

Изследване на вирулентността на изолати *Eutypa lata* с помощта на два метода

Саня П. Живкович^{1*}, Таня П. Васич¹,
Йордан П. Маркович², Дарко Р. Йевремович³

¹Селскостопански факултет, Нишки университет, Косанчицева 4, 37000
Крушевац, Република Сърбия

²Институт за фуражни култури, 37251 Глободер, Крушевац, Република
Сърбия

Изследователски институт по овощарство, ул. "Краля Петра I" 9,
32102 Чачак, Сърбия

Study of Virulence of *Eutypa lata* Isolates using Two Methods

Sanja P. Živković^{1*}, Tanja P. Vasić¹,
Jordan P. Marković², Darko R. Jevremović³

¹Faculty of Agriculture, University of Niš, Kosančićeva 4,
37000 Kruševac, Serbia;

²Institute for forage crops, Globoder bb, 37000 Kruševac, Serbia

³Fruit Research Institute, Kralja Petra I 9, 32102 Čačak, Serbia

*Email: zivkovic.sanja@junis.ni.ac.rs

Original scientific paper

РЕЗЮМЕ

В многогодишен експеримент, заложен *in vitro*, е изследвана вирулентността на 14 изолати на *Eutypa lata* (EL17, EL27, EL29, EL30, EL150, EL151, EL152, EL153, EL154, EL155, EL159, EL159) и два референтни изолати BX1.10 и 8F, получени от Institute National de la Recherche Agronomique, INRA, Франция, предварително потвърдени на морфологично и молекулярно ниво.

А именно, инокулацията на

SUMMARY

In a multi-year experiment set up *in vitro*, virulence testing was conducted on 14 isolates of *Eutypa lata* (EL17, EL27, EL29, EL30, EL150, EL151, EL152, EL153, EL154, EL155, EL156, EL157, EL158, EL199) and two reference isolates BX1.10 and 8F obtained from the Institute National de la Recherche Agronomique, INRA, France, previously confirmed on morphological and molecular level.

Namely, inoculation of unrooted

невкоренени и вкоренени лозови растения от сорта Каберне Совиньон е извършена в два отделни опита.

След отчитане на резултатите и в двата експеримента, всички изследвани изолати показаха вирулентност в различна степен спрямо инокулираните резници от сорт Каберне Совиньон. Всички изследвани изолати показват висока степен на патогенност при сорт Каберне Совиньон. Освен това, различните изолати в двата експеримента показват различна степен на агресивност спрямо изследвания сорт лоза. Анализът на получените резултати показва, че крайният резултат и от двата експеримента е идентичен. И в двата експеримента, най-агресивни се оказват изолати EL150, EL152, BX1.10, EL156, EL27, EL151 EL154 и 8F. Въз основа на получените резултати, може да се направи заключение, че и двата метода са подходящи и надеждни за изследване на патогенността на различни лозови сортове спрямо гъбички *E. lata*.

Ключови думи: Каберне Совиньон, *Eutypa lata*, вкоренени и невякоренени лозови растения

УВОД

В Република Сърбия през последното десетилетие се наблюдават значителни загуби поради загиването на лозата. По време на многогодишни наблюдения (2004-2019), в Сърбия е констатирано присъствието на гъбичките *Eutypa lata*, които може да са причина за загиването на лозата (Živković et al., 2012a). Липсата на устойчиви на това заболяване сортове води до нарастващи загуби, които се оценяват на 20 до 35%.

Видимите му симптоми се

and rooted grapevine plants of the Cabernet Sauvignon cultivar was performed in two separate experiments.

After reading the results in both experiments, all studied isolates showed virulence to varying degrees towards inoculated cuttings of the Cabernet Sauvignon cultivar.

All tested isolates showed pathogenicity to Cabernet Sauvignon to a high degree, also different isolates in both experiments showed different degrees of aggressiveness to the tested grapevine cultivar.

The analysis of the obtained results shows that the final outcome of both experiments is identical.

In both experiments the isolates EL150, EL152, BX1.10, EL156, EL27, EL151 EL154 and 8F proved to be the most aggressive.

Based on the obtained results, we can conclude that both methods are suitable and reliable for testing pathogenicity of different grapevine cultivars to the fungus *E. lata*.

Key words: Cabernet Sauvignon, *Eutypa lata*, unrooted and rooted grapevine plants

INTRODUCTION

Significant losses have been observed in our country in the last decade, due to the grapevine dieback. During many years of observing (2004-2019) in Serbia, the presence of the fungus *Eutypa lata* was noted, which may be the cause of the dieback of grapevine (Živković et al., 2012a).

The absence of resistant varieties to this disease leads to increasing losses, which are estimated at 20 to 35%.

Visible symptoms of this

появяват само във фаза F на развитие на лозата, когато леторастите са дълги 20 до 50 cm и се проявяват с поява на скъсени леторасти със „зигзагообразни“ междувъзлия, деформирани хлоротични листа и некроза на краищата на листата. На напречния разрез на лозовия ствол се забелязва некроза във формата на буквата „V“ (Živković et al., 2012a; 2012b, Živković et al., 2019).

Сред причините за загиване на лозата (GTD), най-големите икономически щети по лозата са причинени от ESCA, Botryosphaeria, Eutypa (Sosnowski and McCarthi, 2017), които влияят върху растежа на растенията, причиняват спад на добива и качеството на гроздето и преждевременно загиване на лозата (Gramaje et al., 2018; Hrycan et al., 2020). Болестите по лозовия ствол (GTD) включват множество гъбични патогени, които действат поотделно или заедно и могат да заразят растението на лозата на всички етапи от растежа (Fontaine et al., 2016).

Трябва да се отбележи, че тези гъбички причиняват подобни и дори същите симптоми по листата и леторастите, както и по ствола на лозата. Всичко това усложнява разделянето на симптомите и точното установяване на причините за болести по лозата (Gubler et al., 2005, Gramaje et al., 2018). Освен профилактичните мерки, понастоящем няма ефективен фунгицид за борба с това заболяване (Mondello et al., 2017).

Симптомите по лозата се различават при различните сортове (Gubler et al., 2005; Sosnowski et al., 2007a, b; Travadon et al., 2013; Cardot et al., 2019). Въпреки това, ген за устойчивост към болести по лозата (GTD) все още не е открит в

disease appear only in the F phase of grapevine development, when the shoots of the vine are 20 to 50 cm long, and are manifested by the appearance of shortened shoots with a "zigzag" appearance of internodes, deformed chlorotic leaves and necrosis of leaf ends. On the cross section of the grapevine trunk, necrosis in the shape of the letter "V" can be seen (Živković et al., 2012a; 2012b, Živković et al., 2019).

Among the causes of grapevine dieback (GTD), the greatest economic damage to grapevine is caused by ESCA, Botryosphaeria dieback, Eutypa dieback (Sosnowski and McCarthi, 2017), that affect plant growth, cause decline of grape yield and quality and premature vine decay (Gramaje et al., 2018; Hrycan et al., 2020).

Grapevine trunk diseases (GTD) include multiple fungal pathogens that act individually or in association and can infect a grapevine plant at all stages of growth (Fontaine et al., 2016).

It must be noted that these fungi cause similar and even the same symptoms on the leaves and shoots, as well as on the trunk of the vine.

This all complicates the separation of symptoms and the precise identification of disease causes in vineyards (Gubler et al., 2005, Gramaje et al., 2018). Apart from preventive measures, there is currently no effective fungicide to combat this disease (Mondello et al., 2017).

The grapevine symptoms on grapevine varies among varieties (Gubler et al., 2005; Sosnowski et al., 2007a, b; Travadon et al., 2013; Cardot et al., 2019). However, a gene for resistance to grapevine diseases (GTD) has not yet been found in

лозовите растения. Една от причините за загиване на лозата (GTD) са гъбичките *Eutypa lata*. Тези гъбички са патоген, който заразява лозата по време на резитби.

Болестта се разпространява с помощта на аскоспори (Carter, 1994; Rolshausen et al., 2015). Тази гледна точка се подкрепя от анализи на вегетативната съвместимост и ДНК на популацията на *E. lata*, а напоследък и от филогенетичен анализ на ДНК последователности на съответните части от генома, което показва много висока степен на генетично разнообразие в популациите на *E. lata* в рамките и извън лозята (Péros and Berger, 2003; Travadon et al., 2012; Rolshausen et al., 2015). Гъбичките зимуват върху мъртви заразени стволоче под формата на перитеции.

Перитециите са разположени в съединителната тъкан на повърхността на мъртвата растителна тъкан. Зрялата съединителна тъкан е тъмно черна на цвят, с грапава повърхност, причинена от изпъкване на перитецията на шията (Carter, 1994; Rolshausen et al., 2015).

Аскоспорите остават жизнени до 2 месеца и могат да се предават от вятъра на разстояния от 50 до 100 km (Gubler et al., 2005).

Инфекцията възниква, когато аскоспорите достигнат пряко отрязани участъци от резитбата и проникнат във васкуларната тъкан при наличие на водни капчици.

Нараняванията по лозата, причинени от резитба, заздравяват само след две седмици.

Дъждовните капки са необходими за освобождаването на аскоспорите и след като се пренесат от вятъра и достигнат до резитбените участъци, аскоспорите

grapevine plants. One of the causes of grapevine death (GTD) is the fungus *Eutypa lata*. This fungus is a vascular pathogen that infects the vine through fresh pruning cuts.

The disease spreads with the help of ascospores (Carter, 1994; Rolshausen et al., 2015). This view is supported by analyzes of vegetative compatibility and DNA of the *E. lata* population, and, more recently, by phylogenetic analysis of DNA sequences of corresponding parts of the genome indicating a very high degree of genetic diversity in *E. lata* populations within and out of vineyards (Péros and Berger, 2003; Travadon et al., 2012; Rolshausen et al., 2015).

The fungus overwinters on a dead infected trunks in the form of perithecia.

Perithecia are located in the stroma on the surface of dead plant tissue.

The mature stroma is dark black in color, with a rough surface caused by protrusion of the neck perithecia (Carter, 1994; Rolshausen et al., 2015).

Ascospores remain vital for up to 2 months and can be transmitted by wind over distances of 50 to 100 km (Gubler et al., 2005).

Infection occurs when ascospores reach fresh cut sections from pruning and penetrate vascular tissue in the presence of water droplets.

Wounds on the grapevine caused by pruning heal only after two weeks.

Raindrops are necessary for the release of ascospores, and after being transmitted by wind and reaching the sections created by pruning, ascospores germinate in conducting

покълват в проводящите съдове.

Мицелът на гъбичките в стъблото и клоните първо нахлува в ксилема, а след това се разпространява до камбия и флоема.

В латентната фаза настъпва инвазия на ксилемна проводяща тъкан, след което растенията отслабват поради производството на токсини и гниене на дървесината, причинено от отделяне на ензими за разграждане на клетките (Carter, 1994; Gubler et al., 2005; Rolshausen et al., 2008; Gramaje et al., 2018; Hrycan et al., 2020).

Симптомите на загиване на лозата, причинени от гъбичките *Eutypa lata*, обикновено се появяват върху заразени лозови растения само няколко години след заразяването. Те се проявяват с появата на некроза на ствола, изоставане в растежа на леторастите, често с малки, хлоротични листа. Поради нарастването на здрава тъкан по ствола на лозата се получава напукване по протежение на нектотизираната тъкан, което води до преждевременна смърт на лозата в рамките на 3 до 5 години.

Гъбичките са изолирани само по лозовия ствол.

Симптомите по листата и леторастите се дължат на действието на токсини, като еутипин, гликопротеини или ензими, които разграждат клетъчната стена (Rolshausen et al., 2008; Cardot et al., 2019).

В периода от 2004 до 2019г. на територията на Сърбия се наблюдават симптомите на загиване на лозата. Симптомите се проявяват чрез появата на скъсени, хлоротични летораста, често със зигзагообразно подреждане на междувъзлията поради бавен

vessels.

The mycelium of the fungus in the stem and branches first invades xylem, and then spreads to the cambium and phloem.

In the dormant phase, invasion of xylem conducting tissue occurs, then plants weaken due to toxin production and wood rot caused by secreting enzymes to degrade cells (Carter, 1994; Gubler et al., 2005; Rolshausen et al., 2008; Gramaje et al., 2018; Hrycan et al., 2020).

Symptoms of grapevine dieback, caused by the fungus *Eutypa lata*, usually appear on infested grapevine plants only a few years after the infection.

They are manifested by the appearance of necrosis of the trunk, lagging behind in the growth of shoots, often with small, chlorotic leaves. Due to the growth of healthy tissue on the trunk of the vine, cracking occurs along the necrotized tissue, which leads to premature death of the grapevine within 3 to 5 years.

The fungus was isolated only from the grapevine trunk.

Symptoms on leaves and shoots are due to the action of toxins, such as eutipine, glycoproteins or enzymes that break down the cell wall (Rolshausen et al., 2008; Cardot et al., 2019).

In the period from 2004 to 2019, on the territory of Serbia, the symptoms of the grapevine dieback have been observed. Symptoms are manifested by the appearance of shortened, chlorotic shoots, often with a zigzag arrangement of internodes due to slow growth.

растеж. Върху тях се развиват малки, хлоротични листа.

Повърхността на болната листна петура често има набръчкан вид с малки некротични петна, разпръснати около ръба и повърхността на листната плоча. С течение на времето лозата частично или напълно загива (Živković et al., 2012a, b; Živković et al., 2019).

Основната цел на настоящето проучване е да се определи вирулентността на 14 изолата на *Eutypa lata*, изолирани от лози в Сърбия, и 2 референтни изолата, получени от колекцията на INRA (Institute National de la Recherche Agronomique, INRA, Франция).

Тестът за вирулентност е извършен с помощта на два метода: инокулация на невкоренени лозови резници (Péros and Berger, 1994) и инокулация на вкоренени лозови резници в оранжерийни условия (Sosnowski et al., 2007a). Сортът Каберне Совиньон е използван за инокулация на резници и в двата опита.

Изследванията, проведени в настоящия експеримент, ще допринесат за изясняване на разликите в агресивността на изолати от гъбички *E. lata* като причина за загиване на лозата и ще допринесат за по-пълно разбиране на щетите, причинени през последните години в лозарството в Сърбия.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Събиране на растителен материал и изолиране на гъбички.

Изследваните изолати в настоящата статия са получени от лозови растения със симптоми на загиване, събрани в периода от 2004 до 2019г. Пробите са взети в основните райони на

Tiny, chlorotic leaves develop on them.

The surface of diseased leaf plate often has a wrinkled appearance with small necrotic spots scattered around the rim and surface of the leaf plate. Over time, the grapevine partially or completely dies out (Živković et al., 2012a, b; Živković et al., 2019).

The main aim of this study was to determine the virulence of 14 isolates of *Eutypa lata* isolated from grapevine from Serbia and 2 reference isolate obtained from the collection of INRA (Institute National de la Recherche Agronomique, INRA, France).

The virulence test was performed using two methods: inoculation of unrooted vine cuttings (Péros and Berger, 1994) and inoculation of rooted vine cuttings in greenhouse conditions (Sosnowski et al., 2007a). The Cabernet Sauvignon variety was used for inoculation of cuttings in both experiments.

The research conducted in this experiment will contribute to the clarification of differences in the aggressiveness of *E. lata* fungus isolates as a cause of grapevine dieback and will contribute to a more complete understanding of the damage caused in recent years in grapevine production in Serbia.

MATERIAL AND METHODS

Collection of plant material and isolation of fungi.

The examined isolates in this paper were obtained from grapevine plants with symptoms of dieback collected in the period from 2004 to 2019. Sampling was performed in the main grapevine production areas on

лозопроизводство на територията на Република Сърбия от 14 местоположения: Добричево, Дреновац (Поморавски окръг), Прасковче, Липовац (Нишавски окръг), Кобиле, Бела Вода, Кървавица, Суваја, Трнавци, Тулеж (Расински окръг), Гудурица (област Южен Банат), Карбулово (Борски окръг), Стрезовац (Пчински окръг), Сремски Карловци (Южнобанатски окръг).

При вземане на проби от болни растения на полето са взети части от лозови стъбла и кордони от прехода между болната и здравата тъкан с размери от 10 до 20 cm.

След занасяне в лабораторията, пробите първо са измити с течаща вода, след което са изолирани гъбичките по стандартни фитопатологични методи. Изолирани са патогени от лозови стъбла и кордони. За да се отстранят повърхностните примеси, части от стъблото и кордона са промити с течаща вода в продължение на 2 часа, след което са нарязани на части с дължина 1 cm. Частите от стъбло и кордона са изрязани на прехода между некротичната и здрава тъкан. След това са дезинфекцирани повърхностно за 5 минути в 5% разтвор на натриев хипохлорит (NaOCl) (14% NaOCl, Superlab, Белград) и измити 3 пъти за 5 минути в стерилна дестилирана вода. Частите са прехвърлени върху стерилна филтърна хартия за отстраняване на излишната течност и след това са поставени върху хранителна среда. За изолиране на патогена е използван картофено-декстрозен агар (PDA) (PDA) с добавен 300 µl/l гентамицин сулфат.

Тази среда е приготвена от 200 g картофи, 20 g декстроза

the territory of the Republic of Serbia from 14 sites: Dobričevo, Drenovac (Pomoravlje district), Praskovče, Lipovac (Nišava district), Kobilje, Bela Voda, Krvavica, Suvaja, Trnavci, Tulež (Rasina district), Gudurica (South Banat district), Karbulovo (Bor district), Strezovac (Pčinja district), Sremski Karlovci (South Banat district).

During the sampling of diseased plants in the field, fragments of grapevine stems and cordons were taken from the transition between diseased and healthy tissue, 10 to 20 cm in size.

After being brought to the laboratory, the samples were first washed with running water, and then fungal isolation was performed using standard phytopathological methods. Pathogen isolation was performed from grapevine stems and cordons. In order to remove surface impurities, parts of the stem and cordon were washed with running water for 2 hours, and then cut into fragments 1 cm long.

Fragments of stem and cordon were cut at the transition between necrotic and healthy tissue. They were, then, surface disinfected for 5 minutes in 5% sodium hypochlorite solution (NaOCl) (14% NaOCl, Superlab, Belgrade) and washed 3 times for 5 minutes in sterile distilled water.

The fragments were transferred to sterile filter paper to remove excess fluid and then placed on a nutrient medium.

Potato dextrose agar (PDA) with the addition of 300 µl/l of gentamicin sulfate was used to isolate the pathogen.

This medium was prepared from 200 g of potatoes, 20 g of

(Torlak, Институт по имунология и вирусология, Белград), 20 g agar (Torlak, Институт по имунология и вирусология, Белград) и 1 l дестилирана вода (Dhingra and Sinclair, 1995). Петриевите блюда с частите са инкубирани в термостат при температура $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ на тъмно до развитието на гъбични колонии около тях.

Тест за вирулентност и избор на изолати. За проверка на вирулентността на получените моноспориални изолати на гъбичките са извършени изкуствени инокулации на лоза. Тестът за вирулентност е извършен с помощта на два метода: инокулация на невкоренени лозови резници (Péros and Berger, 1994) и инокулация на вкоренени лозови резници в оранжерийни условия (Sosnowski et al., 2007a). Сортът Каберне Совиньон е използван за инокулация на резници и в двата опита. За всички изолати с различен произход (Таблица 1), морфологичните и молекулярни свойства са били предварително изследвани и потвърдени (Živković et al., 2019).

Инокулация на невкоренени лозови резници. Съгласно метода на Péros и Berger (1994), невкоренените резници от сорт Каберне Совиньон са инокулирани в оранжерийни условия. Лозовите резници са събрани през зимата в земеделския имот „Радмиловац“ на Селскостопански факултет на Белградския университет.

Във фазата на покой, 10 дни преди инокулацията, от лозата са отрязани леторасты, които са съхранени в хладилник при температура 4°C до началото експеримента. Преди инокулацията са направени резници с дължина 10-15 cm чрез скъсяване на

dextrose (Torlak, Institute of Immunology and Virology, Belgrade), 20 g of agar (Torlak, Institute of Immunology and Virology, Belgrade) and 1 l of distilled water (Dhingra and Sinclair, 1995). Petri dishes with fragments were incubated in a thermostat at a temperature of $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ in the dark until the development of fungal colonies around the fragments.

Virulence test and isolate selection. In order to check the virulence of the obtained monosporial isolates of the fungus, artificial inoculations of grapevine were performed. The pathogenicity test of isolates was performed in two ways: by inoculation of unrooted grapevine cuttings (Péros and Berger, 1994) and by inoculation of rooted grapevine cuttings in greenhouse conditions (Sosnowski et al., 2007a).

The Cabernet Sauvignon variety was used for inoculation of cuttings in both experiments.

For all of isolates of different origins (Table 1), whose morphological and molecular properties have been previously examined and confirmed (Živković et al., 2019).

Inoculation of unrooted grapevine cuttings. According to the method by Péros and Berger (1994), unrooted cuttings of Cabernet Sauvignon grapevine were inoculated in greenhouse conditions. Grapevine cuttings were collected during the winter on the agricultural estate "Radmilovac" of the Faculty of Agriculture, University of Belgrade.

In the dormant phase, 10 days before the inoculation, the shoots were cut from the grapevine, which were stored in the refrigerator at a temperature of 4°C until the experiment. Before inoculation, 10-15 cm long cuttings were made by shortening the shoots to 2 nodes.

леторастите до 2 възела. След това резниците са потопени във вода за 24 часа, за да се улесни инокулацията (Péros and Berger, 1994).

Пригответените лозови резници се инокулират с фрагмент от колония от 10-дневни култури, отглеждани в среда PDA при 25°C на тъмно. Осем резници са инокулирани в четири повторения.

Срез от мицел се нанася върху разреза, направен със скалпел върху междувъзлията, след което се увива с парафилмова лента. След това мястото на инокулация се увива със стерилна памучна вата, напоена със стерилна вода, за да се предотврати изсъхване (Péros and Berger, 1994).

Така пригответените резници се поставят в съдове с размери 50 x 70 x 30 cm, като долната част се потапя във вода, напоява се редовно (без подхранване), за да се поддържа висока влажност и се съхранява в оранжерия при 21°C.

Като контрола са използвани 8 резника в 4 повторения от сорт Каберне Совиньон, инокулирани с фрагменти от стерилна PDA среда.

Осем седмици след инокулацията симптомите по леторастите са оценени с помощта на скала от 0 (асимптоматични растения), 1 (растения с няколко малки и изсушени листа), 2 (растения с голям брой малки и изсушени листа), 3 (растения с едва присъстващи листа) и 4 (растения с изсъхнали леторастите).

Експериментът е заложен по метода на рандомизиран блоков дизайн (Péros and Berger, 1994).

Изчисляването на интензивността на заболяването по леторастите е извършено чрез пряка пропорция на броя на болните листа на инокулираните

The cuttings were then immersed in water for 24 h to facilitate inoculation (Péros and Berger, 1994).

The prepared grapevine cuttings were inoculated with a fragment of a colony from 10-day-old cultures, grown on PDA at 25°C in the dark. Eight cuttings were inoculated in four replicates.

A section of mycelium was applied to the incision made with a scalpel on the internode and wrapped with parafilm tape.

The inoculation site was then wrapped with sterile cotton wool soaked in sterile water to prevent drying (Péros and Berger, 1994).

The cuttings prepared in this way were placed in containers measuring 50 x 70 x 30 cm, so that the lower part was immersed in water, watered regularly (without feeding), in order to maintain high humidity, and stored in a greenhouse at 21°C.

As a control, 8 cuttings in 4 replicates of the Cabernet Sauvignon variety inoculated with fragments of sterile PDA medium were used.

Eight weeks after inoculation, the symptoms were assessed on shoots using a scale of 0 (asymptomatic plants), 1 (plants with a few small and dried leaves), 2 (plants with a large number of small and dried leaves), 3 (plants with barely present leaves) and 4 (plants with dried shoots).

The experiment was set up by the method of a random block system (Péros and Berger, 1994).

The calculation of the intensity of the disease on the shoots was done by a direct proportion of the number of diseased leaves on inoculated cuttings and the number of leaves on control

резници и броя на листата на контролните резници.

Инокулация на невкоренени лозови резници. Според метода на Sosnowski et al. (2007a), инокулацията на вкоренени резници от сорт Каберне Совиньон е извършена в оранжерийни условия на Института за фуражни култури в Крушевац. Резниците за настоящия експеримент са засадени една година по-рано в субстрат (Klasmann 1) в черни найлонови торбички с размери 12 x 12 x 30 cm.

През пролетта на първата и втората година растенията са наторени с изкуствен тор NPK (15:15:15) в количество 2 g на растение. След това са подрязани до височина две пъпки, за да се намали броят на новите издънки през двата вегетационни сезона за да се улесни поддръжката на растенията и да се даде възможност за по-лесна оценка на симптомите по леторастите.

Преди началото на вегетацията вкоренените лозови растения са инокулирани чрез изрязване на дървесина с дължина 5 mm със скалпел като е поставено парче мицел от култура *E. lata* на възраст 10 дни, отгледана в PDA. След това мястото на инокулация е увито с парафилмова лента. Четири растения са инокулирани в 2 повторения. Като контрола са използвани 4 растения от сорт Каберне Совиньон в 2 повторения, инокулирани с фрагменти от стерилна PDA среда.

Инокулираните растения са поливани според нуждите. До отчитането на резултатите, което е направено на 8-и и 27-и месец след инокулацията, растенията са съхранявани в оранжерия до първите по-високи външни температури, когато са изнасени

cuttings.

Inoculation of rooted grapevine cuttings. According to the method of Sosnowski et al. (2007a), inoculation of rooted cuttings of Cabernet Sauvignon variety was performed in greenhouse conditions of the Institute for forage crops in Kruševac. Cuttings for this experiment were planted a year earlier in the substrate (Klasmann 1) in black plastic bags measuring 12 x 12 x 30 cm.

In the spring of the first and second year, the plants were fertilized with artificial fertilizer NPK (15:15:15) in the amount of 2 g per plant.

They were then pruned to two buds to reduce the number of new shoots in both growing seasons to facilitate plant maintenance and to enable easier access to the symptoms on the shoots.

Before the beginning of vegetation, the rooted grapevine plants were inoculated by cutting a 5 mm long tree with a scalpel and inserting a piece of mycelium of *E. lata* culture aged 10 days, grown on PDA. The inoculation site was then wrapped with parafilm tape.

Four plants were inoculated in 2 replicates.

As a control, 4 plants of the Cabernet Sauvignon variety were used in 2 replicates and were inoculated with fragments of sterile PDA medium.

Inoculated plants were watered as needed. Until the reading of the results, which was done 8 and 27 months after inoculation, the plants were stored in a greenhouse until the first higher outside temperatures, when they were taken outside.

Also, the appearance of necrosis on

навън. Също така се наблюдава появата на некроза върху стъблото на инокулираните растения при отстраняване на растенията от субстрата, отстраняване на кората от ствола с нож и измерване на дължината на тъканната некроза.

Изчисляването на интензивността на симптомите по леторастите е извършено въз основа на разликата в дължината на леторастите на инокулираните растения и дължината на леторастите на контролните растения.

Съществуват четиринадесет изолата на *Eutypa lata* с различен произход (Таблица 1), чиито патогенни, морфологични и молекулярни свойства са предварително изследвани и потвърдени.

the stem of inoculated plants was monitored by removing the plants from the substrate, removing the bark from the trunk with a knife and measuring the length of tissue necrosis.

The calculation of the intensity of symptoms on the shoots was performed on the basis of the difference in the length of the shoots on the inoculated plants and the length of the shoots on the control plants.

Fourteen isolates of *Eutypa lata* of different origins (Table 1), whose pathogenic, morphological and molecular properties have been previously examined and confirmed.

Таблица 1. Изолати избрани за допълнителни проучвания
Table 1. Isolates chosen for further studies

R.b.	Изолат Isolate	Окръг District	Местност Locality	Сорт Cultivar	Година на изолиране Year of isolation
1	EL17	Поморавски Pomoravski	Добричево, Чуприя Dobričevo, Čuprija	Каб. Совиньон Cabernet Sauvignon	2004.
2	EL27	Нишавски Nišavski	Прасковче, Ражан Praskovče, Ražanj	Ркацители Rkaciteli	2004.
3	EL29	Расински Rasinski	Кобиле, Крушевац Kobilje, Kruševac	Прокупац Prokupac	2005.
4	EL30	Поморавски Pomoravski	Дреновац, Парачин Drenovac, Paraćin	Рейнски ризлинг Rhein Riesling	2005.
5	EL150	Расински Rasinski	Тулеш, Александовац Tulež, Aleksandrovac	Burgundac crni	2006.

6	EL151	Расински Rasinski	Бела Вода, Крушевац Bela voda, Kruševac	Италиански ризлинг Italian Riesling	2006.
7	EL152	Расински Rasinski	Крвавица, Крушевац Krvavica, Kruševac	Бургундско червено Burgundac crni	2007.
8	EL153	Расински Rasinski	Сувая, Варварин Suvaja, Varvarin	Италиански ризлинг Italian Riesling	2007.
9	EL154	Южнобачки Južnobački	Сремски Карловци Sremski Karlovci	Совиньон Sauvignon	2008.
10	EL155	Южнобачки Južnobański	Гудурица, Вършац Gudurica, Vršac	Шардоне Chardonnay	2008.
11	EL156	Расински Rasinski	Трнавци, Александровац Trnavci, Aleksandrovac	Франковка Frankovka	2009.
12	EL157	Борски Borski	Карбулово, Неготин Karbulovo, Negotin	Шардоне Chardonnay	2009.
13	EL158	Нишавски Nišavski	Липовац, Ражан Lipovac, Ražanj	Кардинал Kardinal	2010.
14	EL199	Пчински Pčinjski	Стрезовче, Прешево Strezovce, Preševo	Италиански ризлинг Italian Riesling	2010.
15	8F	Верона, Италия Verona, Italy	Верона, Италия Verona, Italy	Непозната Nepoznata	1988.
16	BX1.10	Бордо, Франция Bordo, France	Бордо, Франция Bordo, France	Каб. Совиньон Cabernet Sauvignon	1990.

Сравнителните проучвания включват също 2 референтни изолата, получени от колекцията от фитопатогенни гъби на INRA (Institute National de la Recherche Agronomique, INRA, Франция).

Изолатите са с код 8F (изолиран от неизвестен сорт лоза във Верона, Италия) и BX1.10 (от лоза Каберне Совиньон в Бордо, Франция).

Статистически анализ

Comparative studies also included 2 reference isolates obtained from the collection of phytopathogenic fungi of INRA (Institute National de la Recherche Agronomique, INRA, France).

These isolates are coded 8F (isolated from an unknown grape variety in Verona, Italy) and BX1.10 (from Cabernet Sauvignon grapevine in Bordeaux, France).

Statistical analysis

Извършен е статистически анализ, за да се определи връзката между изолат на *E. lata* и сорта лоза. Данните са анализирани чрез вариационен анализ (ANOVA) с помощта на компютъризиран софтуер (PROC GLM, SAS, System, версия 8.1; SAS Institute, Cary, NC).

За да се удовлетворят предположенията на ANOVA, е използвана аркуссинус-трансформация на пропорцията ($Y=2x \arcsin \sqrt{p}$).

Хомогенността на групите е оценена с помощта на теста на Дънкан с $P=0.05$.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ РЕЗУЛТАТИ

Симптоми на заболяване по растенията на полето. Изследване на лозя в 14 места с лозови площи в Сърбия, в периода от 2004 до 2019г., показва симптоми на загиване на лозата.

Проби са взети от 14 обекта в Сърбия.

Те са взети през втората половина на май и началото на юни в лозя на възраст от 11 до 22 години.

При събиране на проби от болни растения на полето са взети части от лозови стъбла и кордони от прехода между болна и здрава тъкан с размери от 10 до 20 cm. Във всички изследвани места има растения със симптоми на еутипоза.

Във всички изследвани места са открити изолати на *E. lata*. Установено е, че при условията в Сърбия симптомите на заболяването по лозата са най-забележими по лоторастите през втората половина на месец май.

През вегетацията болните части на лозата се покриват с нова листна маса, така че симптомите се

Statistical analysis performed in order to determine the relationship between *E. lata* isolate and grapevine variety. Data were analyzed by variance analysis (ANOVA) using the computerized software (PROC GLM, SAS, System, version 8.1; SAS Institute, Cary, NC).

To satisfy the assumptions of the ANOVA, the arcsine transformation of the proportion was used ($Y=2x \arcsin \sqrt{p}$).

Homogeneity of groups was assessed using Duncan's test with $P=0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION RESULTS

Symptoms of disease on plants in the field. The examination of vineyards on 14 sites of grape growing areas in our country, in the period from 2004 to 2019, showed symptoms of grapevine dieback.

Samples were collected from 14 sites in Serbia.

Samples were collected in the second half of May and early June in vineyards aged 11 to 22 years.

During the collection of samples of diseased plants in the field, fragments of stem and cordon of grapevines were taken from the transition between diseased and healthy tissue, and were 10 to 20 cm in size.

There were plants with symptoms of euthyposis in all examined sites. Isolates of *E. lata* were found in all examined sites. It was found that, in the conditions in Serbia, the disease symptoms on grapevine are most noticeable on the shoots of plants in the second half of May. During the vegetation, the diseased parts of the grapevine are covered with new leaf mass, so that

забелязват по-трудно.

Симптомите по листата на болните растения се проявяват под формата на малки, хлоротични петна, разпределени по ръба на листата. Краищата на листата често са износени и огънати към гърба, а при тежки инфекции повърхността на листата е покрита предимно с некротични петна.

Централната част на листа има набръчкан вид. С течение на времето листата изсъхват и опахват преждевременно.

Избраните изолати са сравнени един с друг въз основа на морфологични и молекулярни свойства с цел правилна идентификация. Сравнението е извършено с определени изолати на *E. lata* с произход от Италия (8F) и Франция (BX 1.10).

Изследване на вирулентните свойства на изолати *Eutypa lata*.

Всички изследвани изолати показва различна степен на вирулентност и предизвикаха промени в инокулираната тъкан чрез два метода-инокулация на невкоренени и вкоренени резници от сорт Каберне Совиньон.

1. Инокулация на невкоренени лозови резници. Инокулацията на невкоренени лозови резници показва, че всички изследвани изолати показват симптоми, характерни за *E. lata* по леторастите. Не се наблюдават контролни симптоми върху контролните растения, които са инокулирани само със среда без мицел. Инокулацията на невкоренени резници се извършва във фаза на покой. Именно това даде възможност за едновременно развитие на леторастите на лозовото растение и мицела на

the symptoms are more difficult to notice. Symptoms on the leaves of diseased plants are manifested in the form of small, chlorotic spots, distributed along the edge of the leaves. The edges of the leaves are often worn and bent towards the back, and in severe infections the surface of the leaves is mostly covered with necrotic spots.

The central part of the leaf has a wrinkled appearance. Over time, the leaves dry out and fall off prematurely.

Selected isolates were compared with each other on the basis of morphological and molecular properties for the purpose of correct identification. The comparison was performed with determined isolates of *E. lata* originating from Italy (8F) and France (BX 1.10).

Study of virulent properties of *Eutypa lata* isolates.

All studied isolates showed different degrees of virulence and caused changes in inoculated tissue using two methods-inoculation of unrooted and rooted cuttings of Cabernet Sauvignon grapevine.

1. Inoculation of unrooted vine cuttings. Inoculation of unrooted grapevine cuttings revealed that all studied isolates produced symptoms characteristic of *E. lata* on shoots.

No control symptoms occurred on the control plants, which were inoculated only with medium without mycelium.

Inoculation of unrooted cuttings was performed in the dormant phase. Namely, this enabled the simultaneous development of the shoots of the grapevine plant and the mycelium of the fungus.

гъбата. През първите 5 до 8 седмици след инокулацията се появяват летораста с намален растеж, светлозелени на цвят с хлоротични и деформирани листа.

Симптоматичните листа са забележимо по-малки от нормалните, с извити краища към обратната страна и хлоротични и некротични зони по периметъра. По-късно некротичните зони се разпространяват по цялата повърхност на листата, след което изсъхват и окапват. При някои инокулирани резници листата изсъхват бързо и окапват, оставяйки само светлозелени скъсени летораста. Също така, съкратени летораста с хлоротични листа и нормално развити летораста с безсимптомни листа могат да се развият едновременно на едно и също растение.

Освен това по време на вегетацията симптомите продължават да се развиват по болните листа, листата се деформират, изсъхват и окапват, а безсимптоматичният летораст продължава да расте и да се развива нормално. Силата на симптомите върху инокулирани невкоренени резници от сорт Каберне Совиньон, изследвани изолата на *Eutypa lata*, както и два контролни изолата на *E. lata*, са показани в Таблица 2.

In the first 5 to 8 weeks after inoculation, shoots of reduced growth, light green in color with chlorotic and deformed leaves appear.

The symptomatic leaves are conspicuously smaller than normal, with curved edges towards the reverse and chlorotic and necrotic zones along the perimeter. Later, necrotic zones spread over the entire surface of the leaves, and then they dry out and fall off.

In some inoculated cuttings, the leaves dry out quickly and fall off, leaving only light green shortened shoots.

Also, shortened shoots with chlorotic leaves and normally developed shoots with leaves without symptoms can develop on the same plant at the same time.

Furthermore, during the vegetation, symptoms continue to develop on the diseased leaves, the leaves deform, dry and fall off, and the asymptomatic shoot continues to grow and develop normally.

The intensity of symptoms, on inoculated unrooted cuttings of Cabernet Sauvignon variety, tested isolates of *Eutypa lata*, as well as two control isolates of *E. lata*, are shown in Table 2.

Таблица 2. Брой болни листа (%) при оценка на вирулентността на инокулирани невкоренени резници от сорт Каберне Совиньон при изолата на *E. lata*

Table 2. Number of diseased leaves (%) when assessing the virulence on inoculated unrooted cuttings of Cabernet Sauvignon variety by the tested isolates of *E. lata*

Изолат Isolate	8 седмици след инокулация 8 weeks after inoculation		
	Средно Average	Минимално Minimum	Максимално Maximum
EL150	80.57	75.00	85.38

EL152	72.22	57.64	81.25
EL154	77.80	61.20	87.50
EL157	75.68	50.00	87.50
EL158	25.00	0.00	75.00
EL199	47.23	37.50	62.50
EL27	38.88	0.00	75.00
EL17	30.56	0.00	50.00
EL29	27.79	23.65	37.50
VL10	16.68	0.00	37.50
EL30	25.00	0.00	50.00
EL199	16.68	0.00	25.00
VL155	30.56	0.00	50.00
EL151	30.56	0.00	50.00
BX1.10	83.33	75.00	87.50
8F	80.56	72.25	87.50

Реакцията на изследваните изолати и силата на симптомите след инокулацията при сорт Каберне Совиньон са показани в Таблица 3.

The reaction of the tested isolates and the intensity of symptoms after inoculation on the Cabernet Sauvignon variety are shown in Table 3.

Таблица 3. Резултати от двуфакторен анализ на дисперсията на средните стойности на интензитета на симптомите 8 седмици след инокулацията с изследваните изолати на *E. lata*, използвайки теста за значимост на Дънкан $p=0.05$

Table 3. Results of a two-factor analysis of the variance of the mean values of symptom intensity 8 weeks after inoculation with the studied isolates of *E. lata*, Using Duncan's significance test $p=0.05$

Източник на вариране Variation source	Сума от квадратите Square sum	Свободни степени Degrees of freedom	Вариране Variance	F Коефициент Coefficient	<i>p</i> стойности values
Изолати / Isolates	50166.28	16	3135.393	8.608	0.000
Сорт / Variety	4922.034	1	4922.034	13.514	0.000
Изолати + Сорт Isolates + Variety	6853.861	16	4.366	1.176	0.303
Грешка / Error	31323.227	86	364.224		
Общо / Total	98234.221	110			

Получените резултати са обработени чрез двуфакторен дисперсионен анализ, използвайки тест за значимост на Дънкан 0.05, където единият фактор е

The obtained results were processed by two-factor analysis of variance, using Duncan's test of significance 0.05, where one factor was tested isolates and the other was

изследвани изолати, а другият е сорт лоза.

Чрез дисперсионен анализ (ANOVA) за значимост на установените разлики между изолатите, е получена *p* стойност от 0,000, което е по-малко от 0.05 и означава, че разликите са статистически значими (Таблица 3), т.е., че изолатите влияят силно на леторастите от сорт Каберне Совиньон.

Чрез съпоставяне по двойки на средните стойности на силата на симптомите при сорт Каберне Совиньон спрямо изследваните изолати се разграничават 4 хомогенни групи изолати, които се имат статистически значима разлика (Таблица 4).

Изолати 8F, BX1.10, EL150, EL152, EL157 и EL154, принадлежащи към четвъртата хомогенна група, показват статистически значима разлика в силата на симптомите при сорт Каберне Совиньон, което означава, че са най-вирулентни. Изолати EL30, EL199, EL158, EL153, EL29, EL17, EL155, EL151 са поставени в първата хомогенна група и не се отделиха ясно от втората хомогенна група, което означава, че не показват статистически значима разлика в силата на симптомите на сорт Каберне Совиньон.

Тези изолати се класифицират като по-малко патогенни.

grapevine variety.

Using the analysis of variance (ANOVA) for the significance of the identified differences between isolates, a *p* value of 0.000 was obtained, which is less than 0.05, which means that these differences are statistically significant (Table 3), i.e. that the isolates affect the intensity shoots of the Cabernet Sauvignon variety.

By pairwise comparison of the average values of the intensity of symptoms on the Cabernet Sauvignon variety in relation to the examined isolates, 4 homogeneous groups of isolates were distinguished, which were statistically significantly different (Table 4).

Isolates 8F, BX1.10, EL150, EL152, EL157 and EL154, belonging to the fourth homogeneous group, showed a statistically significant difference in the intensity of symptoms on the Cabernet Sauvignon variety, meaning they were the most virulent. Isolates EL30, EL199, EL158, EL153, EL29, EL17, EL155, EL151 were placed in the first homogeneous group and did not clearly separate from the second homogeneous group, which means that they do not show a statistically significant difference in symptom intensity on Cabernet Sauvignon varieties. These isolates are classified as less pathogenic.

Таблица 4. Хомогенни групи, получени чрез дисперсионен анализ на средните стойности за силата на симптомите върху сорт Каберне Совиньон след 8 седмици за тествани изолати на *E. lata*, Използван е тест за значимост на Дънкан $p=0.05$

Table 4. Homogeneous groups obtained by variance analysis of average values of symptom intensity on Cabernet Sauvignon variety after 8 weeks for tested isolates of *E. lata*, Using Duncan's test of significance $p=0.05$

Изолати Isolates	Хомогенни групи / Homogeneous groups			
	1	2	3	4

EL30	16.68ab	16.68ab		
EL199	16.68ab	16.68ab		
EL27	25.00ab	25.00ab		
EL153	25.00ab	25.00ab		
EL29	27.79ab	27.79ab		
EL17	30.56ab	30.56ab		
EL155	30.56ab	30.56ab		
EL151	30.56ab	30.56ab		
EL27		38.88ab		
EL156		47.23abc	47.23abc	
EL152			72.22acd	72.22acd
EL157				75.00bd
EL154				77.80ad
8F				80.56bd
EL150				80.57bd
BX1.10				83.33bd
p стойности/ values	0.052	0.054	0.063	0.468

* Данните в колоните, маркирани със същите букви, не се различават статистически значимо въз основа на тест на Дънкан $p=0.05$

* Data in columns marked with the same letters are not statistically significantly different based on Duncan's test $p=0.05$

Изолат EL27 беше поставен във втората хомогенна група и показва статистически значима разлика по отношение на други изолати от друга хомогенна група. Изолат EL156 не е ясно отделен от третата хомогенна група.

Докато изолат EL152 не показва значителна статистическа разлика от изолати от четвъртата хомогенна група (Таблица 4).

2. Инокулация на вкоренени резници. Инокулацията на вкоренени лозови резници в латентна фаза показва, че всички изследвани изолати на *Eutypa lata*, както и два контролни изолата на *E. lata*, са причинили появата на симптоми по леторастите с различна сила. Появи се и тъканна некроза около мястото на инокулацията. Реакцията на изследваните изолати и силата на

Isolate EL27 was placed in the second homogeneous group and showed a statistically significant difference in relation to other isolates from another homogeneous group. Isolate EL156 is not clearly separated from the third homogeneous group.

While isolate EL152 does not show a significant statistical difference from isolates of the fourth homogeneous group (Table 4).

2. Inoculation of rooted cuttings. Inoculation of rooted grapevine cuttings in the dormant phase indicates that all studied isolates of *Eutypa lata*, as well as two control isolates of *E. lata*, caused the appearance of symptoms on shoots of different intensity.

There was also tissue necrosis around the inoculation site.

The reaction of the tested isolates as well as the intensity of symptoms after

симптомите след инокулацията при сорт Каберне Совиньон са показани в Таблица 5.

inoculation on the Cabernet Sauvignon variety are shown in Table 5.

Таблица 5. Параметри, използвани при оценката на вирулентността на инокулирани вкоренени резници от сорт Каберне Совиньон върху тествани изолати на *E. lata*

Table 5. Parameters used in the assessment of virulence of inoculated rooted cuttings of Cabernet Sauvignon variety on the tested isolates of *E. lata*

Изолати Isolates	8 месеца 8 months	27 месеца 27 months	
	Разлика в дължината на латорасти на инокулирани и контролни растения Difference in length of shoots of inoculated and control plants (cm)	Разлика в дължината на латорасти на инокулирани и контролни растения Difference in length of shoots of inoculated and control plants (cm)	Дължина на некрозата Length of necrosis (mm)
EL150	3.50	39.26	33.63
EL152	6.53	23.81	32.63
EL154	5.74	39.26	31.50
EL157	6.48	24.41	34.13
EL158	1.86	15.18	29.88
EL156	2.30	22.74	29.25
EL27	3.00	10.18	26.00
EL17	2.88	6.46	21.75
EL29	2.31	19.08	25.88
EL30	0.63	18.73	24.63
EL153	0.00	14.83	25.75
EL199	0.00	9.82	28.38
EL155	1.56	21.75	26.00
EL151	2.19	9.50	29.38
8F	2.04	31.26	39.63
BX1.10	4.70	41.84	33.50
КонтролControl	0.00	0.00	0.00

Чрез дисперсионен анализ (ANOVA) за значимостта на установените разлики между изолатите, беше получена p стойност от 0.000, което е по-малко

By applying the analysis of variance (ANOVA) for the significance of the determined differences between isolates, a p value of 0.000 was obtained, which is less than 0.05,

от 0.05, следователно тези разлики са статистически значими, което означава, че изолатите показват различни нива на агресивност (Таблица 6).

therefore that these differences are statistically significant, which means that the isolates show different levels of aggressivity (Table 6).

Таблица 6. Хомогенни групи, получени чрез дисперсионен анализ на средните стойности, изчислени въз основа на разликата в дължината на латорастите на инокулирани и контролни растения от сорт Каберне Совиньон след 8 месеца за тествани изолати на *E. lata*, с тест за значимост на Дънкан $p=0.05$

Table 6. Homogeneous groups obtained by analysis of variance of average values calculated based on the difference in shoot length of inoculated and control plants of Cabernet Sauvignon variety after 8 months for tested isolates of *E. lata*, using Duncan's significance test $p=0.05$

Изолати Isolates	Хомогенни групи / Homogeneous groups (разлика в дължината на лоторасти на инокулирани и контролни растения след 8 месеца) difference in shoot length of inoculated and control plants after 8 months)	
	1	2
EL153	0.00c	
EL199	0.00c	
EL30	0.00c	
EL155	1.56bc	
EL158	1.86abc	
8F	2.04abc	
EL151	2.19abc	
EL156	2.30abc	
EL29	2.31abc	
EL17	2.88abc	
EL27	3.00abc	
EL150	3.50abc	
BX1.10	4.70abc	
EL154	5.74ab	
EL150	6.48a	6.48a
EL152		6.53a
p стойности / values	0.085	0.078

* Данните в колоните, маркирани със същите букви, не се различават статистически значимо въз основа на тест на Дънкан $p=0.05$.

* Data in columns marked with the same letters are not statistically significantly different based on Duncan's test $p = 0.05$.

Чрез сравняване по двойки на резултатите от силата на симптомите при сорт Каберне Совиньон при инокулация с изследваните изолати на *Eutypa lata* след 8 месеца от инокулацията, използвайки стойността p , (Таблица 6), може да се отбележи ясно разграничаване на 2 хомогенни групи. Първата хомогенна група включва повечето от изследваните изолати.

Изолати EL30, EL153 и EL199 показват статистически значима по-слаба сила на симптомите при сорт Каберне Совиньон.

По-точно, те не причиняват симптоми при инокулирани растения. Във втората група, изолат EL152 ясно се откроява и се оказва най-вирулентен.

След това, изолати EL157, EL154, BX1.0 показват сила на симптомите със статистическа значимост, което ги определя като група от патогенни изолати. Също така, чрез сравняване по двойки на средните стойности на разликите в дължината на леторастите на инокулирани и контролни растения след 27-ия месец, са разграничени 3 хомогенни групи (Таблица 7). Чрез анализиране на p стойностите може да се забележи, че има значителна статистическа разлика между хомогенните групи. Изолати EL150, EL154, 8F и EL158 показват по-слаба сила на симптомите със статистическа значимост при сорт Каберне Совиньон.

Изолат BX1.10 се откроява от останалите изолати от третата хомогенна група, което означава, че е по-вирулентен от останалите.

Изолат EL17 причинява по-слаба сила на симптомите със статистическа важност при сорт

By pairwise comparison of the results of the symptoms intensity on Cabernet Sauvignon variety on inoculation with the studied isolates of *Eutypa lata* after 8 months from inoculation, using the p value, (Table 6), a clear distinguishing of 2 homogeneous groups can be noted.

The first homogeneous group includes most of the tested isolates.

Isolates EL30, EL153 and EL199 showed a statistically significantly lower intensity of symptoms on the Cabernet Sauvignon variety. More precisely, they did not cause symptoms on inoculated plants. In the second group, isolate EL152 clearly stood out and proved to be the most virulent.

Then, isolates EL157, EL154, BX1.10 showed a statistically significant intensity of symptoms, which classifies them as a group of pathogenic isolates. Also, by pairwise comparison of the average values of differences in the length of shoots of inoculated and control plants after 27 months, 3 homogeneous groups were distinguished (Table 7).

By analyzing p values, it can be seen that there is a significant statistical difference between homogeneous groups.

Isolates EL150, EL154, 8F, EL158, EL152 showed a statistically significant difference in the intensity of symptoms on the Cabernet Sauvignon variety.

Isolate BX1.10 stands out from other isolates from the third homogeneous group, which means that it is more virulent than the others.

Isolate EL17 caused a statistically significantly lower intensity of symptoms on the Cabernet

Каберне Совиньон, което го класифицира като по-малко патогенен изолат (Таблица 7).

Sauvignon variety, which classifies it as less pathogenic isolates (Table 7).

Таблица 7. Хомогенни групи, получени чрез дисперсионен анализ на средните стойности, изчислени въз основа на разликата в дължината на латорастите на инокулирани и контролни растения от сорт Каберне Совиньон след 27 месеца за тествани изолати на *E. lata*, с използва тест за значимост на Дънкан $p=0.05$

Table 7. Homogeneous groups obtained by analysis of variance of average values calculated based on the difference in shoot length of inoculated and control plants of Cabernet Sauvignon variety after 27 months for tested isolates of *E. lata*, using Duncan's significance test $p=0.05$

Изолати Isolates	Хомогенни групи / Homogeneous groups (разлика в дължината на латораста на инокулирани и контролни растения след 27 месеца) Homogeneous groups (difference in shoot length of inoculated and control plants after 27 months)		
	1	2	3
EL17	6.64b	6.64b	
EL151	9.50b	9.50b	9.50b
EL199	9.82b	9.82b	9.82b
EL27	10.18b	10.18b	10.18b
EL153	14.83ab	14.83ab	14.83ab
EL158	15.18ab	15.18ab	15.18ab
EL30	18.73ab	18.73ab	18.73ab
EL29	19.08ab	19.08ab	19.08ab
EL155	21.75ab	21.75ab	21.75ab
EL156	22.74ab	22.74ab	22.74ab
EL152	23.81ab	23.81ab	23.81ab
EL157	24.41ab	24.41ab	24.41ab
8F	31.26ab	31.26ab	39.63ab
EL154		39.26a	39.26a
EL150		39.26a	39.26a
BX1.10			41.84a
p values	0.067	0.056	0.059

* Данните в колоните, маркирани със същите букви, не се различават статистически значимо въз основа на тест на Дънкан $p=0.05$.

* Data in columns marked with the same letters are not statistically significantly different based on Duncan's test $p=0.05$.

Сравняването по двойки на средните стойности на дължината на некрозата на изследваните изолати на *E. lata* показва

Pair comparisons of average values of necrosis length of examined isolates of *E. lata* showed the isolation of 3 homogeneous groups of isolates

изолирането на 3 хомогенни групи
изолати, които имат статистически
значима разлика (Таблица 8).

that were statistically significantly
different (Table 8).

Таблица 8. Разлики в патогенността между изследваните изолати на *Eutypa lata* въз основа на средната стойност на дължината на некрозата (mm), с тест за значимост на Дънкан $p=0.05$

Table 8. Differences in pathogenicity between the studied *Eutypa lata* isolates based on the average value of length of necrosis (mm), using Duncan's significance test $p=0.05$

Изолати Isolates	Хомогенни групи / Homogeneous groups (дължина на некроза/mm necrosis length/mm)		
	1	2	3
EL17	21.75bc	21.75bc	
EL30	24.63ab	24.63ab	
EL153	25.75ab	27.75ab	
EL29	25.88	25.88	
EL27	26.00ab	26.00ab	
EL155	26.00ab	26.00ab	
VL75	28.38ab	28.38ab	
EL199	29.25ab	29.25ab	
EL151	29.38ab	29.38ab	
EL158	29.88ab	29.88ab	29.88ab
EL154	31.50a	31.50a	31.50a
EL152		32.63a	32.63a
BX1.10		33.50a	33.50a
EL150		33.63a	33.63a
EL157		34.13a	34.13a
8F			39.63a
p стойности values	0.068	0.081	0.058

* Данните в колоните, маркирани със същите букви, не се различават статистически значимо въз основа на тест на Дънкан $p=0.05$.

* Data in columns marked with the same letters are not statistically significantly different based on Duncan's test $p=0.05$.

Изолати EL17, EL30, EL153, EL29 предизвикват намаляване на дължина на некрозата със статистически значима разлика.

Докато изолати BX1.10, EL157, EL150, EL152, 8F показват статистически значително по-голяма дължина на некрозата, което ги

Isolates EL17, EL30, EL153, EL29 caused a statistically significantly shorter length of necrosis.

While isolate BX1.10, EL157, EL150, EL152, 8F showed statistically significantly longer necrosis length, which makes them the most virulent

прави най-вирулентни (Таблица 8).

Разликата в дължината на латорастите на инокулирани и контролни растения от сорт Каберне Совиньон, след 8-и и 27-и месец, и дължината на некрозата около мястото на инокулация, като отделни критерии за оценка на патогенността на изследваните изолати *E. lata*, не може напълно да подкрепи всички по-рано наблюдавани групи от изследвани изолати, както е показано в Таблицы 5, 6, 7 и 8. А именно, изолати, които не показват симптоми по листата и латорастите 8 месеца след инокулацията, имат статистически значима дължина на некрозата около мястото на инокулация след 27-ия месец и по този начин са класифицирани като вирулентни изолати.

Сравнявайки резултатите след осмия и двадесет и седмия месец от инокулацията, се забелязва, че силата на симптомите за сорт Каберне Совиньон при изследваните изолати е статистически значимо по-ниска след 8-ия месеца, отколкото след 27-ия месец. Всичко това показва, че някои изолати, като EL30, EL153 и EL199, се нуждаят от повече време, за да се появят първите симптоми по латорастите. Всички изследвани изолати причиняват тъканна некроза около мястото на инокулация (Таблица 8).

Също така се установи, че появата на симптоми върху латорастите няма връзка с появата на тъканна некроза около мястото на инокулация. Например, изолат EL158, от 8 инокулирани растения след 8-ия месеца, причинява симптоми по латорастите само на 1 инокулирано растение и след 27-ия месеца при 2 инокулирани растения.

isolates (Table 8).

It can be noticed that the difference in shoot length of inoculated and control plants of Cabernet Sauvignon variety, after 8 and 27 months, and the length of necrosis around the inoculation site, as separate criteria for assessing the pathogenicity of tested isolates *E. lata*, cannot fully support all previously observed groupings of tested isolates, as shown in Tables 5, 6, 7 and 8.

Namely, isolates that did not show symptoms on leaves and shoots 8 months after inoculation caused statistically significant necrosis lengths around the inoculation site after 27 months and thus were classified as virulent isolates.

Comparing the results after the eighth and twenty-seventh month from inoculation, it is noticed that the intensity of symptoms on the Cabernet Sauvignon variety on the examined isolates was statistically significantly lower after 8 months, than after 27 months.

All this indicates that certain isolates, such as EL30, EL153 and EL199, need more time for the first symptoms to appear on the shoots.

All examined isolates caused tissue necrosis around the inoculation site (Table 8).

Also, it was noticed that the appearance of symptoms on the shoots is not in correlation with the appearance of tissue necrosis around the inoculation site. For example, isolate EL158, of 8 inoculated plants after 8 months, caused symptoms on the shoots of only 1 inoculated plant, and after 27 months on 2 inoculated plants.

Въпреки това, 27 месеца след инокулацията, той причинява статистически значимо по-висока некроза около мястото на инокулация, което го класифицира като вирулентен.

Също така, изолати EL30, EL153 и EL199 не причиняват симптоми по леторастите 8 месеца след инокулацията, но се забелязва, че дължината на некротичната тъкан около мястото на инокулация след 27 месеца е статистически значимо по-голямо, което ги класифицира като патогенни (Таблицы 6, 7, 8). Не се появяват симптоми върху резници, които служат като отрицателна контрола, инокулирана със стерилна PDA среда.

Въз основа на посочените по-горе резултати може да се направи заключение, че всеки от методите за оценка на вирулентността на различни изолати *E. lata* според сорт Каберне Совиньон е еднакво надежден за изследване на вирулентността. А именно, предимството на метода на инокулация на невкоренени резници е, че за залагане на опита се използват резници от едногодишни лозови летораста в покой. Това означава, че върху инокулираните резници едновременно се развиват леторастите и мицела на гъбичките, така че симптомите се появяват върху леторастите след 5 до 10 седмици.

Това е много важно за сравнително бързо тестване за кратко време на вирулентността на голям брой изолати на гъбички *E. lata*. Тестът е сравнително лесен за правене и тест-наборът не заема много място.

Вторият метод на инокулация на вкоренени резници е по-взискателен, тъй като се използват

However, 27 months after inoculation, it causes statistically significantly higher necrosis around the inoculation site, which classifies it as virulent isolates.

Also, isolates EL30, EL153 and EL199, do not cause symptoms on shoots 8 months after inoculation, but it was observed that the length of necrotic tissue around the inoculation site after 27 months is statistically significantly longer, which classifies them as pathogenic isolates (Table 6, 7, 8).

No symptoms appeared on cuttings that served as a negative control inoculated with sterile PDA medium.

Based on the previously mentioned results, it can be concluded that each of the methods for assessing the virulence of different isolates *E. lata* according to the Cabernet Sauvignon variety, are equally reliable for testing the virulence.

Namely, the advantage of the method of inoculation of unrooted cuttings is that the cuttings of one-year-old vine shoots in the dormant phase are used for setting the experiment. This means that on inoculated cuttings, shoots and mycelium of the fungus develop at the same time, so that symptoms appear on shoots in 5 to 10 weeks.

This is very important for relatively fast testing of virulence of a large number of isolates of the fungus *E. lata* for a short time.

The test is relatively easy to set up and the set test does not take up much space.

The second method of inoculation of rooted cuttings is more demanding because one-year-old

едногодишни вкоренени растения и изисква много повече място и време за извършване от първия метод.

ДИСКУСИЯ

Симптоми на загиване на лозите.

По време на многогодишен период (2004-2019г.) на наблюдение в лозя на 14 обекта и на отделни лозя в задните дворове в Сърбия се установи, че гъбички *E. lata* причинява симптоми по летораста с дължина от 25 до 50 cm.

По-късно, с напредване на болестта, симптомите се разпространяват върху ствола и клоните на болните растения. Това е доказано чрез изолиране на патогени, а след това и чрез изкуствени инокулации върху резниците на голям брой лозови сортове. По време на споменатия период на наблюдение е установено наличие на симптоми, причинени от *E. lata* по съцветия и плодове на лозата в насаждения от 14 обекта в Сърбия.

Симптомите по леторастите могат да се наблюдават, когато те имат 3 или 4 междувъзлия.

Симптомите са много трудни за забелязване и откриване по-късно, по време на вегетацията, тъй като болните листа са покрити със здрави летораста и листа. Болните листа спират да растат, хлоротични са и се огъват назад.

Междувъзлията са скъсени и често са зигзагообразни, а гроздовете са слабо развити и оскъдни (Munkvold et al., 1993).

Рак по дървесината се причинява от растежа на здрава тъкан на мястото, където се застъпва здравата и болна тъкан, той е кафяв на цвят и обикновено е покрит с дървесна кора. Лозата

rooted plants are used and it requires much more space and time to be performed than the first method

DISCUSSION

Symptoms of grapevine dieback in vineyards.

During a multi-year period (2004-2019) of monitoring in vineyards in 14 sites and on individual vines around the backyards in Serbia, it was found that the fungus *E. lata* causes symptoms on shoots 25 to 50 cm long.

Later, as the disease progresses, the symptoms spread on trunk and branches of diseased plants. This has been proven by the isolation of pathogens, and then by artificial inoculations on the cuttings of a large number of grapevine varieties.

During the mentioned monitoring period, the presence of symptoms caused by *E. lata* on grapevine inflorescences and berries was found in vineyards in 14 sites in Serbia.

Symptoms on shoots can be observed when the shoots have 3 or 4 internodes.

The symptoms are very difficult to notice and detect later, during the vegetation, because the diseased leaves are covered with healthy shoots and leaves. Diseased leaves stop growing, are chlorotic and bend backwards.

The internodes are shortened and are often zigzagged, and the clusters are poorly developed and sparse (Munkvold et al., 1993).

Wound cancers are caused by the growth of healthy tissue at the junction of healthy and diseased tissue, they are brown in color and are usually covered with tree bark.

The grapevine dies when the necrosis

умира, когато некрозата се разпространи по целия ствол (Péros and Berger, 1994; Sosonowski et al., 2007a, b; Gramaje et al., 2018; Hrycan et al., 2020).

Симптомите по леторастите на лозата могат да показват наличието на тази гъбичка в стъблата и стволите или клоните на лозата, като с напредването на болестта симптомите се разпространяват в цялото растение.

Растежът на гъбичките по ствола е бавен, 10-20 cm годишно, поради което след заразяване симптомите на загиване на тревистите органи не се проявяват през първите 2 до 3 вегетационни сезона (Munkvold et al., 1993).

Първите симптоми се забелязват едва на третата или четвъртата година след заразяването.

Толкова дълъг инкубационен период на гъбичките в ствола и клоните прави заболяването "коварно", а поради бавното развитие на болестта икономическите загуби се проявяват в лозя на възраст над осем години.

По същия начин, гъбичките не заразяват лоза по-млада от 5 години и симптомите рядко се наблюдават при лози по-млади от 8 години (Gubler et al., 2005; Travadon, 2013; Mondello et al., 2017; Gramaje et al., 2018г.).

Тъканната некроза се разпространява циркулярно във времето, покривайки все по-голяма част от напречното сечение, като в същото време се разпространява нагоре и надолу по ствола, като достига до кореновата шийка.

Изсъхването на клони, лози и летораста, в резултат на напредъка на болестта, се наблюдава най-добре през зимата (Munkvold et al., 1993).

spreads to the entire trunk (Péros and Berger, 1994; Sosonowski et al., 2007a, b; Gramaje et al., 2018; Hrycan et al., 2020).

Symptoms on grapevine shoots may indicate the presence of this fungus in the stems and trunks or branches of the vine, and as the disease progresses, the symptoms spread to the entire plant.

The growth of the fungus in the trunk is slow, 10-20 cm per year, which is why after infection, the symptoms of dieback on herbaceous organs do not appear in the first 2 to 3 vegetation seasons (Munkvold et al., 1993).

First symptoms are noticed only in the third or fourth year after the infection.

Such a long incubation period of the fungus in the trunk and branches makes this disease "insidious", and due to the slow development of the disease, economic losses are manifested in vineyards older than eight years.

Likewise, the fungus does not infect a new vine younger than 5 years, and symptoms are rarely seen on grapevines younger than 8 years (Gubler et al., 2005; Travadon, 2013; Mondello et al., 2017; Gramaje et al., 2018).

Tissue necrosis spreads circularly over time, covering an increasing part of the cross-section, and at the same time it spreads along the trunk, up and down and reaches the root neck.

Drying of the branches, vines and shoots, which occurs as a consequence of disease progression, is best observed during the winter (Munkvold et al., 1993).

Разрезите, направени при редовна пролетна резитба, са места, през които патогенът може да проникне и да причини зараза (Sosnowski et al., 2007b). Често от такива заразени части на лозата се развиват леторасты, върху които се появяват симптоми през следващата година под формата на скъсени междувъзлия, често без листа (Gubler et al., 2005; Mondello et al., 2017; Cardot et al., 2019).

Загиването на лозата принадлежи към групата от болести, които могат значително да понижат качеството на гроздето. Грозде от болни лози, не може да се използва за производство на вино. Видими симптоми на това заболяване по лозата могат да се забележат върху издънки с дължина от 25 до 50 cm.

Вследствие на отделяните от токсини от тези гъбички могат да се появят симптоми под формата на некроза по ръба на листата, намален растеж и хлороза по листата. Краищата на листата често са износени и се огъват към гърба.

При тежки инфекции повърхността на листата е покрита предимно с некротични петна.

Централната част на листната плоча има набръчкан вид, а заразените листа изсъхват и окапват преждевременно.

Леторасты са скъсени поради забавения растеж, светлозелени на цвят, често със зигзагообразни междувъзлия. Появата на симптомите и описанието на загиването на лозата в Сърбия са в съответствие с описаните в литературата. Всички търговски сортове лози са податливи на това заболяване (Sosnowski et al., 2007 b; Živković et al., 2012a, b). През последните години в Сърбия редовно се наблюдава загиване на

Sections made by regular spring pruning represent places through which the pathogen can penetrate and achieve infection (Sosnowski et al., 2007b). Often from such infected parts of the vine shoots develop, on which symptoms appear in the following year in the form of shortened internodes, often without leaves (Gubler et al., 2005; Mondello et al., 2017; Cardot et al., 2019).

The grapevine dieback belongs to the group of plant diseases that can significantly reduce the quality of grapes. Grapes that come from diseased vines cannot be used to make wine. Visible symptoms of this disease on grapevine can be seen on shoots 25 to 50 cm long.

As a consequence of the toxins secreted by this fungus, symptoms can appear on the leaves in the form of necrosis along the edge of the leaf, reduced growth and chlorosis of the leaves.

The edges of the leaves are often worn and bent towards the back. In severe infections the surface of the leaves is mostly covered with necrotic spots. The central part of the leaf blade has a wrinkled appearance, and the infected leaves dry out and fall off prematurely.

The shoots are shortened due to slow growth, light green in color, often with zigzag internodes.

The appearance of symptoms and the description of grapevine dieback in Serbia are in accordance with those described in the literature.

All commercial grapevine varieties are susceptible to this disease (Sosnowski et al., 2007 b; Živković et al., 2012a, b). In recent years, in our country, the dieback of grapevine has regularly occurred in our vineyards and caus

лозята в лозята, което причинява сериозни икономически загуби (Živković et al., 2012a, b).

Вирулентност на изолати на *Eutypa lata*.

Вирулентността на изследваните изолати на *Eutypa lata* е проверена чрез прилагане на 2 метода, които се оказаха еднакво успешни: чрез инокулация на невкоренени лозови резници и чрез инокулация на вкоренени лозови резници. Всички 14 изследвани изолата са причинили типични симптоми на загиване на инокулираните лозови резници от сорт Каберне Совиньон. След инокулиране на невкоренени резници в оранжерийни условия в латентна фаза, симптомите се появяват 8 седмици след инокулация. Що се отнася до листата, при инокулирани растения се наблюдават симптоми под формата на закънели, хлоротични листа с извити ръбове към гърба и хлоротични и некротични петна по краищата им, които по-късно се разпространяват по цялата повърхност и след това причиняват изсъхване и окапането им.

Леторастите са значително скъсени поради бавния растеж, имат светлозелен цвят и зигзагообразен вид на междувъзлията.

Симптомите по леторастите, които се появяват в оранжерийни условия, описани в настоящата статия, са подобни на тези в естествена среда. Според литературата, некрозата на листата, появяваща се върху инокулирани резници, е еднаква с некрозата на листата, причинена от филтрат на гъбична култура или еутипинов токсин, получен чрез екстракция от листата на заразени лозови

serious economic losses (Živković et al., 2012a, b)

Virulence of *Eutypa lata* isolates.

Virulence of the studied isolates of *Eutypa lata* it was verified by applying 2 methods, which proved to be equally successful: by inoculation of unrooted vine cuttings, and by inoculation of rooted vine cuttings.

All 14 studied isolates caused typical symptoms of dieback in inoculated grapevine cuttings of Cabernet Sauvignon variety.

After inoculation of unrooted cuttings in greenhouse conditions in the dormant phase, symptoms appeared 8 weeks after inoculation.

Considering leaves, symptoms were observed on inoculated plants in the form of stunted, chlorotic leaves with curved edges towards the back and chlorotic and necrotic spots along their edges, which later spread over the entire surface and then cause the leaves to dry out and fall off.

The shoots are significantly shortened due to the slow growth, they have a light green color and the so-called zigzag appearance of internodes.

The symptoms on shoots that appeared in greenhouse conditions in this paper are similar to the symptoms on grapevine in nature.

According to the literature, leaf necrosis appearing on inoculated cuttings is identical to leaf necrosis caused by fungal culture filtrate or eutipine toxin obtained by extraction from the leaves of infected vine plants from vineyards (Tey-Rulh et al., 1991, loc. Cit. Péros and Berger, 1994).

растения от лозята (Tey-Rulh et al., 1991, loc. Cit. Péros and Berger Перос и Бергер, 1994). Появата на симптоми по листата е следствие от токсични продукти, които се придвижват от мястото на инокулация към растящите летораста (Travadon et al., 2013). Ramos et al. (1975) и Carter et al. (1985) изследват разликите в агресивността на изолати на *E. lata* върху круша, кайсия и бадем, а Péros и Berger (1994), Sosnowski et al. (2007a, b), Trouillas and Gubler (2010), Moisy et al. (2017) ги изследва по лозата. Ramos et al. (1975) и Carter et al. (1985) изследват патогенността на 50 изолата на *E. lata*, изолирани от круша, лоза и бадем, чрез инокулация на клони на круша (1 сорт), кайсия (4 сорта) и бадем (6 сорта). Първото отчитане на резултати е извършено след 4, а второто след 28 месеца.

Тези автори установяват, че изследваните изолати показват различна степен на агресивност спрямо изследваните сортове круша, кайсия и бадем. Те също така констатираат, че е необходимо различен период, за да се появи некроза около мястото на инокулация.

Така некротична тъкан около мястото на инокулация се появява при кайсия и бадем от 4 до 6 месеца след инокулацията, а при лозата са необходими 2 години, за да се появи некроза около мястото на инокулация (Carter et al., 1985; Carter, 1994).

Подобни резултати са получени от Péros и Berger (1994), Sosnowski et al. (2007a, b), Trouillas and Gubler (2010) и Moisy et al. (2017), които изследват агресивността на множество изолати на *E. lata* по лозите.

The appearance of symptoms on the leaves occurs as a consequence of toxic products that move from the inoculation site to the growing shoots (Travadon et al., 2013).

Ramos et al. (1975) and Carter et al., (1985) studied the differences in the aggressiveness of *E. lata* isolates on pear, apricot and almond, and Péros and Berger (1994), Sosnowski et al. (2007a, b); Trouillas and Gubler (2010), Moisy et al. (2017) studied them on grapevine. Ramos et al. (1975) and Carter et al. (1985) examined the pathogenicity of 50 isolates of *E. lata* isolated from pear, grapevine and almond, by inoculation of branches on pear (1 variety), apricot (4 varieties) and almond (6 varieties).

The first reading of the results was performed after 4, and the second after 28 months.

These authors found that the examined isolates show different degrees of aggressivity towards the tested varieties of pear, apricot and almond. They also found that it takes different time for necrosis to appear around the inoculation site.

Thus, necrotic tissue around the inoculation site appears on apricot and almond 4 to 6 months after inoculation, and on grapevine it takes 2 years for necrosis to occur around the inoculation site (Carter et al., 1985; Carter, 1994).

Similar results were obtained by Péros and Berger (1994), Sosnowski et al. (2007a, b), Trouillas and Gubler (2010) and Moisy et al. (2017) testing the aggressiveness of multiple *E. lata* isolates on grapevines.

Периодът, необходим за развитие на симптомите в настоящата статия, съответства на резултатите от изследване за патогенност на изолати на *E. lata*, цитирани от Péros and Berger (1994), Sosnowski et al. (2007a).

В настоящия експеримент, въз основа на появата на симптоми по листата и латорастите, в допълнение към референтния изолат 8F, най-вирулентни се оказват изолати EL150, BX1.10, EL154, EL157, EL152, EL156. Изолати EL30, EL199 се оказват по-малко вирулентни.

В изследването на Péros и Berger (1994) те заявяват, че симптомите върху латорастите се появяват 8 седмици след инокулацията в първия вегетационен цикъл. Второто отчитане на появата на симптомите е извършено 8 седмици след растежа на лозовите латораста във втория вегетационен цикъл. Тези автори установяват, че интензивността на симптомите върху латорастите зависи от изолата на *E. lata*. А именно, в експеримента на Péros и Berger (1994) от 12 изследвани изолати на *E. lata*, произхождащи от лоза и кайсия.

При сорта Каберне совиньон осем изолата предизвикаха по-висок процент поява на симптоми по латорастите, а четири изолата не предизвикаха никакви симптоми.

Изолат BX1.10 е причинил появата на симптоми при повечето от тестваните лозови резници (Péros and Berger, 1994).

Изследваните изолати показват различна способност да произвеждат еутипинови токсини и да колонизират дървесната тъкан.

Вероятно тези два компонента са свързани, защото

The time required for symptom development in this paper corresponds to the results of pathogenicity testing of *E. lata* isolates, cited by Péros and Berger (1994), Sosnowski et al. (2007a).

In our experiment, based on the appearance of symptoms on leaves and shoots, in addition to the reference isolate 8F, isolates EL150, BX1.10, EL154, EL157, EL152, EL156 proved to be the most virulent. Isolates EL30, EL199 proved to be less virulent.

In the study of Péros and Berger (1994), they state that symptoms on shoots appeared 8 weeks after inoculation in the first vegetation cycle.

The second reading of the occurrence of symptoms was performed 8 weeks after the growth of grapevine shoots in the second vegetation cycle.

These authors found that the intensity of symptoms on shoots depends on the isolate of *E. lata*.

Namely, in the experiment of Péros and Berger (1994) out of 12 examined isolates of *E. lata* originating from grapevine and apricot.

Eight isolates caused the appearance of symptoms on shoots in higher percentage on the variety Cabernet Sauvignon, and four isolates did not cause any symptoms.

Isolate BX1.10 caused the appearance of symptoms on most of the tested grapevine cuttings (Péros and Berger, 1994).

The tested isolates exhibit different ability to produce eutipine toxins and colonizing wood tissue.

Probably these two components are related because toxins can aid

токсините могат да подпомогнат колонизацията, а по-голямо количество гъбична маса може да синтезира огромно количество токсини (Péros and Berger, 1994; Camps et al., 2010; Travadon et al., 2013; Moisy et al., 2017г.).

В експериментите на Sosnowski et al. (2007a) симптомите се появяват след 8 месеца. От 28-те изолата на *E. lata*, 24 изолата предизвикват появата на симптоми върху леторастите на сорт Grenache, а 4 изолата предизвикват появата на симптоми при повече от 50% от инокулираните растения от този сорт. Sosnowski et al. (2007a) провеждат втора оценка на появата на симптомите след 20 месеца.

Двадесет и четири месеца след експеримента е измерена дължината на некротичната част на тъканта под и над мястото на инокулация. Според Sosnowski et al. (2007a) има значителни разлики между изолати, които се проявяват в интензитета на симптомите върху леторастите и дължината на некротичната част на тъканта над и под мястото на инокулация.

След анализ на получените резултати, Sosnowski et al. (2007a) правят заключение, че няма връзка между появата на симптоми върху леторастите и появата на тъканна некроза около мястото на инокулация.

Например, 8 месеца след инокулацията при сорт Grenache, не всички изолати предизвикват симптоми по леторастите, докато след 24 месеца всички изследвани изолати причиняват некроза на част от тъканта около мястото на инокулация (Sosnowski et al., 2007a).

В настоящото изследване, чрез прилагане на втория метод, чрез инокулация на вкоренени лозови резници, след 8 месеца от

colonization, and a larger amount of fungal mass can synthesize a huge amount of toxins (Péros and Berger, 1994; Camps et al., 2010; Travadon et al., 2013; Moisy et al., 2017).

In the experiments of Sosnowski et al. (2007a) symptoms reproduced after 8 months. Of the 28 isolates of *E. lata*, 24 isolates caused the appearance of symptoms on shoots of the variety Grenache, and 4 isolates caused the appearance of symptoms on more than 50% of inoculated plants of this variety. Sosnowski et al. (2007a) conducted second assessment of the occurrence of symptoms after 20 months.

Twenty-four months after the experiment, the length of the necrotic part of the tissue below and above the inoculation site was measured.

According to Sosnowski et al. (2007a) there are significant differences between isolates, which are manifested in the intensity of symptoms on the shoots and the length of the necrotic part of the tissue above and below the inoculation site.

After analyzing the results obtained, Sosnowski et al. (2007a) concluded that there is no relationship between the appearance of symptoms on the shoots and the appearance of tissue necrosis around the inoculation site.

For example, 8 months after inoculation on the Grenache variety, not all isolates caused symptoms on shoots, while after 24 months, all studied isolates caused necrosis of part of the tissue around the inoculation site (Sosnowski et al., 2007a).

In this work, by applying the second method, by inoculation of rooted grapevine cuttings, after 8 months from inoculation, not all

инокулацията, не всички изолати са предизвикали симптоми по леторастите. Въпреки това, 27 месеца след инокулацията, всички изследвани изолати на *E. lata* предизвикват появата на вече описаните симптоми върху леторастите на инокулирани лозови растения от сорт Каберне Совиньон.

Установено е също, че всички изследвани изолати причиняват появата на некроза на част от тъканта над и под мястото на инокулацията 27 месеца след инокулацията. Най-малката по дължина некротична част от тъканта на лозовите растения е причинена от изолати EL17, EL30, EL153, EL154, EL29 и EL155, а най-голямата площ на некроза на тъкан около мястото на инокулация е получена от изолат EL157, BX1.10, EL152, EL154 и EL158.

В настоящия експеримент първите симптоми по леторастите се появяват 8 месеца след инокулацията на лозови растения от сорт Каберне Совиньон, което е в съответствие с твърденията на Sosnowski et al. (2007a и b), Camps et al. (2010) и Cordt et al. (2019).

Въпреки това, второто отчитане е извършено 7 месеца по-късно във връзка с експеримент, поставен от Sosnowski et al. (2007a).

А именно, в настоящето изследване не се появиха никакви симптоми по леторастите 20 месеца след инокулацията. Това явление може да се обясни според Sosnowski et al. (2007a, b) чрез наличието на връзка между силата на симптомите на инокулираните лозови растения и произхода на изолатите (Camps et al., 2010). А именно произходът на изолата може да повлияе на степента на агресивността му.

Например, изолати от лози в

isolates caused symptoms on shoots.

However, after 27 months of inoculation, all studied isolates of *E. lata* caused the appearance of the already described symptoms on shoots of inoculated grapevine plants of the Cabernet Sauvignon variety.

It was also found that all studied isolates cause the appearance of necrosis of a part of the tissue above and below the inoculation site after 27 months from inoculation.

The smallest length of necrotic part of tissue on vine plants was caused by isolates EL17, EL30, EL153, EL154, EL29 and EL155 and the largest area of necrosis of tissue around the inoculation site was produced by isolate EL157, BX1.10, EL152, EL154 and EL158.

In this experiment, the first symptoms on shoots appeared 8 months after inoculation of grapevine plants of the Cabernet Sauvignon variety, which is in agreement with the statements of Sosnowski et al. (2007a and b), Camps et al. (2010) and Cordt et al. (2019).

However, the second reading was performed 7 months later in relation to the experiment set up by Sosnowski et al. (2007a).

Namely, in our examination, no symptoms appeared on the shoots 20 months after inoculation.

This phenomenon can be explained according to Sosnowski et al. (2007a, b) by the existence of a correlation between the intensity of symptoms of inoculated grapevine plants and the origin of isolates (Camps et al., 2010). Namely, the origin of the isolate can affect the degree of aggressiveness of the isolate.

For example, grapevine isolates from areas with a long tradition of

райони с дълга традиция на отглеждане на кайсии и лози, при наличието на загиване на лозата, са по-добре адаптирани към климатичните условия в оранжерия (Sosnowski et al., 2007a, b; Pitt et al., 2013; Hrycan et al., 2020). Освен това изменението на климата може да повлияе на появата и силата на симптомите по леторастите. По-конкретно, климатът се влияе от това, че гостоприемникът става по-чувствителен към определени изолати, които предизвикват симптоми в парникови условия (Sosnowski et al., 2007a, b; Rolshausen et al., 2014; Cordt et al., 2019; Hrycan et al., 2020 г.). Тъй като симптомите не се появиха в настоящия опит 20 месеца след инокулацията, изследването е водено до появата на симптоми по леторастите.

Въз основа на посочените по-горе резултати може да се направи заключение, че всеки от методите за оценка на вирулентността на различни изолати *E. lata* при сорт Каберне Совиньон е еднакво надежден за изследване на вирулентността. А именно, предимството на метода на инокулация на невякоренени резници е, че за поставяне на опита се използват резници от едногодишни лозови летораста във фаза на покой. Това означава, че върху инокулираните резници едновременно се развиват летораста и мицел на гъбички, така че симптомите се появяват по леторастите след 5 до 10 седмици.

Това е много важно за сравнително бързо тестване на вирулентността на голям брой изолати на гъбички *E. lata* за кратко време.

Тестът е сравнително лесен за изпълнение и тест-наборът не

apricot and grapevine cultivation, and thus the presence of grapevine dieback, are better adapted to the climatic conditions in the greenhouse (Sosnowski et al., 2007a, b; Pitt et al., 2013; Hrycan et al., 2020).

Also, climate change can affect the appearance and intensity of symptoms on shoots.

More specifically, the climate is affected by the host becoming more sensitive to certain isolates that produce symptoms in greenhouse conditions (Sosnowski et al., 2007a, b; Rolshausen et al., 2014; Cordt et al., 2019; Hrycan et al., 2020).

Since the symptoms did not appear in our experiment 20 months after the inoculation, the examination was followed until the appearance of symptoms on the shoots.

Based on the previously mentioned results and discussion, it can be concluded that each of the methods for assessing the virulence of different isolates *E. lata* according to the Cabernet Sauvignon variety, are equally reliable for testing the virulence. Namely, the advantage of the method of inoculation of unrooted cuttings is that the cuttings of one-year-old vine shoots in the dormant phase are used for setting the experiment.

This means that on inoculated cuttings, shoots and mycelium of the fungus develop at the same time, so that symptoms appear on shoots in 5 to 10 weeks.

This is very important for relatively fast testing of virulence of a large number of isolates of the fungus *E. lata* for a short time.

The test is relatively easy to set up and the set test does not take up

заема много място. Вторият метод на инокулация на вкоренени резници е по-взискателен, тъй като се използват едногодишни вкоренени растения и изисква много повече място и време за извършване от първия метод.

Сравнявайки настоящите резултати с данни от литературата, може да се направи заключението, че и двата метода са подходящи и надеждни за изследване не само на патогенността, но и на податливостта на различни сортове лоза към гъбички *E. lata*. Също така анализът на получените резултати показва, че крайният резултат и от двата експеримента е еднакъв. Всички изследвани изолати показват висока степен на патогенност за Каберне Совиньон, също така различните изолати в двата експеримента показват различна степен на агресивност спрямо изследвания сорт лоза.

ИЗВОДИ

Проучване на лоза в 14 места в Сърбия, в периода от 2004 до 2019 г., показва поява на симптоми на загиване на лозата.

Чрез инокулиране на сорт Cabernet Sauvignon с по-голям брой изолати на *E. lata* с различен произход по 2 метода се установи, че изследваните изолати на *E. lata* показват различна вирулентност.

А именно и при двата метода най-агресивни се оказват изолати EL150 и EL152, докато изолати EL30 и EL199 причиняват симптоми по листата и леторастите в малък процент, а същите изолати причиняват и най-малката дължина на некрозата около мястото на инокулация. Въз основа на получените резултати, може да се направи заключение, че и двата

much space. The second method of inoculation of rooted cuttings is more demanding because one-year-old rooted plants are used and it requires much more space and time to be performed than the first method.

By comparing our results with data from the literature, we can conclude that both methods are suitable and reliable for testing not only pathogenicity but also susceptibility of different grapevine cultivars to the fungus *E. lata*.

Also, the analysis of the obtained results shows that the final outcome of both experiments is identical. All tested isolates showed pathogenicity on Cabernet Sauvignon in a high degree, and different isolates in both experiments showed different degrees of aggressiveness on the tested cultivar.

CONCLUSIONS

A study of vineyards in 14 sites in Serbia, in the period from 2004 to 2019, showed the appearance of symptoms of the dieback of the grapevine. By inoculating the Cabernet Sauvignon variety with a larger number of isolates of *E. lata* of different origin, using 2 methods, it was determined that the studied isolates of *E. lata* show different virulence.

Namely, in both methods, isolates EL150 and EL152 proved to be the most aggressive, while isolates EL30 and EL199 caused symptoms on leaves and shoots in a small percentage, and also the same isolates caused the smallest length of necrosis around the inoculation site. Based on the obtained results, we can conclude that both methods are suitable and reliable for testing

метода са подходящи и надеждни за изследване на патогенността на различни лозови сортове спрямо гъбички *E. lata*.

pathogenicity of different grapevine cultivars to the fungus *E. lata*.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. **Camps, C., C. Kappel, P. Lecomte, C. Léon, E. Gomés, P. Coutos-Thévenot and S. Delrot**, 2010. A transcriptomic study of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Cabernet-Sauvignon) interaction with the vascular ascomycete fungus *Eutypa lata*. *J. Exp. Bot.*, 61, 1719–1737. doi: 10.1093/jxb/erq040.
2. **Cardot, C., G. Mappa, S. La Camera, C. Gaillard, C. Vriet, P. Lecomte, G. Ferrari and P. Coutos-Thévenot**, 2019. Comparison of the molecular responses of tolerant, susceptible and highly susceptible grapevine cultivars during interaction with the pathogenic fungus *Eutypa lata*. *Front. Plant Sci.*, 10 (991), 1–18. doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00991>.
3. **Carter, M. V.**, 1994. Wood and root diseases caused by fungi. *Eutypa dieback*. In R. C. Pearson, and A.C. Goheen (ed.), *Compendium of grape diseases*, 3rd ed. APS Press. St. Paul, Minnesota, 32–34.
4. **Carter, M.V., A. Bolay, H. English and I. Rumbos**, 1985. Variation in the Pathogenicity of *Eutypa lata* (= *E. armeniaca*). *Aust. J. Bot.*, 33, 361–366. DOI: 10.1071/BT9850361.
5. **Dhingra, O.D. and J.B. Sinclair**, 1995. *Basic Plant Pathology Methods*. CRC Press, Boca Raton, Florida, (F).
6. **Fontaine, F., C. Pinto, J. Vallet, C. Clément, A.C. Gomes and A. Spagnolo**, 2016. The effects of grape vine trunk diseases (GTDs) on vine physiology. *Eur. J. Plant Pathol.* 144, 707–721. doi:10.1007/s10658-015-0770-0.
7. **Gramaje, D., J.R. Úrbez-Torres and M.R., Sosnowski**, 2018. Managing grapevine trunk diseases with respect to etiology and epidemiology: current strategies and future prospects. *Plant Dis.* 102, 12–39. doi: 10.1094/PDIS-04-17-0512-FE
8. **Gubler, W. D., P.E. Rolshausen, F.P. Trouillas, J.R. Úrbez-Torres, T. Voegal and G.M. Leavitt**, 2005. Grapevine trunk diseases in California. *Pract. Winery Vineyard*, 1–9.
9. **Hrycan, J., M. Hart, P. Bowen, T. Forge and J. R. Úrbez-Torres**, 2020. Grapevine trunk disease fungi: their roles as latent pathogens and stress factors that favour disease development and symptom expression. *Phytopathol. Mediterr.*, 59 (3), 395–424. doi: 10.14601/Phyto-11275.
10. **Moisy, C., G. Berger, T. Flutre, L. Le Cunff and J.P. Péros**, 2017. Quantitative Assessment of Grape vine Wood Colonization by the Dieback Fungus *Eutypa lata*. *J. Fungi.*, 3 (2), 21, 1–15. <https://doi.org/10.3390/jof3020021> [Accessed 7 November 2019]. doi: <https://doi.org/10.3390/jof3020021>.
11. **Mondello, V., A. Songy, E. Battiston, C. Pinto, C. Coppin, P. Trostel-Aziz, C. Clément, L. Mugnai and F. Fontaine**, 2017. Grapevine trunk diseases: a review of fifteen years of trials for their control with chemicals and biocontrol agents. *Plant Dis.* 102, 1189–1217. doi: 10.1094/PDIS-08-17-1181-FE.
12. **Munkvold, G.P., J.A. Duthie and J. J. Marois**, 1993. Spatial patterns of grapevines with *Eutypa dieback* in vineyards with or without perithecia.

- Phytopathology* 83, 1440–1448. doi: 10.1094/Phyto-83-1440.
13. **Peros, J.P. and G. Berger**, 1994. A rapid method to assess the aggressiveness of *Eutypa lata* isolates and the susceptibility of grapevine cultivars to *Eutypa* dieback. *Agronomie* ,14, 515–523. doi: 10.1051/agro:19940804.
 14. **Peros, J.P. and G. Berger**, 2003. Genetic structure and variation in aggressiveness in European and Australian populations of the grapevine dieback fungus, *Eutypa lata*. *Eur. J. Plant Pathol.*, 109, 909–919. doi: 10.1023/B:EJPP.0000003648.10264.62.
 15. **Pitt, W.M., F.P. Trouillas, W.D. Gubler, S. Savocchia and M.R. Sosnowski**, 2013. Pathogenicity of Diatrypaceous fungi on grapevine in Australia. *Plant Dis.*, 97, 749–756. doi: 10.1094/PDIS-10-12-0954-RE.
 16. **Ramos, D.E., W.J. Moller and H. English**, 1975. Susceptibility of apricot tree pruning wounds to infection by *Eutypa armeniaca*. *Phytopathology* 65, 1359-64. doi: 10.1094/Phyto-65-1359.
 17. **Rolshausen, P.E., K. Baumgartner, R. Travadon and J. Pouzoulet**, 2014. Identification of *Eutypa* spp. causing *Eutypa* dieback of grapevine in Eastern North America. *Plant Dis.* 98: 483–491. doi: 10.1094/pdis-08-13-0883-re.
 18. **Rolshausen, P.E., L.C. Greve, J.M. Labavitch, N.E. Mahoney, R.J. Molyneux and W.D. Gubler**, 2008. Pathogenesis of *Eutypa lata* in Grapevine: Identification of virulence factors and biochemical characterization of cordon dieback. *Phytopathology*, 98, 222–229. doi: 10.1094/PHYTO-98-2-0222.
 19. **Rolshausen, P.E., M. Sosnowski, F.P. Trouillas and W.D. Gubler**, 2015. Diseases Caused by Fungi and Oomycetes. *Eutypa* dieback. In: Compendium of Grape Diseases, Disorders, and Pests, Wilcox W. F., Gubler, W. D., Uyemoto, J. K. 2nd ed. APS Press. St. Paul, Minnesota, 57–61.
 20. **Sosnowski, M. and G. McCarthy**, 2017. Economic impact of grapevine trunk disease management in Sauvignon Blanc vineyards of New Zealand. *Wine Vitic. J.*, 32, 42–48.
 21. **Sosnowski, M.R., D. Shtienberg, M.L. Creaser, T.J. Wicks, R. Lardner and E.S. Scott**, 2007b. The influence of climate on foliar symptoms of *Eutypa* dieback in grapevines. *Phytopathology* 97, 1284-1289. doi: 10.1094/PHYTO-97-10-1284.
 22. **Sosnowski, M.R., R. Lardner, T.J. Wicks and E.S. Scott**, 2007a. The influence of grapevine cultivar and isolate of *Eutypa lata* on wood and foliar symptoms. *Plant Dis.*, 91, 924–931. doi: 10.1094/PDIS-91-8-0924.
 23. **Travadon, R., K. Baumgartner, P.E. Rolshausen, W.D. Gubler, M.R. Sosnowski, P. Lecomte, F. Halleen and J.P. Péros**, 2012. Genetic structure of the fungal grapevine pathogen *Eutypa lata* from four continents. *Plant Pathol.*, 61 (1), 85-95. doi: 10.1111/j.1365-3059.2011.02496.x.
 24. **Travadon, R., P.E. Rolshausen, W.D. Gubler, L. Cadle-Davidson and K. Baumgartner**, 2013. Susceptibility of cultivated and wild *Vitis* sp. To wood infection by fungal trunk pathogens. *Plant Dis.*, 97, 1529–1536. doi: <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-13-0525-RE>.
 25. **Trouillas, F.P. and W.D. Gubler**, 2010. Host range, biological variation, and phylogenetic diversity of *Eutypa lata* in California. *Phytopathology*, 100 (10), 10481–056. doi: 10.1094/PHYTO-02-10-0040.
 26. **Živković, S.**, 2019. Characterization of *Eutypa lata*, causal agent of

grapevine dieback in Serbia and susceptibility of varieties. (Dissertation). Faculty of Agriculture. University of Belgrade: 1–171.

27. **Živković, S., T. Vasić, M. Ivanović, D. Jevremović, J. Marković and V. Trkulja**, 2019. Morphological and molecular identification of *Eutypa lata* on grapevine in Serbia. *J. Plant Dis. Prot.*, 126, 479–483. doi: 10.1007/s41348-019-00238-4.

28. **Živković, S., T. Vasić, S. Anđelković, D. Jevremović and V. Trkulja**, 2012a. Identification and characterization of *Eutypa lata* on grapevine in Serbia. *Plant Dis.*, 96, 913. doi: 10.1094/PDIS-11-11-0990-PDN.

29. **Živković, S., T. Vasić, V. Trkulja, V. Krnjaja and J. Marković**, 2012b. Pathogenicity on grapevine and sporulation of *Eutypa lata* isolates originating from Serbia. *Rom. Biotechnol. Lett.*, 3 (17), 7379–7388.