

Preventivna zaštita od bolesti drva vinove loze primjenom vrsta roda *Trichoderma*

Uvod

Jedan od glavnih zadataka moderne poljoprivredne proizvodnje predstavlja razvoj ekološki prihvatljivih metoda zaštite od bolesti i štetnika, kao alternativa primjeni pesticida. Shodno tome se mogućnosti primjene bioloških pripravaka u posljednje vrijeme sve više istražuju, a takvi su ekološko prihvatljivi tretmani sve više traženi kako od strane proizvođača, tako i od strane potrošača.

Vinogradarstvo ne predstavlja iznimku po tom pitanju te se biološki pripravci danas koriste za zaštitu vinove loze od pepelnice (pomoću gljive *Ampelomyces quisqualis*), ali i za zaštitu od bolesti drva, kao što su eska, botriosferijsko sušenje i eutipoza. U tom pogledu, rod gljiva *Trichoderma*, koji se u velikoj mjeri primjenjuje u ekološkoj i integriranoj poljoprivredi u svrhu smanjenja pojave gljivičnih bolesti kod raznih poljoprivrednih kultura, ima važnu ulogu kod učinkovitog i održivog suzbijanja bolesti drva vinove loze.

Vrste roda *Trichoderma* Persoon (Ascomycota: Hypocreaceae) vrlo često su dominantan dio mikroflore tla u raznovrsnim staništima. Smatra se da su vrste ovog roda izraziti kozmopoliti zbog njihove metaboličke sposobnosti i agresivne kompetitivnosti, međutim, vrlo su rijetko patogeni biljaka (Gams i Bissett, 1998). Vrste ovog roda povećavaju biljci dostupnost i apsorpciju hranjiva, ukorjenjivanje, porast biljke i prinos, ali primjenjuju se i u induciranju sistemične obrane biljke, biološkom suzbijanju biljnih bolesti (antagonisti) i razgradnji ksenobiotičkih pesticida (Herman, 2006). Iako su ove vrste najčešće izolirane iz rizosfere tla i vrlo rijetko iz filiosfere biljke (Kredics i sur., 2014), u vinogradarstvu se najčešće primjenjuju kao biofungicidi u preventivnoj zaštiti rana od rezidbe.

Antagonizam vrsta roda *Trichoderma*

Vrste roda *Trichoderma* primjenjuju se kao antagonističke vrste gljiva u suzbijanju velikog broja biljnih patogena, ponajprije biljnih patogena u tlu. Postoji više mehanizama antagonizma kojima vrste roda *Trichoderma* mogu spriječiti razvoj patogena (Miličević i Kaliterna, 2006; Kortekamp i sur., 2013), a oni uključuju: a) antibiozu, kojom gljive stvaraju razne antibiotske i enzimatske spojeve čijim djelovanjem dolazi do degradacije stanične stijenke patogenih vrsta; b) kompeticiju za hraniva, kojom nadjačavaju biljne patogene; c) kompeticiju za prostor na mjestu razvoja infekcije, budući da se *Trichoderma* odlikuje bržim razvojem u odnosu na većinu gljivičnih patogena drva te d) hiperparazitizam, budući da su vrste roda *Trichoderma* sposobne parazitirati micelij drugih patogenih gljiva, čime uskraćuju asimilaciju hrane patogenim vrstama. Svi navedeni mehanizmi antagonizma specifični su za pojedine vrste iz roda *Trichoderma* i regulirani su na razini gena.

Trichoderma vrste mogu istovremeno putem više različitih mehanizama spriječiti razvoj patogena, što ovisi i o uvjetima okoline (temperatura, vlaga i ostali čimbenici), kao i o fizikalnim, kemijskim i biološkim karakteristikama mjesta razvoja infekcije, a to mjesto je u slučaju vinove loze rana na višegodišnjem drvu. Zahvaljujući navedenim mehanizmima, *Trichoderma* vrste mogu spriječiti klijanje

spora raznih patogena te tako spriječiti razvoj infekcije bolestima drva putem rana od rezidbe (Kortekamp i sur., 2013).

Osim što antagonizmom inhibiraju razvoj patogenih mikroorganizama na vinovoj lozi, vrste roda *Trichoderma* mogu dodatno smanjiti mogućnost razvoja infekcije, što ovisi o interakciji s domaćinom, koja nije jednaka kod svih sorata vinove loze. Naime, Mutawila i sur., (2011) zabilježili su daljnji razvoj micelija *Trichoderma* spp. u tkivo tretiranih rana dvogodišnjeg drva, a ova je interakcija doprinijela formiranju tiloza, gumoza i povećanju sadržaja lignina, koje mogu imati značajan utjecaj na sprječavanje razvoja infekcije uzročnika bolesti drva.

Primjena vrsta roda *Trichoderma* u suzbijanju bolesti drva vinove loze

Primjena vrsta roda *Trichoderma* trenutno obuhvaća ponajprije preventivnu zaštitu vinove loze od uzročnika bolesti drva, zaštitom rana od rezidbe (Mutawila i sur., 2011) i loznog sadnog materijala (Pertot i sur., 2016). Vrste roda *Trichoderma* su brzorastuće vrste, koje pri odgovarajućim klimatskim uvjetima mogu brzo kolonizirati rane od rezidbe, tijekom čega su visoko kompetitivne s uzročnicima bolesti drva. Micelij *Trichoderma* vrsta može u kratkom roku kolonizirati zonu drva koja se nalazi sve do dubine od 10 centimetara ispod površine rana od rezidbe, čime se postiže učinkovita zaštita (John i sur., 2008).

Tijekom posljednjih dvadesetak godina proveden je velik broj istraživanja učinkovitosti primjene vrsta roda *Trichoderma* u suzbijanju pojedinih uzročnika bolesti drva vinove loze, poput Petrijeve bolesti i eske (*Phaeomoniella chlamydospora* W. Gams, Crous, M.J. Wingf. & Mugnai) Crous & W. Gams i *Phaeoacremonium minimum* (Tul. & C. Tul.) Gramaje, L. Mostert & Crous), botriosferijskog sušenja vinove loze (*Diplodia seriata* De Not. i *Neofusicoccum parvum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips) i eutipoze (*Eutypa lata* (Pers.) Tul. & C. Tul.). Učinkovitost *Trichoderma* spp. u proizvodnim uvjetima može biti vrlo varijabilna. Naime, John i sur., (2008) utvrdili su perzistentnost vrste *Trichoderma harzianum* Rifai u trajanju od 20 mjeseci nakon primjene na rane od rezidbe, pri čemu je ova vrsta kolonizirala dvogodišnje drvo do dubine od šest centimetara.

Vrste roda *Trichoderma* primjenjuju se kao biofungicidi, odnosno živi mikroorganizmi, zbog čega je njihova učinkovitost pod značajnim utjecajem karakteristika domaćina i čimbenika okoline. Sposobnost i dugotrajnost kolonizacije rane ovisi i o karakteristikama anatomije unutarnjeg tkiva višegodišnjeg drva vinove loze, što znači da varira među sortama, a ovisi i o fiziološkom stanju trsa i fenofazi u kojoj se trs nalazi prilikom primjene pripravka (Bruez i sur., 2014; Di Marco i Osti, 2007; Mutawila i sur., 2011).

Vrste i sojevi roda *Trichoderma* primijenjeni u suzbijanju uzročnika bolesti drva

Razne vrste roda *Trichoderma* su do sada istražene na vinovoj lozi, a u biološkoj zaštiti rana od rezidbe najčešće se primjenjuju vrste *Trichoderma atroviride* P. Karst., *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckf. & Nirenberg, *Trichoderma gamsii* Samuels & Druzhin i *T. harzianum*. Sojevi ovih vrsta razlikuju se u svom antagonističkom potencijalu prema različitim štetnim mikroorganizmima te stoga nemaju jednako djelovanje prema svim patogenima koji uzrokuju bolesti drva. U nastavku su opisane karakteristike nekih sojeva koji se danas koriste u najvećoj mjeri.

Trichoderma atroviride SC1 je soj koji je izoliran iz drva lješnjaka. Ovaj soj karakterizira brz razvoj te klijanje spora i kolonizacija rana pri niskim temperaturama. Osim toga što ovaj soj može kolonizirati ranu u kratkom vremenskom roku, kolonizacija rana je i dugotrajna, zbog čega se postiže visoka kompetitivnost u odnosu na patogene. Ovaj soj proizvodi litičke enzime (celulaze i proteaze), koji svojom aktivnošću degradiraju spore i micelij patogena na ranama višegodišnjeg drva, kao i spojeve s antibiotskim djelovanjem, zbog čega ima učinkovito djelovanje protiv bolesti drva vinove loze.

Trichoderma atroviride I1237 ima sposobnost brze kolonizacije rana nastalih rezidbom, uspješan je kompetitor patogenim gljivama za hraniva i prostor, a pored toga može izravno djelovati na patogene putem antibioze i hiperparazitizma.

Trichoderma asperellum i *Trichoderma gamsii* ICC 080 su aktivni pri temperaturama od 10 do 28 °C, s optimalnom aktivnošću pri 15 °C. *Trichoderma asperellum* sprječava razvoj patogena *P. chlamydospora* pri temperaturi oko 10 °C, dok *Trichoderma gamsii* ICC 080 sprječava razvoj istog patogena pri temperaturi oko 15 °C. Obje vrste ostaju vijabilne do temperature od 5 °C te mogu nastaviti s aktivnim razvojem nakon porasta temperature.

Vrijeme i način primjene vrsta roda *Trichoderma*

Nakon rezidbe, rane mogu dugo vremena biti podložne infekciji patogenim vrstama (do četiri mjeseca za neke patogene), ali najkritičniji period u kojem može doći da razvoja infekcije nastupa u periodu od dva tjedna nakon rezidbe do osam tjedana nakon rezidbe, ovisno o patogenim vrstama i klimatskim karakteristikama pojedine regije (Eskalen i sur., 2007, Van Niekerk i sur., 2011).

Minimalna temperatura razvoja *Trichoderma* vrsta tijekom koje je moguća aktivna kolonizacija rana od rezidbe najčešće iznosi oko 10 °C pa njihova učinkovitost zaštite rana ovisi o vremenu primjene, koja se može provesti od fenofaze mirovanja trsova do vunastog pupa (što prema BBCH skali za praćenje fenofaza uključuje fenofaze 00 do 05). Najbolja kolonizacija rana postiže se ukoliko se *Trichoderma* primjenjuje nakon završetka faze mirovanja (krajem zime), odnosno tijekom fenofaze suženja vinove loze. Nadalje, utvrđeno je da ako se pripravci primjenjuju oko šest sati nakon rezidbe (bilo rane ili kasne rezidbe), kolonizacija rana *Trichoderma* vrstama je veća u odnosu na primjenu 24, 48 ili 96 sati nakon rezidbe (Mutawila i sur., 2016). Ovi podaci govore u prilog važnosti pravovremenog tretiranja, koje bi trebalo provesti u što kraćem roku nakon završetka rezidbe, a ukoliko postoji mogućnost za to, tretiranje treba provesti isti dan kad je izvršena rezidba. Također je važno prije same primjene voditi računa i o vremenskoj prognozi, budući da jaka kiša može isprati pripravak s rana, čime se značajno može smanjiti njegova učinkovitost.

Zaštita rana od rezidbe primjenom *Trichoderma* spp. trebala bi se početi provoditi već od prve godine uzgoja vinograda, ili najkasnije počevši od rezidbe nakon druge ili treće godine uzgoja te potom ponavljati tretiranje nakon svake sljedeće rezidbe (Sosnowski i Mundy, 2016). Pored toga, preporuča se saditi cijepove koji su prethodno u rasadniku bili inokulirani *Trichoderma* spp. Tretiranje treba provesti na svim ranama koje nastaju rezidbom, bilo većih ili manjih dimenzija, a aplikacija se vrši raspršivanjem ili premazivanjem rana.

Svi pripravci koji sadrže *Trichoderma* spp. mogu se primijeniti razrijeđeni u vodenoj otopini, pomoću traktorskih ili leđnih raspršivača. Saprnice trebaju biti usmjerene prema zoni rezidbe kako bi pripravak dospio do svih rana na trsu, uključivši i rane na deblu. Najbolji učinak se postiže primjenom većeg volumena vode, koji bi trebao iznositi od 400 do 600 litara po hektaru, ovisno o vrsti raspršivača

(Sosnowski i Mundy, 2016). Kod aplikacije traktorskim raspršivačima, najbolja pokrivenost rana se postiže isključivanjem ventilatora, primjenjujući pritom velike količine vode uz nizak pritisak, odabirom sapnica većeg promjera kapljica i usmjerenjem sapnica prema ranama. Tijekom primjene *Trichoderma* spp. kemijski fungicidi se ne smiju koristiti neposredno prije ili poslije njihove primjene, a spremnici raspršivača se prije primjene trebaju temeljito očistiti kako u njima ne bi zaostalo rezidua fungicida iz prethodnih tretiranja.

Vrste roda *Trichoderma* mogu se primijeniti i ručnim premazivanjem rana od rezidbe. Ovaj način primjene nije učestao budući da iziskuje veliki utrošak vremena, ali može se uzeti u obzir kod proizvodnje na malim površinama ili za vinograde koje proizvođač smatra posebno vrijednima.

Učinkovitost primjene vrsta roda *Trichoderma*

Jedna od glavnih prepreka za širu primjenu vrsta roda *Trichoderma* u vinogradarstvu je velika varijabilnost koja je uočena od strane proizvođača po pitanju učinkovitosti ovih pripravaka u svrhu suzbijanja bolesti drva. Kao što je prethodno već navedeno, na učinkovitost *Trichoderma* spp. djeluju mnogobrojni čimbenici, poput izbora *Trichoderma* vrste ili soja (kad je na tržištu taj izbor moguć), fenofaze u kojoj se loza nalazi, načina primjene, razdoblja koje je proteklo od rezidbe do aplikacije pripravka, vremenskih prilika tijekom i nakon primjene sredstva, kao i aktualnog stupnja raširenosti bolesti drva u vinogradu (Di Marco i sur., 2004). Iz tog se razloga općenito smatra kako se primjena vrsta roda *Trichoderma* treba upotpuniti s primjenom ostalih mjera koje mogu djelovati na smanjenje razvoja bolesti drva u vinogradu, kao što su primjerena rezidba trsova, zbrinjavanje ostataka rezidbe kao izvora infektivnog inokuluma, održavanje dobre kondicije trsova i slično.

Korištenje *Trichoderma* vrsta u regijama obuhvaćenim projektom Winetwork

Dostupnost pripravaka s *Trichoderma* vrstama na tržištu ovisi o tome koji su biološki pripravci registrirani u pojedinoj državi u svrhu suzbijanja bolesti drva te se znatno razlikuje među državama koje su sudjelovale u realizaciji projekta Winetwork. Kao što se može vidjeti u Tablici 1, u pojedinim je državama već registrirano više *Trichoderma* vrsta i sojeva koji se mogu koristiti za tu namjenu, dok u drugim državama zasad nema registriranih pripravaka ili su oni trenutno u postupku registracije.

Od država koje su sudjelovale u realizaciji projekta Winetwork, pripravci na bazi *Trichoderma* vrsta se najviše koriste u Italiji, gdje se naširoko primjenjuju u preventivne svrhe i posebice u mladim nasadima, još prije pojave simptoma. Najviše su u uporabi kod proizvođača koji imaju velike površine pod vinogradima i u slučajevima gdje je ekonomska vrijednost proizvodnje grožđa visoka, iako se njihova primjena preporučuje za sve tipove proizvodnje. U Francuskoj je primjena *Trichoderma* vrsta zasad sporadična, a ovi se pripravci primjenjuju kako u proizvodnim vinogradima, tako i u rasadničarskoj proizvodnji, dok se u Njemačkoj *Trichoderma* vrste zasad gotovo isključivo koriste u rasadničarstvu.

Tablica 1. Najučestaliji biološki pripravci koji sadrže vrste roda *Trichoderma* (2017.)

Država	Naziv pripravka	Doza primjene	Vrste/Sojevi
Francuska	Esquive WP®	4 kg/ha	<i>Trichoderma atroviride</i> I-1237
	Vintec®	200 g/ha	<i>Trichoderma atroviride</i> SC1
Italija	Patriot Dry®	1 kg/ha	<i>Trichoderma asperellum</i> ICC012+ <i>Trichoderma gamsii</i> ICC 080
	Remedier®	1 kg/ha	<i>Trichoderma asperellum</i> ICC 012 2% + <i>Trichoderma gamsii</i> ICC 080 2%
	Tellus WP®	1 kg/ha	<i>Trichoderma asperellum</i> ICC 0122% + <i>Trichoderma gamsii</i> ICC 080 2%
Njemačka	Vintec®	200 g/ha	<i>Trichoderma atroviride</i> SC 1
Hrvatska	Trenutno nema registriranog pripravka (FIS, 2017)		
Mađarska	U tijeku je registracija pripravka Vintec®		<i>Trichoderma atroviride</i> SC 1
Portugal	U tijeku je registracija pripravka Esquive WP®		<i>Trichoderma atroviride</i> I-1237
Španjolska	U tijeku je registracija pripravka Esquive WP®		<i>Trichoderma atroviride</i> I-1237

Izvor: Rezultati projekta Winetwork

Popis literature

- Bertsch C., M. Ramírez-Suero, M. Magnin-Robert, P. Larignon, J. Chong, E. Abou-Mansour, A. Spagnolo, C. Clément and F. Fontaine Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood (review) *Plant Pathology* (2013) 62, 243–265.
- Bruze E, Vallance J, Gerbore J, Lecomte P, Da Costa J-P. (2014) Analyses of the Temporal Dynamics of Fungal Communities Colonizing the Healthy Wood Tissues of Esca Leaf-Symptomatic and Asymptomatic Vines. *PLoS ONE* 9(5): e95928. doi:10.1371/journal.pone.0095928
- Di Marco S., F. Osti, A. Cesari Experiments on the control of esca by *Trichoderma* *Phytopathol. Mediterr.* (2004) 43, 108–115
- Di Marco S., Osti F., 2007. Application of *Trichoderma* to prevent *Phaeoconiella chlamydospora* infections in organic nurseries. *Phytopathologia Mediterranea* 2007, 46, 73-83
- Eskalen A., A.J. Feliciano, and W.D. Gubler. Susceptibility of grapevine pruning wounds and symptom development in response to infection by *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeoconiella chlamydospora* (2007) *Plant Dis.* 91:1100-1104
- Kortekamp A., Haustein M., Köckerling J., Eder J., 2013. *Trichoderma* gegen Esca, das deutsche weinmagazin, 1/5, januar 2013, 34-36.
- Larignon P. La constitution d'un groupe international de travail sur les maladies du bois et les premiers résultats des expérimentations menées par l'ITV en laboratoire et en pépinières Les Maladies du Bois en Midi-Pyrénées. (2004) 24-27.
- Mutawila C., F. Halleen, L. Mostert Optimisation of time of application of *Trichoderma* biocontrol agents for protection of grapevine pruning wounds *Australian Journal of Grape and Wine Research* 22, (2016) 279–287

- Mutawila C., P.H. Fourie, F. Halleen, L. Mostert Grapevine cultivar variation to pruning wound protection by *Trichoderma* species against trunk pathogens *Phytopathol. Mediterr.* (2011) 50 (Supplement), S264–S276 Newsome J. Grapevine Trunk Disease, A review (2012)
- Serra S., M.A. Mannoni and V. Ligios, 2008. Studies on the susceptibility of pruning wounds to infection by fungi involved in grapevine wood diseases in Italy. *Phytopathologia Mediterranea* 47, 234–246.
- Sosnowski M., Mundy D., 2016. Sustaining vineyard through practical management of grapevine trunk diseases, final report to New Zealand winegrowers, SARDI.
- Van Niekerk J., W. Bester, F. Halleen, P. Crous, and P. Fourie, The distribution and symptomatology of grapevine trunk disease pathogens are influenced by climate. *Phytopathologia Mediterranea* 50 (4) (2011), 98–111.
- Mutawila, C., FOURIE, P., Halleen, F., & Mostert, L. (2011). Grapevine cultivar variation to pruning wound protection by *Trichoderma* species against trunk pathogens. *Phytopathologia Mediterranea*, 50(4), 264-276.
- Pertot, I., Prodorutti, D., Colombini, A., & Pasini, L. (2016). *Trichoderma atroviride* SC1 prevents *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeoacremonium chlamydospora* infection of grapevine plants during the grafting process in nurseries. *BioControl*, 61(3), 257-267.
- John, S., Wicks, T. J., Hunt, J. S., & Scott, E. S. (2008). Colonisation of grapevine wood by *Trichoderma harzianum* and *Eutypa lata*. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 14(1), 18-24.