E. S. (2013). Evaluating Treatments and Spray Application for the Protection of Grapevine Pruning Wounds from Infection by *Eutypa lata*. *Plant Disease*, 97(12), 1599–1604. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-13-0201-RE>

- Sparapano, L., Graniti, A., & Bruno, G. (2001). Three-Year Observation of Grapevines Cross-Inoculated with Esca-Associated Fungi. *Phytopathologia Mediterranea*. Volume 40, Supplement, 2001, 1000–1011. <https://doi.org/10.1400/14653>
- Surico, G. (2009). Towards a redefinition of the diseases within the esca complex of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea*, 48(1), 5–10.
- Tao, X., Wu, Q., Li, J., Huang, S., Cai, L., Mao, L., Luo, Z., Li, L., & Ying, T. (2022). Exogenous methyl jasmonate regulates phenolic compounds biosynthesis during postharvest tomato ripening. *Postharvest Biology and Technology*, 184, 111760. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2021.111760>
- Toussoun, T. A., Bega, R. V., & Nelson, P. E. (1970). *Root Diseases and Soil-borne Pathogens*. University of California Press.
- Tsuda, K., & Katagiri, F. (2010). Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, 13(4), 459–465. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2010.04.006>
- Úrbez-Torres, J. R., Battany, M., Bettiga, L. J., Gispert, C., McGourty, G., Roncoroni, J., Smith, R. J., Verdegaal, P., & Gubler, W. D. (2010). Botryosphaeriaceae Species Spore-Trapping Studies in California Vineyards. *Plant Disease*, 94(6), 717–724. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-6-0717>
- Úrbez-Torres, J. R., Bruez, E., Hurtado, J., & Gubler, W. D. (2010). Effect of Temperature on Conidial Germination of Botryosphaeriaceae Species Infecting Grapevines. *Plant Disease*, 94(12), 1476–1484. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-10-0423>
- Van Niekerk, J. M., Bester, W., Halleen, F., Crous, P. W., & Fourie, P. H. (2011). The distribution and symptomatology of grapevine trunk disease pathogens are influenced by climate. *Phytopathologia Mediterranea*, 50, S98–S111.
- van Niekerk, J. M., Calitz, F. J., Halleen, F., & Fourie, P. H. (2010). Temporal spore dispersal patterns of grapevine trunk pathogens in South Africa. *European Journal of Plant Pathology*, 127(3), 375–390. <https://doi.org/10.1007/s10658-010-9604-2>
- Wample, R. L. (1993). Influence of Pre- and Post-Treatment Storage on Budbreak of Hot Water Treated Cuttings of Cabernet Sauvignon. *American Journal of Enology and Viticulture*, 44(2), 153–158. <https://doi.org/10.5344/ajev.1993.44.2.153>
- Wang, W.-Y., Kong, W.-L., Liao, Y.-C.-Z., & Zhu, L.-H. (2022). Identification of *Bacillus velezensis* SBB and Its Antifungal Effects against *Verticillium dahliae*. *Journal of Fungi*, 8(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/jof8101021>
- Yacoub, A., Gerbore, J., Magnin, N., Chambon, P., Dufour, M.-C., Corio-Costet, M.-F., Guyoneaud, R., & Rey, P. (2016). Ability of *Pythium oligandrum* strains to protect *Vitis vinifera* L., by inducing plant resistance against *Phaeomoniella chlamydospora*, a pathogen involved in Esca, a grapevine trunk disease. *Biological Control*, 92, 7–16. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.08.005>
- Zarraonaindia, I., Owens, S. M., Weisenhorn, P., West, K., Hampton-Marcell, J., Lax, S., Bokulich, N. A., Mills, D. A., Martin, G., Taghavi, S., van der Lelie, D., & Gilbert, J. A. (2015). The Soil Microbiome Influences Grapevine-Associated Microbiota. *mBio*, 6(2), 10.1128/mbio.02527-14. <https://doi.org/10.1128/mbio.02527-14>
- Zipfel, C. (2014). Plant pattern-recognition receptors. *Trends in Immunology*, 35(7), 345–351. <https://doi.org/10.1016/j.it.2014.05.004>