

**UNIVERZITET CRNE GORE**  
**Biotehnički fakultet Podgorica**

Komisiji za doktorske studije

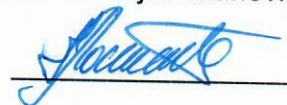
Crna Gora  
UNIVERZITET CRNE GORE  
BIOTEHNIČKI FAKULTET  
Broj: 07-4929/2  
12-12-2022 god.  
Podgorica

**Predmet:** Predlog Komisije za ocjenu podobnosti doktorske teze i kandidata

Predlažem Komisiji za doktorske studije Biotehničkog fakulteta da imenuje komisiju za ocjenu podobnosti doktorske teze "Eska oboljenje vinove loze u vinogradima u Crnoj Gori i mogućnosti njenog suzbijanja" i kandidata MSci Bogoljuba Kandića u sastavu:

1. Prof. dr Nedeljko Latinović, Biotehnički fakultet Univerziteta Crne Gore (naučna oblast: Zaštita bilja fitofarmacija) - mentor
2. Prof. dr Jelena Latinović, redovni profesor Biotehničkog fakulteta Univerziteta Crne Gore (naučna oblast: Zaštita bilja- fitopatologija) – član.
3. Doc. dr Tatjana Popović, Biotehnički fakultet Univerziteta Crne Gore (naučna oblast: Vinogradarstvo) – član.

Mentor  
Prof. dr Nedeljko Latinović



U Podgorici, 5.12.2022.

## PRIJAVA TEME DOKTORSKE DISERTACIJE

OPŠTI PODACI O DOKTORANDU	
Titula, ime i prezime	Magistar Bogoljub Kandić
Fakultet	Biotehnički fakultet
Studijski program	Biotehnika
Broj indeksa	1/21
Ime i prezime roditelja	Milan Kandić
Datum i mjesto rođenja	06.03.1990. Nikšić
Adresa prebivališta	Naselje Željezare br. 3, Nikšić
Telefon	+382/69363384
E-mail	bogoljub.kandic@gmail.com
BIOGRAFIJA I BIBLIOGRAFIJA	
Obrazovanje	2021. godine - akademske doktorske studije na Biotehničkom fakultetu Univerziteta Crne Gore u Podgorici, studijski program Biotehnika. 2013. - 2016. godine akademske magistarske studije na Biotehničkom fakultetu Univerziteta Crne Gore u Podgorici, studijski program Zastita bilja. Magistar (MSc). 2012. - 2013. godine - postdiplomske specijalističke akademske studije na Biotehničkom fakultetu Univerziteta Crne Gore u Podgorici, studijski program Zastit bilja. Specijalista zastite bilja (Spec.Sci). 2009. – 2012. godine - osnovne akademske studije na Biotehničkom fakultetu Univerziteta Crne Gore u Podgorici, studijski program Biljna proizvodnja. Bachelor (BSc).
Radno iskustvo	2016 – u toku, rukovodilac rasadnika i inženjer u proizvodnji sadnog materijala ukrasnog bilja. Centrometal doo 15.01.2014 – 15.10.2015 Pripravnik u Fitopatološkoj laboratoriji. Biotehnički fakultet, Univerzitet Crne Gore, Podgorica
Popis radova	Pavlović, D., Latinovic, J., Kandic, B., Latinovic, N. (2015): Testing the biological efficacy of the product Orvego in control of grapevine downy mildew ( <i>Plasmopara viticola</i> ) in Montenegro; IV International symposium and XX Scientific Professional Conference of Agronomists of Republic of Srpska Latinović J., Kandić, B. and Latinović, N. (2017): Survey on the distribution of fire blight pathogen, <i>Erwinia amylovora</i> , on pome fruits in Montenegro. <i>Phytopathologia Mediterranea</i> , 56(2), 322.
NASLOV PREDLOŽENE TEME	
Na službenom jeziku	<i>Eska oboljenje vinove loze u vinogradima u Crnoj Gori i mogućnosti njenog suzbijanja</i>
Na engleskom jeziku	<i>Esca grapevine disease in Montenegro and possibilities of its control</i>



### Obrazloženje teme

Rod *Vitis* L. (Vinova loza) sa više od 100 trenutno opisanih vrsta (The Plant List 2013) gaji se više od 7000 godina. Sorte *Vitis vinifera* (obična vinova loza) su najraširenije zasađene širom svijeta, sa veoma visokom komercijalnom vrijednosti (Gramaje et al., 2018). Vinova loza je jedna od najvažnijih poljoprivrednih kultura u Crnoj Gori, a prema podacima MONSTAT-a u 2017. godini gajila se na površini od 2850 ha. Njeno gajenje ograničava jako veliki broj biljnih bolesti, od kojih neke mogu gotovo u potpunosti uništiti prinos, a ističu se: Plamenjača vinove loze (*Plasmopara viticola*), Pepelnica vinove loze (*Uncinula necator*), Crna pjegavost vinove loze (*Phomopsis viticola*), Siva trulež (*Botrytis cinerea*), (Delibašić i sar., 2019). Međutim, danas sve više na značaju dobija i druga grupa bolesti vinove loze, koje ne utiču samo na direktan gubitak prinosa, već na propadanje cjelokupnih biljaka tj. čokota u čemu se ogleda njihova jako velika destruktivnost, a zajedničkim imenom se nazivaju bolesti drveta vinove loze (Grapevine trunk diseases, GTD). Jedna od najpoznatijih i već dugo pristunih bolesti drveta vinove loze je Eska, čiji simptomi su opisivani još u prvim klasičnim literaturama iz oblasti poljoprivrede, koji su izvještavali o Grčkoj civilizaciji (Sofia, 2018). Eska u Crnoj Gori je već dugo prisutna u gotovo svim vinogradarskim regionima, ali svake godine sve više dobija na značaju, kako zbog procenta zastupljenosti u starijim vinogradima, tako i zbog sve većeg prisustva i negativnih ekonomskih pokazatelja u mladim vinogradima. Veliki broj patogena prouzrokovaca bolesti drveta vinove loze izazivaju slične simptome, te je od ključnog značaja analizom što većeg broja uzoraka, dobiti jasniju sliku o tačnom prisustvu patogena prouzrokovaca bolesti drveta vinove loze u Crnoj Gori, i dovesti u vezu izolovane patogene sa tipičnim simptomima. Esku prouzrokuju kompleks gljiva, pri čemu samo rod *Phaeoacremonium* broji preko 50 različitih vrsta, stoga je od velikog značaja determinisati sve patogene prouzrokovace Eske prisutne u Crnoj Gori.

Detaljnim pregledom vinograda neophodno je utvrditi tačan broj simptomatičnih čokota, odnosno procentualnu zastupljenost eske u vinogradima različitog sortimenta i starosti. Procjena ekonomskih pokazatelja prouzrokovanih eskom usled gubitka prinosa na inficiranim čokotima veoma je važan parametar kod ocjene destruktivnosti ove bolesti.

U cilju prognoze razvoja eske i mogućnosti njenog suzbijanja značajno je analizirati i što veći broj asimptomatskih čokota, pri čemu se može utvrditi prisustvo latentnih infekcija u vinogradu. U programima sprovođenja mjera u cilju suzbijanja odnosno ograničenja širenja eske važno je koristiti zdrav sadni materijal prilikom zasnivanja vinograda, te je stoga značajno obraditi što veći broj uzoraka sadnog materijala (kalemova) vinove loze kako iz domaće proizvodnje tako i uvoza. Veoma je značajno utvrditi potencijalno prisustvo štetnih organizama kako u kalemu tako i u podlozi na samim sadnicama. Suzbijanje eske kao i ostalih bolesti drveta vinove loze je veoma kompleksno, a sam proces mora biti integrisan nizom mehaničkih, agrotehničkih, hemijskih ili bioloških metoda zaštite. Primjena hemijskih sredstava je veoma otežana i bez previše pozitivnih iskustava u praksi, jer se patogeni prouzrokovaci bolesti nalaze u sprovodnim sudovima drveta, te su stoga nepristupačni i zaštićeni od djelovanja sredstava za zaštitu bilja. Međutim, zbog sve većih ograničenja u primjeni sredstava za zaštitu bilja, danas se sve stavljaju u fokus biološke mjere zaštite. Zbog toga je od jako bitno u suzbijanju eska oboljenja u vinovoj lozi ispitati uticaj gljiva iz roda *Trichoderma* u laboratorijskim uslovima na patogene prouzrokovace eske.

### Pregled istraživanja

Prvi formalni zapisi o bolestima drveta vinove loze datiraju sa samog kraja XIX vijeka, a sam termin bolesti drveta vinove loze (GTD, Grapevine trunk disease) je relativno nov i formiran tek nakon uočavanja jako velikih gubitaka prouzrokovanih dejstvom ovih patogena (Gramaje et



al., 2018). Jedna od najstarijih bolesti drveta vinove loze je eska, a sam pojam eska se dugo koristio za sve tipove bolesti drveta vinove loze. Danas je opšteprihvaćeno razdvajanje tog naziva na „pravu Esku“ i „mladenačku esku“ odnosno Petrijevu bolest vinove loze (Ivić i sar., 2017).

Izraz eska je prvobitno bio prilagođen grčkom jeziku i glasio je „Iska“ da bi kasnije naziv postao romanizovan, te je bolest dobila naziv kakav se i sada koristi tj. eska. Sam naziv eska svojevremeno su koristili i vinogradari iz Smirne (Turska) i južne Italije koji su uočavali bolest ne vinovoj lozi sa simptomima bijele truleži nakon jasne apopleksije, odnosno iznenadnog sušenja (Sofia, 2018). Eska je na teritoriji Balkana po prvi put opisana još 1939. godine od strane prof. dr. Željka Kovačevića u knjizi Bolesti i štetnici na vinovoj lozi (Britvec, 2006). Eska je odvajkada prouzrokovala negativan uticaj na ekonomske pokazatelje u procesu proizvodnje vinove loze, prvenstveno jer usled razvoja bolesti dolazi do potpunog propadanja čokota. Poslednjih dvadeset godina, osobitno nakon ukidanja mogućnosti upotrebe natrijum arsenita, kao jedinog sredstva za uspješno suzbijanje eske, došlo je do naglog širenja ove bolesti. Veoma značajnu ulogu u širenju eske ima i zaražen sadni materijal, naročito kada je u pitanju latentna infekcija sa fitopatogenom gljivom *Phaeomoniella chlamydospora* jednom od prouzrokovaca ovog oboljenja. Osim toga jako veliki problem u suzbijanju eske predstavlja i veoma često veliki broj asimptomatskih biljaka u samim vinogradima koje predstavljaju izvor infekcije kako tokom perioda nakon rezidbe, tako potencijalno i u toku same vegetacije (Fontaine et al., 2016). Stoga u Francuskoj se procjenjuje da oko 50-83% parcela ima simptome eske (Bruez, 2013) usled čega je proizvodnja vina u 2014. godini smanjena za oko 13%. Razoran kapacitet eske možda najbolje pokazuju statistički parametri iz Italije gdje se stepen infekcije u starijim vinogradima procjenjuje i do 50%. Osim nepovratnog propadanja samog čokota usled razvoja bolesti, takođe se postavlja pitanje koliko eska izaziva direktnih gubitaka tokom godine usled nedostatka prinosa na nepovratno izgubljenim čokotima. Takođe čak i ukoliko dođe do opstanka prinosa na simptomatičnom čokotu postavlja se pitanje kvaliteta samog grožđa odnosno samog vina dobijenog iz tog grožđa. Vino dobijeno od grožđa koje sadrži preko 25% simptomatičnih bobica karakteriše značajno smanjenje šećera, a proporcionalno povećanje ukupne kisjelosti kao i povećanje asimilovanog azota. Rezultati pokazuju da grožđe na čokotima pogođenim eskom nije u istoj fazi zrelosti kada se bere, jer usled poremećaja fotosinteze dolazi do značajnog kašnjenja u sazrijevanju (Costa, 2018).

Tokom dugog istorijskog proučavanja eska oboljenja kao i pokušaja same izolacije, determinacije prouzrokovaca bolesti, preovladavala su različita mišljenja, pri čemu je proučavan jako veliki broj patogena (Britvec, 2006). Danas nakon opsežnih naučnih istraživanja može se reći da esku prouzrokuje kompleks gljiva iz roda *Phaeocremonium* koji sadrži preko 50 vrsta, zatim gljive *Phaeomoniella chlamydospora* (W.Gams, Crous, M.J.Wingfield & Mugnai) Crous & W.Gams i *Fomitiporia mediterranea* M.Fischer Fischer (2002). Glavni koridor za prodor patogena i nastanak infekcije, jesu rane nastale nakon obavljene rezidbe vinove loze, nakon čega se infekcija širi sprovodnim sudovima unutar čokota (Naschimento et al., 2013). Međutim, spore pojedinih patogena se mogu naći u vazduhu tokom čitave godine, što znači da postoji mogućnost nastanka infekcije tokom čitave vegetacije (Costa, 2018). Usled formiranja gumoznih začepjenja sprovodnih sudova ksilema koje se mogu primijetiti u vidu crnih tački na poprečnom presjeku čokota, dolazi do onemogućavanja protoka vode i hranljivih materija i nastanka folijarnih simptoma. Folijarni simptomi su naročito izraženi u periodu vodnog stresa samih biljaka u periodu ljetnjih mjeseci. Faktori životne sredine i stres biljke domaćina u prvom redu nedostatak hraniva, loša drenaža i zbijenost tla su veoma bitni činioci koji utiču na razvoj bolesti. Folijarni simptomi međutim nijesu direktno povezani sa samim patogenima (Moret et al., 2020), već isključivo sa metabolitima tj. toksinima koje proizvode gljive prouzrokovaci eske (Gramaje et al., 2018). Tipični folijarni simptomi manifestuju se u vidu tzv. „tigrove šare“, a oni su sami po



sebi još uvijek predmet istraživanja, zbog toga što još uvijek nikada iz simptomatoloških listova nije došlo do izolacije patogena prouzrokača eske. Grozdovi na inficiranim čokotima se nakon sušenja lišća postepeno smežuravaju, a nakon toga i u potpunosti osuše (Del Frari et al., 2022). Značajno je istaći dva tipa eske i to apoplektični oblik kada dolazi do iznenadnog propadanja kompletnog čokota kao i hronični oblik kada dolazi do postepenog višegodišnjeg propadanja čokota uz pojavu folijarnih simptoma tokom svakog ljeta (Cvjetković, 2010). Na poprečnom presjeku oboljelih čokota osim crnih gumoznih tačaka, veoma često se uočava i jasno propalo biljno tkivo gdje se manifestuju simptomi u vidu „bijeke truleži“.

Osim eske koje uglavnom pogađa vinograde starije od 5 do 10 godina, danas se sve više javlja i Petrijeva bolest koja se klasifikuje zasebno od eske, a koja prvenstveno napada mlade i tek zasnovane vinograde već u prvoj ili drugoj godini starosti. Ona se klasifikuje kao zasebna prvenstveno zbog patogena prouzrokača, jer Petri bolest izazivaju *Phaeomonilla chlamydospora* kao i pojedine vrste iz roda *Phaeocremonium*, za razliku od eske gdje se kao razarač drveta javlja *Fomitiporia mediteranea* (Fontaine et al., 2016). Petri bolest na mladim čokotima vinove loze dovodi do zaostajanja u rastu i razvoju lastara, skraćanjem internodija, smanjenja lisne površine odnosno manjim brojem listova na lastarima (Mundy, 2010). Budući da trenutno nije poznata jedinstvena i dovoljno efikasna mjera suzbijanja eske, kod kontinuirane i planske zaštite vinograda sa procesima prevencije se mora početi prilikom proizvodnje sadnog materijala, unutar rasadnika (Grozić i sar., 2019). Globalno se nije vodilo mnogo računa o procesima i tehnikama zaštite od eske ili petri bolesti unutar rasadnika do posljednjih desetak godina, ali sada je to neophodno jer veoma često matične biljke mogu biti latentno inficirane nekim od patogena prouzrokača eske. Sistemi za navodnjavanje, higijena u rasadniku kao i zdravstveno stanje matičnih biljaka su osnovni preduslovi za proizvodnju kvalitetnog i zdravstveno ispravnog sadnog materijala. Osim toga od velikog značaja su i toplotni tretmani sadnog materijala, kao što je tretman toplom vodom, koji je u nekim od zemalja EU i zakonski definisan kao obavezan. Veoma značajnu ulogu u prevenciji eske i petrijeve bolesti jeste i pravilan odabir sortimenta (Borgo et al., 2016) za proizvodnju jer pojedine sorte vinove loze pokazuju izvjesnu dozu otpornosti prema patogenima prouzrokačima ovih bolesti (Moreno Sanz et al., 2013). Prilikom podizanja mladih vinograda obavezna je adekvatna priprema samog terena kako bi se obezbijedio optimalan vodno-vazdušni režim samog tla, suzbijanje korova, adekvatnim fiksiranjem biljaka putem bambusa kako nebi došlo do njihovog mehaničkog oštećenja, a sve u cilju sprečavanja bilo kakvog stresa biljaka tokom vegetacione sezone (Crespy, 2006). Na osnovu višedecenijskih istraživanja sprovedenih na patogenima prouzrokačima eske, kao jedini kvalitetan model zaštite ističe se integrisan pristup svih relevantnih (mehaničkih, agrotehničkih, hemijskih ili bioloških) mjera. U integrisanom pristupu zaštite od eske najveći značaj ima pravilna i pravovremena rezidba. Rane nastale u toku rezidbe predstavljaju „ulazna vrata“ za patogene prouzrokače eske. Osim rezidbe, od velikog značaja je i higijena unutar vinograda, gdje će svi oboljeli biljni djelovi biti iznijeti iz zasada, a na taj način će značajno biti smanjen infektivni potencijal u vinogradu (Newsome, 2012). Pravilan odabir i formiranje uzgojnog oblika su od velikog značaja u procesu zaštite i suzbijanja eske jer se odabirom uzgojnog oblika na kom će se praviti površinski manji presjeci, znatno smanjiti mogućnost nastanka infekcije patogenima prouzrokačima eske (Grozić i sar., 2017). Kritičan faktor koji treba optimizovati jeste i samo vrijeme rezidbe. Trebalo bi izbjegavati rezidbu u periodu hladnog i kišovito vremena, jer su tada idealni uslovi za nastanak infekcije, a to je upravo period kada vinogradari najčešće i obavljaju samu rezidbu. Rezidbu bi trebalo obaviti neposredno prije kretanja vegetacije što je u većim vinogradima otežano. U većem broju evropskih zemalja gdje vinogradarstvo predstavlja značajan segment u poljoprivrednoj proizvodnji, sve više se radi dvostruka rezidba. Dvostruka rezidba značajno povećava troškove proizvodnje ali takođe i u velikoj mjeri smanjuje mogućnost nastanka infekcije eskom (Gramaje et al., 2018). Sve navedene



mehaničke i agrotehničke mjere obično i nijesu dovoljne da u potpunosti zaustave proces nastanka infekcije i suzbiju esku, te je stoga potrebno koristiti u procesima zaštite i različite fungicidne formulacije, uglavnom paste koje se koriste za dezinfekciju rana nakon rezidbe. Takođe se u *in vitro* uslovima sprovodi veliki broj istraživanja sintetičkih fungicida koji bi dali doprinos suzbijanju eske, naročito upotrebom za hemijski tretman rana nakon rezidbe (Gubbler et al., 2008). Ranije je jako veliku efikasnost u suzbijanju eske pokazivao natrijum arsenit (Bruez et al., 2021), koji je međutim zbog svojih negativnih efekata isključen iz upotrebe (Mondello et al., 2018). Osim natrijum arsenita, značajan efekat na suzbijanje eske su ostvarivala i dva fungicida iz grupe benzimidazola: benomil i karbendazim, koji su takođe isključeni iz upotrebe (Costa, 2013). Međutim, tokom decenija istraživanja testiran je jako veliki broj sintetičkih preparata od kojih su neki postizali određene rezultate u laboratorijskih uslovima, dok prilikom primjene u polju nije se mogao pronaći adekvatan mehanizam njihove primjene kako bi dali značajnije rezultate (Rego et al., 2009), a najveći zabilježeni efekat su postigli prilikom primjene nakon rezidbe nanošenjem direktno na svježe rane (Diaz et al., 2013). Biološke mjere borbe su dugo vremena oblast plodnog proučavanja za biljne patologe, ali uprkos opsežnom naučnom radu, u praksi postoji jako mali stepen upotrebe bioloških mjera borbe u komercijalnoj poljoprivredi generalno (Harman, 2000). Suzbijanje bolesti drveta upotrebom bioloških mjera zaštite, ima jako veliki potencijal prvenstveno jer biljni sok vinove loze je sam po sebi bogat značajnim biološki aktivnim materijama, koje same po sebi donekle mogu da se izbore sa patogenima prouzrokovateljima bolesti drveta, odnosno njihovim metabolitima koji su uzročnici folijarnih simptoma (Blundell et al., 2021). Od bioloških mjera borbe značajan efekat ima primjena đubriva na bazi morskih algi, kao i hitozan koji je pokazao izvjesna antimikrobna dejstva (Naschimento et al., 2007). Međutim, od svih dostupnih preparata i mogućnosti biološkog suzbijanja eske, najveći potencijal imaju preparati na bazi gljiva iz roda *Trichoderma*. Vrste iz roda *Trichoderma* su saprofitne gljive koje se obično nalaze u zemljištu, dok neke mogu biti i endofitne u samim biljkama. Endofiti mogu kolonizovati zdrava biljna tkiva bez izazivanja simptoma ili gubitaka domaćina i imaju minimalne uticaje na životnu sredinu. Mehanizam djelovanja vrsta roda *Trichoderma* obično se zasniva na mikoparazitizmu, lučenju mikolitičkih enzima, konkurenciji u resursima ostalim patogenima u biljci ili obavljaju proizvodnju metabolita – antibiotika. Vrste iz roda *Trichoderma* takođe imaju pozitivne efekte na njihove domaćine, uključujući poboljšanje rasta i aktivaciju otpornosti. Aktivacija odbrambenih gena domaćina pomoću *Trichoderma* vrsta je veoma važna komponenta biološke zaštite. Nakon kolonizacije sprovodnih sudova biljke gljivama iz roda *Trichoderma*, pod njihovim uticajem, dolazi do aktivacije endogenih odbrambenih gena koji dovode do pojačanog imunog odgovora biljke domaćina. Različiti antagonizmi, mehanizmi i staništa u tlu *Trichoderma* vrsta čine ove gljive idealnim kandidatima u kontroli bolesti koje se prenose iz tla (Stempien et al., 2020). Kako je eska bolest koja predstavlja jedan patološki kompleks koji se teško može izliječiti potrebno je izgraditi pravilne strategije koje će na adekvatan način da uključuju i neke vrste iz roda *Trichoderma*, jer brojne studije pokazuju njihovu efikasnost u prevenciji pojave infekcije eskom. Međutim, mehanizam djelovanja još uvijek nije u potpunosti definisan. Otkrivanje sposobnosti *Trichoderme* da ostane na biljnim tkivima dugo vremena je veoma značajan podatak koji se u narednom periodu mora kvantifikovati. Istraživanja sprovedena u Južnoj Africi, zapravo su pokazala da *Trichoderma*, nanešena na rane od rezidbe, može da raste u tkiva (ksilem i floem) izdanaka vinove loze i da smanji, ali ne i da poništi, sposobnost da se razvijaju patogeni prouzrokovaci u tim tkivima. Neki naučnici ističu stvaranje barijere za ulazak patogena, kao glavni (ako ne i isključivi) način djelovanja *Trichoderma* vrsta. Kako je u strategijskoj borbi protiv eske veoma značajno krenuti od samih rasadnika, *Trichoderma* vrste takođe su jako dobre za zaštitu unutar samih rasadnika. U rasadnicima je neophodno primijeniti lokalizovano dužinom reda 1 kg po ha. Primjena preparata na bazi gljiva iz roda



*Trichoderma* u rasadnicima se obavlja u periodu presađivanja pomoću sistema za navodnjavanje u dozi 0,25g po biljci u zavisnosti od gustine sadnje. Prilikom redovne obrade tla u rasadniku početkom proljeća primjenjuje se u dozi 1-2,5 kg/ha u zavisnosti od stanja biljke i otpornosti same sorte, dok ako je potrebno ista doza se može dodati i u Septembru (Turconi, 2020).

Rezultati djelovanja vrsta iz roda *Trichoderma* na mlade biljke vinove loze u rasadnicima mogu se vidjeti iz studije sprovedene 2005-2006 godine u komercijalnom organskom rasadniku u Faenci, Emilia Romagna u Sjevernoj Italiji. Tokom ove studije potvrđena je složenost mehanizma djelovanja biokontrolnog agensa i njegov potencijal u povećanju produktivnosti usjeva. Nakon aplikacije vrsta iz roda *Trichoderma* došlo je do značajne proliferacije korjenovog sistema kao i korjenovih dlačica. Vinova loza koja je tretirana sa *Trichoderma* vrstama su značajno bolje opremljene da izdrže stresne uslove, uključujući patogene povezane sa stresom, kao i one povezane sa eskom. Primjena ovih formulacija u rasadnicima je generalno imala blagotvorne efekte na biljke što je pokazalo poboljšanje karakteristika kvaliteta, posebno razvoja korjenovog sistema (Di Marco et al., 2008).

Tokom više studija o kontroli eska bolesti otkriveno je da 22 soja *Trichoderme* mogu biti veoma aktivna *in vitro* protiv patogena prouzrokovaca bolesti, ali da najveću efikasnost pokazuju *Trichoderma harzianum* i *Trichoderma atroviride*. Neki sojevi su u potpunosti inhibirali razvoj micelije. Što se tiče dejstva vrsta roda *Trichoderma* na korjenov sistem utvrđeno je ove vrste podstiču razvoj svježje mase korjenovog sistema za 41,7%, nakon mjesečnih tretmana u rasadnicima. *Trichoderma* vrste koje se prskaju na svježje rane nakon rezidbe u istraživanjima na terenu ostale su postojane do 60 dana. Tokom perioda od 8 nedelja nakon prskanja, količina *Trichoderme* se polako smanjivala. Svi rezultati ukazuju na to da su vrste roda *Trichoderma* efikasne kao preventivno sredstvo koje se koristi na vinovoj lozi koja još uvijek nije inficirana, međutim potrebne su dalje studije o tome kako i koliko brzo *Trichoderma* može da se razvija unutar ksilema vinove loze kako bi na taj način spriječila razvoj patogena prouzrokovaca bolesti drveta u ovom slučaju eske (Di Marco et al., 2004).

#### Cilj i hipoteze

Primarni cilj ovog istraživanja je da se kroz opsežnu analizu vinograda u Crnoj Gori, dobiju jasni i precizni podaci o prisustvu eske u Crnoj Gori, a zatim i da se identifikuju svi patogeni prouzrokovaci. Ovo je posebno značajno jer esku prouzrokuje kompleks većeg broja gljiva, te je značajno determinisati, odnosno identifikivati sve vrste prouzrokovace eske u Crnoj Gori. Od posebnog značaja je utvrditi i procenat zastupljenosti eske u crnogorskim vinogradima odnosno vinogorjima, sa posebnim osvrtom na zastupljenost bolesti u odnosu na nadmorsku visinu, sortiment, starost vinograda i agroekološke uslove samog mikrolokaliteta. Na bazi svega navedenog utvrditi finansijske ekonomske pokazatelje prouzrokovane eskom kako direktnim štetama usled gubitka prinosa u tekućoj godini, tako i ukupne štete u pregledanim vinogradima koje nastaju usled propadanja čitavog čokota. Laboratorijskom obradom uzoraka uzetih sa simptomatičnih čokota, relevantnim metodama, odraditi izolaciju svih patogena prisutnih u oboljelom drvetu, uzgojem na hranljivoj podlozi do čistih izolata.

Osim simptomatičnih čokota, veoma je značajno uzorkovati, a zatim i laboratorijski obraditi i veći broj asimptomatičnih, a sve u cilju utvrđivanja prisustva patogena prouzrokovaca eske tj. postojanja latentnih infekcija u vinogradu.

Veliku ulogu u širenju eske ima i kontaminiran sadni materijal, te stoga značajno je odraditi ispitivanja sadnog materijala u Crnoj Gori kako iz uvoza tako i domaće proizvodnje, standardnim laboratorijskim metodama, sa ciljem utvrđivanja potencijalnog prisustva štetnih organizama.

Mapiranjem vinograda (imanje Biotehničkog fakulteta) utvrditi prisustvo bolesti u tekućoj vegetacionoj sezoni, sa jasnim markiranjem simpomatičnih čokota, kako bi se u naredim



godinama pratio stepen širenja eske ili eventualan izostanak simptoma na inficiranim čokotima u zavisnosti od agroekoloških uslova. Sa aspekta zaštite od najvećeg značaja je ispitati mogućnost i stepen suzbijanja eske upotrebom bioloških preparata na bazi gljiva iz roda *Trichoderma* u laboratorijskim uslovima na sve patogene prouzrokovaoče eske, izolovane u Crnoj Gori, a na bazi čega će se dobiti jasnija slika o mogućnostima suzbijanja ove bolesti.

Polazne hipoteze ovog istraživanja su:

H01 – Na bazi podataka o sve većem stepenu širenja eske u gotovo svim vinogradarskim zemljama potrebno je vizuelnim pregledom odabranih vinograda, kao i daljom laboratorijskom obradom, utvrditi stepen prisustva eske u Crnoj Gori. Shodno dobijenim podacima prisustvo eske će se dovesti u korelaciju sa starosti vinograda, sortimentom kao i samim mikrolokalitetom u kom se obavlja vinogradarska proizvodnja.

H02 - Praćenjem stepena širenja eske u Crnoj Gori mapiranjem vinograda mogu se utvrditi ekonomski pokazatelji u vinogradu u kom eska uzrokuje direktan gubitak prinosa.

H03- Obradom uzoraka simptomatičnih čokota, standardnim laboratorijskim metodama izolovati sve patogene prisutne u oboljelim čokotima. Odraditi ispitivanje i potencijalnu izolaciju asimptomatičnih čokota usled ispitivanja prisustva patogena i postojanja latentnih infekcija u proizvodnim zasadima i sadnom materijalu iz uvoza i domaće proizvodnje.

H04 – Relevantnom molekularnom dijagnostikom (PCR) odraditi identifikaciju izolovanih patogena iz uzorkovanog simptomatičnog i asimptomatičnog biljnog materijala

H05 – Utvrditi stepen efikasnosti bioloških preparata na bazi gljiva iz roda *Trichoderma* na patogene prouzrokovaoče eske u laboratorijskim uslovima.

#### Materijali, metode i plan istraživanja

U ostvarivanju glavnih ciljeva i testiranja polaznih hipoteza ovog istraživanja koristiće se sljedeće metode:

- Upotreba opreme (alata) u cilju izdvajanja fragmenata inficiranih sprovodnih sudova čokota,
- Upotreba podloge za izolaciju patogena prouzrokovaoča eske **PDA** (Potato dextrose agar),
- Izrada mikroskopskih preparata dobijenih izolata gljiva u cilju morfološkog opisivanja istih,
- Mjerenje brzine rasta (razvoja) patogena prouzrokovaoča eske na PDA podlozi,
- Identifikacija patogena prouzrokovaoča eske upotrebom molekularne dijagnostike (PCR) korišćenjem referentnih prajmera,
- Testiranje bioloških preparata na bazi gljiva iz roda *Trichoderma* u laboratorijskim uslovima na patogene prouzrokovaoče eske,
- Analiza i obrada podataka dobijenih na osnovu ispitivanja prisustva eske u crnogorskim vinogorjima, stepena infekcije unutar vinograda shodno sortimentu i starosti vinograda, prisutnosti patogena prouzrokovaoča eske po uzroku,
- Analiza i obrada podataka o efikasnosti bioloških preparata na patogene prouzrokovaoče eske u laboratorijskim uslovima.

Planom je predviđeno da se eksperimentom obuhvate sva rejonizovana crnogorska vinogorja sa detaljnom analizom što većeg broja vinograda različite starosti, sortimenta, podloga na kom su sorte kalemljene, odnosno agroekoloških uslova samog mikroklimata u kom se analizirani vinogradi nalaze. Tokom eksperimenta planirano je uzimanje što većeg broja uzoraka simptomatičnih biljaka kao i dijela asimptomatičnih u cilju utvrđivanja prisustva latentnih infekcija. Planirano je uzrokovanje kalema (sadni materijal) vinove loze iz uvoza i domaće proizvodnje u cilju analize prisustva patogena u kalemu i podlogama. Upotrebom PDA hranljivih podloga planirana je izolacija patogena kako prouzrokovaoča eske tako i drugih



patogena prouzrokovaca bolesti drveta koji se nalaze u uzorkovanim čokotima, a zatim determinacija i identifikacija do nivoa vrste upotrebom molekularne dijagnostike (PCR). U prvoj godini je planirano mapiranje jedne zone vinograda Biotehničkog fakulteta gdje će biti ustanovljeno prisustvo svih simptomatičnih čokota, a zatim njihovo markiranje. Na bazi mape inficiranih čokota, plan je ustanoviti direktne gubitke prouzrokovane eskom, a koji se ogledaju u izostanku prinosa na oboljelim čokotima. Upotrebom mape markiranih oboljelih čokota u narednim godinama ustanoviti stepen širenja eske u eksperimentalom dijelu vinograda. Planirano je testiranje biofungicida na bazi gljiva iz roda *Trichoderma* u laboratorijskim uslovima, primjenom biofungicida na dobijene izolate prouzrokovaca bolesti i mjerenjem stepena uticaja na sprečavanje rasta fitopatogenih gljiva. Na osnovu prikupljenih podataka u toku trogodišnjih oglada, planirana je statistička obrada podataka i davanje odgovora na postavljene hipoteze.

#### Očekivani naučni doprinos

Bolesti drveta vinove loze, na prvom mjestu eska, se sve više isiču kao ozbiljan problem ili limitirajući faktor dugovječnosti vinograda, dovodeći u pitanje rentabilnost same proizvodnje. Stoga je od velikog značaja ispitati sve moguće mehanizme suzbijanja ove bolesti, kako na lokalnom tako i na globalnom nivou. Crna Gora je prepoznata kao država koja svojim klimatskim i edafskim karakteristikama, može biti veoma značajan faktor u proizvodnji kvalitetnih i visokokvalitetnih vina, te je od ključnog značaja ustanoviti nivo prisustva eske u crnogorskim vinogorjima.

Istraživanjem će se utvrditi prisutni patogeni prouzrokovaci eske u Crnoj Gori, a dati značajan doprinos razvoju mehanizama mogućnosti suzbijanja eske, upotrebom bioloških metoda zaštite, što će biti od velikog značaja kako za naučnu zajednicu tako i za vinogradarsku proizvodnju. Dobijeni rezultati će biti publikovani u međunarodnim časopisima, a očekuje se da će iz ove doktorske disertacije proisteci nekoliko naučnih publikacija, kao i veći broj saopštenja na nacionalnim ili međunarodnim naučnim skupovima.

#### Spisak objavljenih radova kandidata

Kandidat do sad nije imao objavljenih radova na ovu temu. Rad na istraživanjima iz ove oblasti je u toku i pisanje prva publikacije će početi u toku sledeće godine, dok će preliminarni rezultati biti prezentovani na jednom od budućih naučnih skupova.

#### Popis literature

1. Borgo, M., Pegoraro, G., Sartori, E. (2016): Susceptibility of grape varieties to esca disease; 39<sup>th</sup> World Congress of Vine and Wine, BIO Web of Conferences 01041(7), 1-3.
2. Blundel, R., Arreguin, M., Eskalen, A. (2021): In vitro evaluation of grapevine endophytes, epiphytes and sap micro-organisms for potential use to control grapevine trunk disease pathogens; *Phytopathologia Mediterranea*, 60(3), 535-548
3. Brtivec, B. (2006): Eska nije nova ni nepoznata bolest; *Agronomski glasnik*, 68(1), 71-72.
4. Bruez, E. (2013): Etude comparative des communautes fongiques et bacteriennes colonisant le bois de ceps de vigne ayant exprime ou non des symptomes Esca; *Doctorat De Univeriste Bordeaux*, 253.
5. Bruez, E., Larignon, P., Bertsch, C., Robert-Siegwald, G., Lebrun, M., Rey, P., Fontaine, F. (2021): Impacts of Sodium Arsenite on Wood Microbiota of Esca-Diseased Grapevines; *Journal of Fungi*, 498(7), 1-18.
6. Costa, J.N.G. (2018): Evaluation of chemicals against esca-related pathogens, in vitro and as pruning wound protectants; *Universidade de Lisboa*, 83.
7. Crespy, A. (2006) *Manuel pratique de taille de la vigne*; *Oenopluri media*, 158.





8. Cvjetković, B. (2010) Mikoze i pseudomikoze voćaka i vinove loze; Čakovec: Zrinski, 534.
9. Di Marco, S., Osti, F., Cesari, A. (2004): Experiments on the control of esca by *Trichoderma*; *Phytopathologia Mediterranea* 43(1), 108–115
10. Di Marco, D., Osti, F. (2008): Effects of *Trichoderma* applications on vines grown in organic nursery; 16th IFOAM Organic World Congress, Modena, Italy, June 16-20, Archived at <http://orgprints.org/view/projects/conference.html>
11. Diaz, G., Latorre, B. (2013): Efficacy of paste and liquid fungicide formulations to protect pruning wounds against pathogens associated with grapevine trunk diseases in Chile; *Crop Protection* 46, 106-112
12. Del Frari, G., Calzarano, F., Boavida Ferreira, R. (2022): Understanding the control strategies effective against the esca leaf stripe symptom: the edge hypothesis; *Phytopathologia Mediterranea*. 61(1), 153-164.
13. Fontaine, F., Gramaje, D., Armengol, J., Smart, R., Nagy, Z.A., Borgo, M., Rego, C., Corio-Costet, M. (2016): *Grapevine Trunk Diseases* (1st Edition); OIV publications, Paris, France, 24.
14. Gramaje, D., Urban-Torez, J.R., Sosnowski, M.R. (2018): Managing grapevine trunk diseases with respect to Etiology and Epidemiology: Current strategies and future prospects; *Plant Disease*, 102(1), 12-39.
15. Grozić, K., Bubola, M., Poljuha, D. (2017): Rezidba kao preventivna mjera bolesti drveta vinove loze; *Instut za poljoprivredu i turizam, Poreč*, 16.
16. Grozić, K., Bubola, M., Poljuha, D. (2019): Simptomi i mjere suzbijanja bolesti drva vinove loze; *Journal of Central European Agriculture*, 20(3), 876-890.
17. Gubler, W.D., Eskalen, A. (2008): *Grapevine Nursery Practices and Effects on Petri Disease and Young Esca*; 2nd Annual National Viticulture Research Conference, July 9–11
18. Harman, G.E. (2000): Changes in percetptions deriver from research on *Trichoderma harzianum* T-22; *Plant Disease*, 84(4), 377-393.
19. Ivić, D., Sever, Z., Pilipović, P., Čajkulić, A.M., Cvjetković, B. (2017): *Phaeocremonium* vrste u Vinovoj lozi sa simptomima eske i petrijeve bolesti; *Agronomski glasnik*, 79(1-2), 15-24.
20. Moreno-Sanz, P., Lucchetta, G., Zanzotto, A., Loureiro, M.D., Suarez, B., Angelini, E. (2013): Fungi associated to grapevine trunk diseases in young plants in Asturias (Northern Spain); *Horticultural Science*, 40(3), 138–144.
21. Newsome, J. (2012): Review Grapevine trunk disease; 20.
22. Mondello, V., Songy, A., Battiston, E., Pinto, C., Coppin, C., Trotel-Aziz, P., Clement, C., Mugnai, L., Fontaine, F. (2018): Grapevine trunk diseases: A review if fifteen years of trials for their, control with chemicals and biocontrol agents; *Plant disease*, 102(7), 1189-1217.
23. Moret, F., Lemaître-Guillier, C., Grosjean, C., Clément, G., Coelho, C., Negrel, J., Jacquens, L., Morvan, G., Mouille, G., Trouvelot, S. (2020): Clone-Dependent Expression of Esca Disease Revealed by Leaf Metabolite Analysis; *Plant Science*, 9 (1960), 1-12.
24. Mundy, D.C., Manning, M.A. (2010): Ecology and management of grapevine trunk diseases in New Zealand; *New Zealand Plant Protection*, 63, 160-166.
25. Nascimento, T., Sofia, J., Goncalves, M.T., Rego, C. (2013): Contribution for a better understanding of grapevine fungal trunk diseases in the Portuguese Dao Wine region; *Phytopatologica Mediterranea*, 52(2), 324-334.
26. Nascimento, T., Rego, Ceclia., Oliveira, H. (2007): Potential use of chitosan in the control of grapevine trunk diseases; *Phytopatologica Mediterranea* 46(2), 218–224
27. Rego, C., Nascimento, T., Cabral, A., Silva, M.J., Oliveira, H. (2009): Control of grapevine wood fungi in commercial nurseries; *Phytopatologica Mediterranea*, 48(1), 128–135.



28. Sofia, J.M.E.C. (2018): Esca complex in the Dao Wine Region (Portugal); University Coimbra, 122.
29. Stempien, E., Pierron R.J.G., Adendorf, I., Van Jarsfeld, W.J., Halleen, F., Mostert, L. (2020): Host defence activation and root colonization of grapevine rootstocks by the biological control fungus *Trichoderma atroviride*; Phytopathologia Mediterranea, 59(3), 615-626
30. Turconi, P. (2020): Trichoderma and Esca disease; Agridaeus, 1-7.

**SAGLASNOST PREDLOŽENOG/IH MENTORA I DOKTORANDA SA  
 PRIJAVOM**

Odgovorno potvrđujem da sam saglasan sa temom koja se prijavljuje.

Mentor	Prof. dr Nedeljko Latinović	
Doktorand	Mr Bogoljub Kandić	

**IZJAVA**

Odgovorno izjavljujem da doktorsku disertaciju sa istom temom nisam prijavio ni na jednom drugom fakultetu.

U Podgorici,  
 05.12.2022.

Mr Bogoljub Kandić

