WINETWORK
European Knowledge Transfer

Artigo Técnico

Aplicação de *Trichoderma* spp. numa estratégia de protecção contra as doenças do lenho (DL) da videira na Europa

Este projecto recebeu financiamento ao abrigo do programa europeu de investigação e inovação Horizonte 2020, através do acordo de subvenção No 652601

A utilização de métodos de protecção ecológicos, em alternativa aos pesticidas químicos, está no centro das preocupações actuais do sector agrícola. Neste contexto, o uso de agentes de contolo biológico (ACB) é cada vez mais investigado e solicitado, tanto por produtores como pelos consumidores na Europa, em consequência da procura de produtos biológicos. A viticultura não escapa a esta tendência sendo que, para além de ACB capazes de controlar importantes doenças (ex. *Ampelomyces quisqualis*, em relação ao oídio), vários outros têm sido testados para controlar outras doenças importantes da videira, tais como a Esca, a Botryosphaeria e a Eutipiose. Neste sentido, os fungos pertencentes ao género Trichoderma, amplamente utilizados em modo de produção biológica e produção integrada com o objectivo de reduzir e controlar doenças em várias culturas, poderiam desempenhar um importante papel no sentido de um controlo mais eficiente e sustentável das DL. Por esta razão, desde 2000, os efeitos da utilização de Trichoderma no controlo das DL têm sido amplamente estudados, nas principais regiões vitícolas, a nível mundial.

O efeito antagonista de *Trichoderma*

Os fungos *Trichoderma* spp. apresentam um antagonismo bem conhecido (desde 1887) junto de um elevado número de agentes patogénicos das plantas e, em especial, dos presentes no solo. Os primeiros estudos realizados demonstram a sua habilidade em proteger as raízes das plantas de infecções, descrevendo também os seus modos de acção. Em particular, *Trichoderma* spp. pode atacar agentes patogénicos da seguinte forma: 1) **Antibiose**, através da produção de substâncias que, espalhando-se no substrato (solo, matéria orgânica, etc.) inibem o crescimento de outros competidores, incluindo agentes patogénicos que atacam plantas; 2) **Competição por nutrientes** - Uma vez que o fungo utiliza os mesmos recursos nutritivos que os dos agentes patogénicos; 3) **Competição por espaço** e locais de infecção, devido à alta taxa de crescimento de *Trichoderma*, em comparação com a de outros microorganismos e 4) **Hiperparasitismo**, que é a destruição de patogénios através de enzimas líticas produzidas por *Trichoderma*. Todos estes modos de acção são específicos de espécies ou mesmo de estirpes, sendo regulados a nível genético. Assim, as várias espécies de *Trichoderma* podem perseguir diversas estratégias, podendo simultaneamente controlar os agentes patogénicos que afectam as plantas, dependendo do ambiente (temperatura, humidade relativa, etc.) e / ou das condições físicas, químicas e biológicas da matriz (isto é, os tecidos lenhosos da videira).

Trichoderma para controlar as DL

Desde 2000, vários ensaios foram conduzidos com o objectivo de avaliar a eficácia de *Trichoderma* spp no controlo de fungos do lenho. Os principais fungos utilizados nos ensaios foram *Phaeomoniella chlamydospora* e *Phaeoacremonium mínimo* para o complexo Esca, *Diplodia seriata* e *Neofusicoccum parvum* para o Botryosphaeria e *Eutypa lata* para a eutipiose. Em particular e após a realização de ensaios in vitro, foram utilizados na inoculação artificial de feridas de poda ou no tratamento em plantas, com vista a observar a capacidade das estirpes estudadas de *Trichoderma* limitarem infecções por DL. Os resultados destes estudos globalmente demonstraram que *Trichoderma* spp. tem uma eficiência parcial, de acordo com os métodos de avaliação utilizados no controlo dos principais agentes patogénicos envolvidos nas DL, quando utilizado quer nas feridas de poda, quer nas estacas em viveiro, evitando novas infecções. Além disso, graças à sua actividade de amplo espectro, *Trichoderma* é capaz de retardar infecções de uma ampla gama de agentes patogénicos do lenho, permanecendo viável nos tecidos lenhosos á volta da ferida até cerca de 1 ano.

Sendo um produto «vivo», a sua eficiência pode ser influenciada pelo ambiente. Em particular, a capacidade de colonização de feridas e a persistência das espécies de *Trichoderma* podem depender de factores intrínsecos da ferida e, portanto, podem variar consoante as castas de videira e dependendo da fase fisiológica da videira em que o produto foi aplicado (Bruez et al, 2014); Além disso, o efeito de protecção da ferida também depende da sua interacção com a videira, uma vez que não depende apenas do efeito supressivo directo, como relatado por alguns investigadores (Mutawila et al, 2011).

Várias espécies e estirpres de *Trichoderma* têm sido testadas sendo que as mais utilizadas como ACB na gestão de DL pertencem às espécies *T. atroviride, T. asperellum T.gamsii* e *T. harzianum*. Como mencionado anteriormente, cada estirpe difere no seu potencial antagonístico contra diferentes fungos patogénicos, não tendo o mesmo efeito contra todos os

agentes patogénicos do lenho da videira. De seguida, descrevem-se informações sobre algumas das estirpes mais utilizadas.

- ***Trichoderma atroviride* SC1**: a estirpe foi isolada a partir de madeira de avelã. Possui rápido crescimento, germinação e colonização da madeira, a baixas temperaturas. Para além de rápida, a colonização é persistente, sendo altamente competitiva, face aos agentes patogénicos. Esta estirpe produz enzimas lípticas (celulases e proteases) e um efeito antibiótico que lhe confere uma boa actividade como ACB, para além de enzimas que degradam os esporos e o micélio dos fungos do elnho existentes na superfície da madeira.
- ***Trichoderma atroviride* I1237** tem a capacidade de colonizar rapidamente feridas de poda, competindo com os fungos do lenho por nutrientes e espaço, demonstrando propriedades antibióticas e micoparasíticas
- ***Trichoderma asperellum*** e ***Trichoderma gamsii* ICC 080**: estas duas estirpes têm um espectro de maior actividade entre 10 a 28 ° C, com um óptimo de actividade a 15 ° C (as estirpes são viáveis de 8 a 35 ° C). No caso de *P. chlamydospora*, *Trichoderma gamsii* e T*richoderma asperellum* parecem ter um efeito maior a 10 °C e 15 ° C, respectivamente. Ambas as espécies permanecem viáveis a 5 °C, sendo capazes de se multiplicarem , quando a temperatura aumenta.

Trichoderma atroviride SC1

Como actua o *Trichoderma* no controlo das DL da videira?

O *Trichoderma* deve ser sempre utilizado como um tratamento preventivo, uma vez que as espécies não têm uma capacidade curativa em relação aos fungos do lenho, mas podem eficientemente, por exemplo, prevenir a infecção através de feridas de poda. Por se tratar de fungos de crescimento rápido, em condições óptimas, o micélio de *Trichoderma* spp. pode colonizar feridas de poda até 1 a 2 centímetros, num curto lenho período de tempo. Além disso, induzem uma elevada capacidade de competição no local de colonização, se a mesma for bem sucedida e estável. Tem capacidade de inibir a germinação de esporos de diferentes fungos do lenho, em especial os pertencentes aos Botryosphaeriaceae (Kortekamp, 2013)

Como utilizar productos com *Trichoderma* na protecção contra as DL?

Tempo e método de aplicação

Após a poda, as feridas podem permanecer sensíveis aos fungos do lenho por um longo período de tempo (até 4 meses, de acordo com o fungo considerado), mas o período mais crítico para a infecção varia entre 2 a 8 semanas após a poda (Eskalen et al. Niekerk et al., 2011b). Por regra, o *Trichoderma* é capaz de iniciar a colonização da ferida a partir dos 10 ° C, sendo a sua eficiência e capacidade de protecção melhorada tendo em conta as condições climáticas na altura do tratamento.
A aplicação do produto nas feridas de poda pode ser efectuada entre o gomo de Inverno e o período de "chora" (BBCH 00 - BBCH 05). No entanto, diferentes autores observaram uma colonização mais rápida do lenho se o *Trichoderma* for aplicado durante o período de quebra de dormência ou na "chora" (final do Inverno) do que durante o período de dormência. Além disso, estudos recentes comprovam que os melhores resultados na colonização dos tecidos foram obtidos com tratamentos realizados 5 ou 6 horas após a poda (Mutawila et al., 2016). Com o objectivo de obter uma maior eficácia do tratamento, aconselha-se que a aplicação seja efectuada logo após a poda. Também é importante considerar as condições climáticas antes do tratamento, já que a ocorrência de chuvas fortes pode interferir na colonização da ferida, por efeito de lavagem do produto.
A prática de protecção das feridas de poda deve iniciar-se logo após a plantação da vinha. Os investigadores recomendam até a aquisição de plantas já inoculadas com *Trichoderma* spp em viveiro, durante o processo de propagação, devendo iniciar-se o tratamento no campo 2 ou 3 anos após a sua plantação. Nos anos seguintes, é altamente recomendável repetir-se a aplicação anualmente (Sosnowski, 2016). Independentemente do seu tamanho, todas as feridas de poda devem ser tratadas com este ACB, quer seja por pulverização como por pincelagem, dependendo da valorização económica da uva.
Todos os produtos baseados em *Trichoderma* podem ser aplicados por pulverização (esporos suspensos em água), recorrendo a um pulverizador de dorso, podendo também ser aplicados na zona de poda com o objectivo de proteger as feridas

de poda, neste caso recorrendo a um elevado volume de água (400-600 l / ha) com a ajuda das mangueiras ligadas a um pulverizador de jacto transportado (Sosnowski et al., 2016) .
Para melhorar a eficácia do tratamento com este tipo de produto, a qualidade da pulverização é fundamental, devendo alcançar-se de forma abrangente as feridas localizadas tanto na estrutura vegetativa, como no tronco.
A maximização do tratamento pode ser obtida desligando a turbina (ventoinha), aplicando elevados débitos de água a baixa pressão, seleccionando bicos de pulverização que produzam gotas maiores e direccionando os bicos para a zona de localização das feridas de poda.
Nenhum fungicida deve ser aplicado imediatamente antes ou imediatamente após a aplicação de *Trichoderma*, sendo que o depósito do pulverizador deve ser cuidadosamente limpo de resíduos de outros tratamentos fungicidas, por forma a evitar quebras de eficácia deste ACB.
Os produtos baseados em *Trichoderma* também podem ser aplicados por pincelagem das feridas de poda. Este método não é normalmente utiliza dono campo, por ser demorado, mas poderia ser considerado no caso de vinhas com maior valorização económica da produção.
A eficácia das espécies de *Trichoderma*, variável consoante as condições locais, não tem sido completamente demonstrada no campo, sendo essencial que a sua aplicação seja complementada com a realização de outras práticas de gestão da vinha (boa prática de poda, redução da presença de inóculo potencial, bom equilíbrio da videira, etc).

A utilização de *Trichoderma* nalgumas regiões vitícolas do projecto Winetwork

Em **Itália**, os produtos à base de *Trichoderma* são essencialmente aplicados por pulverização, como tratamento preventivo após a poda (logo que possível) em vinhas jovens, onde não se observaram ainda sintomas. Estes produtos são, na prática, aplicados como uma importante ferramenta de prevenção contra as DL essencialmente em grandes vinhedos, com elevada produtividade e boa valorização económica da uva, por exemplo, na região vitícola de Soave ou Prossecco, mas a sua aplicação é recomendada a todos os tipos de vinhas.

Embora a sua utilização em **França** seja neste momento esporádica, os produtos à base de *Trichoderma* estão a ser utilizados por viveiristas e viticultores como preventivo contra as DL, por pulverização na vinha, entre 3 a 10 dias após a poda.

Na **Alemanha**, o produto é utilizado em viveiros, onde o material vegetativo é imerso durante algumas horas numa solução em banho-maria com *Trichoderma*, antes da sua plantação. Tendo em conta a recente homologação do produto no país (há cerca de uma ano), apenas alguns viticultores recorreram ao *Trichoderma* como método preventivo contra as DL na vinha. É utilizado por pulverização das feridas, imediatamente após a poda, apenas quando não estão previstos eventos de geada.

Em **Portugal**, infezlimente o produto ainda não se encontra homologado para utilização como método preventivo contra as DL, nem em viveiros, nem para os viticultores.

Em toda a Europa, os viveiros desenvolveram um processo especial para tratar o material com recurso a *Trichoderma* spp. A eficácia desse tipo de aplicação, tanto em viveiros como em vinhas, permanece no entanto por comprovar.

Um método pouco comum de aplicação de *Trichoderma* tem sido aplicado numa vinha em **Espanha**. Consiste em inserir pequenas cavilhas de madeira inoculadas com *Trichoderma* no tronco e / ou nos braços previamente perfurados. A inoculação é realizada na poda, no estádio BBCH 11 a 13, ou ligeiramente mais tarde. A eficácia desta prática carece no entanto de validação científica.

Produtos disponíveis nas regiões vitícolas do Winetwork

Os ACB estão disponíveis na Europa para uma grande variedade de doenças. Segundo o país, vários produtos à base de *Trichoderma* encontram-se registados para utilização contra DL da videira, sendo os únicos produtos que cumprem os critérios para aplicação em modo de produção biológica.
Conforme relatado na tabela seguinte, diferentes espécies e estirpes de *Trichoderma* estão disponíveis nos diferentes países, enquanto que nenhum produto se encontra registrado noutros (Croácia e Portugal) estando em fase de registo na Hungria, Portugal e Espanha

Pais	Producto	Quantidade	Composição	Preco (producto comercial)
França	Esquive WP ®	4 kg/ha	Trichoderma atroviride I-1237	252€/ha
	Vintec®	200 g/ha	Trichoderma atroviride SC1	200€/ha
Italia	Patriot Dry®	1 kg/ha	Trichoderma asperellum ICC012+ Trichoderma gamsii ICC 080	From 45 to 50€/ha
	Remedier®	1 kg/ha	Trichoderma asperellum ICC 012 2% + Trichoderma gamsii ICC 080 2%	From 45 to 50€/ha
	Tellus WP®	1 kg/ha	Trichoderma asperellum ICC 0122% +Trichoderma gamsii ICC 080 2%	From 45 to 50€/ha
Alemanha	Vintec®	200 g/ha	Trichoderma Atroviride SC1	180€/ha
Croacia				
Hungria	Vintec® (Em processo de homologação)		Trichoderma Atroviride SC1	
Portugal	VINTEC® (Em processo de homologação)		Trichoderma atroviride SC1	200€/ha
Espanha	Esquive WP ® (Em processo de homologação)		Trichoderma atroviride I-1237	

Esquive WP ®: pode ser utilizado durante desde o gomo de Inverno (estado fenológico BBCH 00) até à "chora" através de uma aplicação por hectare e por ano. O produto pode ser aplicado por pincelagem ou pulverizado, idealmente após a poda (máximo 15 dias depois). A dose a utilizar é de 4 kg/ha por pulverização (150 L de água / ha) ou de 100 g/L, se utilizado por pincelagem sobre as feridas de poda. A temperatura mínima para aplicação é de 4 ° C (abaixo de 0 ° C esta estirpe não consegue germinar) sendo que deve ser aplicado sob tempo seco, sem chuva prevista nas 4 horas seguintes à aplicação. O produto pode ser utilizado até 6 meses após a primeira utilização (se guardado na embalagem original) sendo conveniente ser armazenado à temperatura ambiente e abaixo de 20 ° C.

Vintec®: este produto é apresentado numa formulação de grânulos dispersáveis em água podendo ser aplicado entre os estados fenológicos BBCH 00 (gomo de inverno) a BBCH 05 (ponta verde), depois da poda e até ao abrolhamento na dose de 200 g / ha utilizando débitos de 100 L de água por ha. A suspensão deve ser preparada imediatamente antes do seu uso, não podendo ser reutilizada (apesar de ter mostrado uma boa sobrevivência dos conídios 72h após preparação). A temperatura mínima de aplicação é de cerca de 10 ° C. Para obter melhores resultados, nenhuma chuva ou geada deverá ocorrer após o tratamento. O produto deve ser armazenado entre 0 e 4 ° C.

Tellus WP®: pode ser utilizado em BBCH 00 (gomo de inverno) após a poda a doses de 250 g / 100L com um débito mínimo de 400 L / ha, por forma a distribuir pelo menos 1kg de produto / ha. A aplicação deve ser efectuada a uma temperatura próxima de 10 ° C e não pode ser executada para além do período de "chora" da videira. Em locais com solo seco, a vinha pode ser regada antes do tratamento.

Remedier®: pode ser utilizado no BBCH 00 (gomo de inverno) após a poda e até ao período de "chora" a uma dose de 250g / 100L, com um débito mínimo de 400 L / ha. deve evitar-se a aplicação de água após o tratamento. Para promover a germinação dos esporos, deve colocar o produto em água 24 horas antes da sua aplicação, por forma a permitir a pré-germinação dos esporos.

Patriot Dry®: pode ser utilizado no BBCH 00 (gomo de inverno) após a poda e até ao período de "chora" na dose de 250g / 100L com um débito mínimo de 400 L / ha. O produto deve ser armazenado antes e depois da aplicação a uma temperatura ambiente abaixo dos 25 ° C.

Eficácia do *Trichoderma*

Um dos maiores obstáculos na utilização e disseminação do *Trichoderma* está frequentemente relacionado com os resultados variáveis observados pelos diferentes viticultores. De facto, numerosos factores podem influenciar a eficácia deste ACB na prevenção de DL nomeadamente: - o estado fenológico das vinhas; - o método utilizado para a sua distribuição; - o tempo que decorre entre a poda e o tratamento, - as condições meteorológicas ocorridas durante e após a aplicação e o nível de incidência de DL na vinha tratada (Di Marco et al., 2004).

A eficácia das espécies de *Trichoderma* parece variar de acordo com as condições locais, sendo que a sua eficácia no campo não foi ainda completamente estabelecida, sendo essencial complementar a utilização de *Trichoderma* com a aplicação de outras práticas de gestão na vinha (boas práticas na poda, restrição de inóculo, bom equilíbrio da videira, etc).

Referências bibliográficas

Bertsch C., M. Ramirez-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.

Bruez E, Vallance J, Gerbore J, Lecomte P, Da Costa J-P, et al. (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

D'Enjoy G., Nesler A., Frati S., *Trichoderma* atroviridae SC1 is a tool for life-long protection of grape against trunk diseases Natural Products & Biocontrol (2016)

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 *Phaeomoniella 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 *Phaeomoniella chlamydospora* (2007) Plant Dis. 91:1100-1104

Halleen F.,Fourie, P.H.,Lombard P.J, 2010. Protection of Grapevine Pruning Wounds against Eulypa lata by Biological and Chemical Methods, S. Afr. J. EnoL Vitic., VoL 31, No. 2,2010

Halleen F., Fourie P.H., 2015. An Integrated Strategy for the proactive management of grapevine trunk disease pathogen infections in grapevine nurseries. South African journal of Enology and viticulture, vol 37, N°2, 2016, 104-114

Harvey I.C., J.S. Hunt Penetration of *Trichoderma* harzianum into grapevine wood from treated pruning wounds, New Zealand Plant Protection(2006) 59:343-347

Hasan S., Gupta G., Anand S., Kaur H. (2014). Lytic enzymes of *Trichoderma*: their role in plant defense. International Journal of Applied Research and Studies (iJARS), volume 3, Issue 2 (Feb 2014), 5p.

John S., Wicks TJ, Hunt JS, Scott ES, Colonisation of grapevine wood by *Trichoderma* harzianum and Eutypa lata. Australian Journal of Grape and Wine Research (2008) 14, 18–24.

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.

Longa C.M.O., Pertot I., Tosi S. Ecophysiological requirements and survival of a *Trichoderma* atroviride isolate with biocontrol potential. J Basic Microbiol (2008) 48:269–277

Mondello V. BCAs used to control GTDs (Esca, Botryosphaeria and Eutypa dieback) Winetwork project SWG meeting minutes (2016)

Mugnai L. What preventative measures could growers take to prevent the entry of GTD agents into a vineyard? –Presentation at Wineskills Masterclass on Grapevine Trunk Disease (2012)

Mutawila C., F. Halleen, L. Mostert Development of benzimidazole resistant *Trichoderma* strains for the integration of chemical and biocontrol methods of grapevine pruning wound protection BioControl (2015) 60:387-399

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)

Pertot I., Pasini L., Prodorutti D., Nesler A., 2016. *Trichoderma* atroviride SC1 can prevent infections of Phaeacremonium and Phaeomoniella in nurseries. Presentation for COST Action FA1303 in Logroño, Spain, October 2016, 20p.

Reis P., Pajot E., Letousey P., Rego C., 2016. *Trichoderma* atroviride strain I-1237: colonization of pruning wounds against grapevine wood diseases. Presentation for COST Action FA1303 in Logroño, Spain, October 2016, 27p.

Rolshausen P. E., J. R. Úrbez-Torres, S. Rooney-Latham, A. Eskalen, R. J. Smith, W. D. Gubler Evaluation of pruning wound susceptibility and protection against fungi associated with grapevine trunk diseases Am. J. Enol. Vitic. (2010) 61:1

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