

**PREIZKUŠANJE NEKATERIH FUNGICIDOV ZA ZATIRANJE SIVE PLESNI
(*Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel) NA VINSKI TRTI (*Vitis vinifera* L.) IN
VPLIV NJIHOVIH OSTANKOV NA POTEK SPONTANE VINSKE
FERMENTACIJE**

Franc ČUŠ¹, Zora KOROŠEC-KORUZA², Franci CELAR³, Ana GREGORČIČ⁴, Helena
BAŠA-ČESNIK⁵, Neža ČADEŽ⁶ in Peter RASPOR⁷

^{1,2,3} Univerza v Ljubljani, Oddelek za agronomijo

^{4,5} Kmetijski inštitut Slovenije

^{6,7} Univerza v Ljubljani, Oddelek za živilstvo, Jamnikarjeva 101, SI-1111 LJUBLJANA

IZVLEČEK

V triletnem obdobju (2002-2004) smo izvajali poljske poskuse za preverjanje učinkovitosti iprodiona, vinklozolina, pirimetanila in ciprodinila+fludioksonila za zatiranje sive plesni na grozdju pri sorti Rebula na lokaciji Hruševlje v Goriških Brdih v letih 2002-2004 ter v letu 2004 na dodatni lokaciji na Slapu pri Vipavi. Po dveh aplikacijah sredstev smo tik pred trgatvijo ocenili okužbo grozdov s sivo plesnijo (Unterstenhöfferjeva lestvica) in izračunali stopnjo okužbe (Thownsend-Heubergerjeva enačba). V vseh treh letih smo ob trgatvi določili tudi količino ostankov aktivnih snovi na grozdju s pomočjo plinskega kromatografa z masno selektivnim detektorjem. V triletnem obdobju smo izvedli spontane vinske fermentacije za vsako obravnavanje in spremljali njihovo dinamiko (HPLC) ter sledili deleže posameznih vrst kvasovk (PCR RFLP rDNK). Okužba s sivo plesnijo je bila v vseh letih dokaj majhna, kljub temu pa lahko uporabljena sredstva razvrstimo po vrstnem redu glede na učinkovitost: ciprodinil+fludioksonil, ki mu sledi pirimetanil, slabšo učinkovitost pa sta pokazala iprodion in vinklozolin. Količine aktivnih snovi na grozdju v mg/kg niso presegle dovoljenih vrednosti v nobenem letu in so bile nižje v letih z višjimi poletnimi temperaturami zraka in manj padavinami (2003) kot pa v letih z nižjimi poletnimi temperaturami zraka in večjo količino padavin (2002 in 2004). Ostanke aktivnih snovi na grozdju, so kljub temu, da so bili pod dovoljenimi vrednostmi, vplivali na rast in razvoj populacije ne-*Saccharomyces* vrst v začetnih fazah spontane fermentacije in s tem na njeno dolžino in kinetiko pojavljanja posameznih vrst kvasovk med procesom.

Ključne besede: Rebula, *Botrytis cinerea*, ostanki fungicidov, kvasovke, vino

ABSTRACT

**TESTING OF SOME FUNGICIDES AGAINST GREY MOULD (*Botryotinia fuckeliana*
(de Bary) Whetzel) ON GRAPEVINE (*Vitis vinifera* L.) AND IMPACT OF THEIR
RESIDUES ON COURSE OF SPONTANEOUS WINE FERMENTATION**

In the three-year period (2002-2004) efficiency of iprodione, vinclozolin, pyrimethanil and cyprodinil+fludioxonil against the grey mould on grapes were estimated. The field trials on variety Rebula were performed in Hruševlje (2002-2004) and Slap near Vipava (2004). After two applications of the fungicides the infection of grapes with the grey mould was evaluated (Unterstenhöffer scale) and the level of the susceptibility for each grapevine was calculated (Thownsend-Heuberger formula). Each year of the experiment the amounts of fungicide residues were determined with the combination of GC and MS detector and also the spontaneous wine fermentation were carried out for the each treatment. Their dynamics were followed by HPLC and determination of the yeast species in the different phases of the

¹univ. dipl. inž. agr. in živ. Teh., Jamnikarjeva 101, SI-1111 Ljubljana

²izr. prof. dr., Jamnikarjeva 101, SI-1111 Ljubljana

³doc. dr., Jamnikarjeva 101, SI-1111 Ljubljana

⁴dr., Hacquetova 17, SI-1001 Ljubljana

⁵mag., Hacquetova 17, SI-1001 Ljubljana

⁶univ. dipl. biol., Jamnikarjeva 101, SI-1111 Ljubljana

⁷prof. dr., Jamnikarjeva 101, SI-1111 Ljubljana

process were done (PCR RFLP of rDNA). Infection of grapes with the grey mould was very low on both locations. However, the fungicides used in our experiment could be ranged according to their efficiency: cyprodinil+fludioxonil followed by pyrimethanil; lower efficiency was recorded for iprodione and vinclozolin. In the experimental years the fungicide residues detected on the grapes did not overcome the permitted levels for grapes and were higher in the year with higher summer day temperatures and lower precipitation (2003) in comparison to the years with lower summer day temperatures and higher precipitation (2002 and 2004). In spite of the low level of fungicide residues found on grapes, they influenced the duration of the spontaneous fermentation and had also impact on the shares of the yeast species during the early stages of the fermentation.

Keywords: Rebula, *Botrytis cinerea*, fungicide residues, yeasts, wine

1. UVOD

Sorta Rebula spada med najpomembnejše bele sorte v vinorodni deželi Primorska in je občutljiva na sivo plesen (*Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel). Siva plesen lahko okuži vse organe vinske trte, vendar povzroča največjo škodo ob okužbi grozdov (Maček, 1990). Vinogradnik mora ustrezno ukrepati za zmanjšanje možnosti okužbe s sivo plesnijo na grozdju, med katere štejemo predvsem izbiro gojitvene oblike in obremenitev trsov, ustrezno gnojenje z dušikom, pravočasno in pravilno opravljena zelena dela in ustrezno strategijo varstva s kemičnimi sredstvi (Rosslenbroich in Steubler, 2000). Z uporabo fungicidov pa ne zaviramo samo razvoja škodljivih mikroorganizmov na vinski trti, ampak lahko vplivamo tudi na združbo mikroorganizmov grozdne jagode in posledično na potek vinske fermentacije. Vpliv ostankov aktivnih snovi fitofarmaceutskih sredstev v moštu na potek fermentacije je odvisen od kemijske skupine, kateri aktivna snov pripada in tipa fermentacije, ki je lahko spontana ali vzpodbujena (Viviani-Nauer in sod., 1997; Cabras in sod., 1999). Predvsem za spontano vinsko fermentacijo v literaturi ni dovolj podatkov o vplivu ostankov aktivnih snovi na njeno dinamiko in populacijo mikroorganizmov med procesom. Zato smo v našem poskusu želeli ovrednotiti učinkovitost nekaterih fungicidov za zatiranje sive plesni, preveriti količino ostankov aktivnih snovi na grozdju ob trgatvi in določiti vpliv ostankov aktivnih snovi na kinetiko spontane fermentacije in populacijsko dinamiko kvasovk.

2. MATERIAL IN METODE

Poskus je bil postavljen v bločni zasnovi v vinogradu sorte Rebula na lokaciji Hruševlje v vinorodnem okolišu Goriška Brda v letih od 2002 do 2004 ter v letu 2004 tudi v vinogradu iste sorte na lokaciji slap v Vipavski dolini. Gojitvena oblika v vinogradu na lokaciji Hruševlje je bila enojni Guyot, na Slapu pa dvojni Guyot. Aktivne snovi vključene v poskus, pripadajoče kemijske skupine, trgovska imena pripravkov ter odmerki in poraba vode na ha so navedeni v preglednici 1.

Preglednica 1: Aktivne snovi, pripadajoče kemijske skupine, trgovska imena pripravkov in odmerki sredstev ter poraba vode na ha.

Table 1: Active substances, their chemical groups, trade names of the plant protection products, applied dosage and volume of water used per ha.

Aktivna snov	Kemijska skupina	Trgovsko ime pripravka	Odmerek	Poraba vode (l/ha)
Iprodion	Dikarboksimidi	KIDAN	3000 ml/ha	500
Pirimetamil	Anilinopirimidini	MYTHOS	2500 ml/ha	500
Ciprodinil	Anilinopirimidini	SWITCH 62,5 WG	800 g/ha	400
Fludioksonil	Fenilpiroli			

Obravnavanja v našem poskusu so predstavljala kombinacijo različnih aktivnih snovi fungicidov ob prvem in drugem škropljenju in so navedena v preglednici 2. Pri aplikaciji sredstev smo uporabili nahrbtno škropilnico SOLO port 423. Škropili smo samo v območju grozdja. V vseh letih smo izvedli dve škropljenji: prvo ob zapiranju grozdov (razvojni stadij 29-30 po sistemu Eichhorn-Lorenz) in drugo v začetku zorenja jagod (razvojni stadij 36). Pred obema škropljenjema smo opravili potrebna zelena dela: pletev zalistnikov in odstranjevanje listov v območju grozdja.

Preglednica 2: Obravnavanja v našem poskusu, glede na uporabljena sredstva ob prvem in drugem škropljenju.

Table 2: Treatments in our trial according to used fungicides at first and second spraying date.

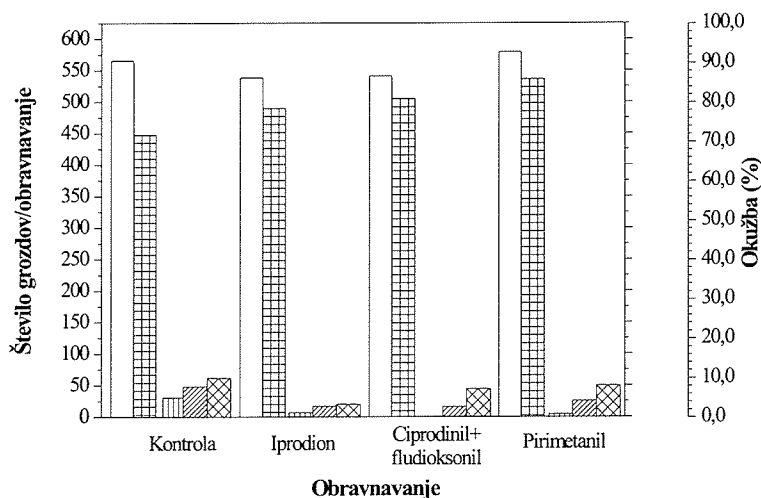
Aktivna snov ob 1. škroplj.	Aktivna snov ob 2. škroplj.	Oznaka obravnavanja
Iprodion*	Iprodion	IPRODION
Fenheksamid	Pirimetanil	PIRIMETANIL
Ciprodinil in fludioksonil	Ciprodinil in fludioksonil	CIPRODINIL+FLUDIOKSONIL
-	-	KONTROLA

* namesto iprodiona smo v letu 2004 v obeh terminih uporabili fungicid z aktivno snovjo vinklozolin.

Približno teden dni pred trgatvijo smo ocenili okužbo grozdja s sivo plesnijo po Unterstehöfferjevi lestvici (Smernica za ..., 1996) in izračunali stopnjo okužbe po Thowsend-Heubergerjevi enačbi (Manual für ..., 1981) za vsak trs posebej. Ob trgatvi smo povzorčili dva kg grozdja za določitev količine ostankov aktivnih snovi na grozdju z uporabo kombinacije plinske kromatografije in masne spektrometrije (GC/MS) (Baša-Česnik in Gregorčič, 2003). Preostanek grozdja iz posameznega obravnavanja smo potrgali in aseptično stisnili v mošt. Za vsako obravnavanje smo izvedli spontane (brez dodatka starterske kulture) fermentacije v treh ponovitvah. Volumni fermentorjev so bili 5000 ml (2002), 550 ml (2003) in 200 ml (2004). V letih 2002 in 2004 moštu nismo dodali žvepla, v letu 2003 pa smo žveplali do koncentracije žvepla 30 mg/l. Temperatura zraka v prostoru, kjer so potekale fermentacije, je bila med 18-20 °C. Dinamiko fermentacij smo spremljali s tehtanjem fermentorjev in s tekočinsko kromatografijo (koncentracije glukoze, fruktoze in etanola). Populacijo kvasovk med fermentacijo smo spremljali z vzorčenjem mošta ob različnih časih glede na dinamiko fermentacije in nacepljanjem na YM plošče, izolacijo predstavnikov morfoloških skupin in njihovo naknadno identifikacijo s pomočjo metode PCR RFLP rDNK (Möller in sod. 1992; Raspor in sod., 2001) in testi klasične identifikacije (Kurtzman in Fell, 1998; Yarow, 1998).

3. REZULTATI

Na tem mestu prikazujemo rezultate za leto 2002 (slike 1, 3 in 4), razen za ostanke aktivnih snovi na grozdju (slika 2), kjer so prikazani rezultati vseh treh let poskusa.



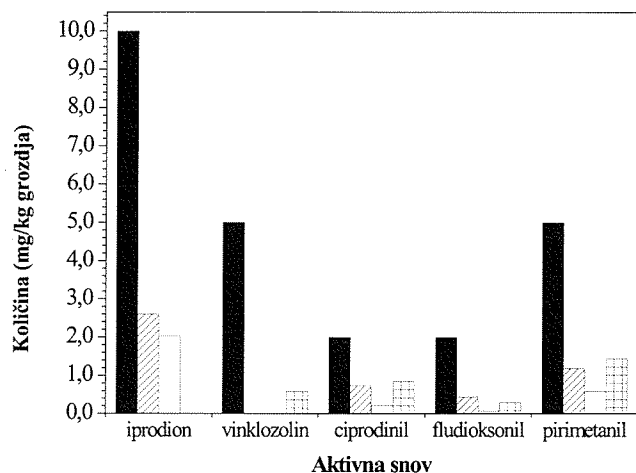
Slika 1: Število vseh (□) in število zdravih (⊞) grozdov ocenjenih na obravnavanje (32 trt) ter mediana (▨), povprečje (▩) in standardni odklon od povprečja okužbe grozdov (⊗) na lokaciji Hruševlje v letu 2002.

Figure 1: Number of all (□) and number of healthy (⊞) grapes per treatment (32 vines were estimated) and median (▨), average (▩) and standard deviation (⊗) of grape infection on location Hruševlje in 2002.

Na sliki 1 je prikazana učinkovitost sredstev po obravnavanjih z mediano in povprečjem okužb. Okužbe z sivo plesnijo so bile na lokaciji Hruševlje v tem letu precej nizke. Vrstni red median okužbe od najmanjše proti največji je bil sledeč: ciprodinil+fludioksonil (0,0), pirimetanil (0,9), iprodion (1,3) in kontrola (5,1). Delež popolnoma zdravih grozdov od vseh grozdov na 32 trtah v posameznem obravnavanju se ni bistveno razlikoval med obravnavanji, kjer smo uporabili sredstva (ciprodinil+fludioksonil (93,3 %), pirimetanil (92,6 %) in iprodion (91,1 %)), je pa odstopalo obravnavanje kontrola (79,3 %).

Na sliki 2 so prikazani ostanki aktivnih snovi na grozdju v vseh treh letih. V nobenem letu največje dovoljene vrednosti ostankov (MRL) niso bile presežene. Najnižje so bile v letu 2003, ki je bilo zelo sušno in vroče in precej podobne v letih 2002 in 2004. Ob najvišjih vrednostih so količine aktivnih snovi na grozdju dosegle 42,0 % (ciprodinil, 2004), 28,8 % (pirimetanil, 2004), 26,0 % (iprodion, 2002) in 21,5 % (fludioksonil, 2002) najvišje dovoljene vrednosti za posamezno aktivno snov.

Potek spontane fermentacije in populacijska dinamika kvasovk sta prikazana na sliki 3 (kontrola in iprodion) in sliki 4 (ciprodinil+fludioksonil in pirimetanil). Dolžina eksponentne in stacionarne faze rasti kvasovk je bila različna med obravnavanji, kar je najbolj razvidno iz dolžin fermentacij: 36 dni pri obravnavanjih kontrola in iprodion



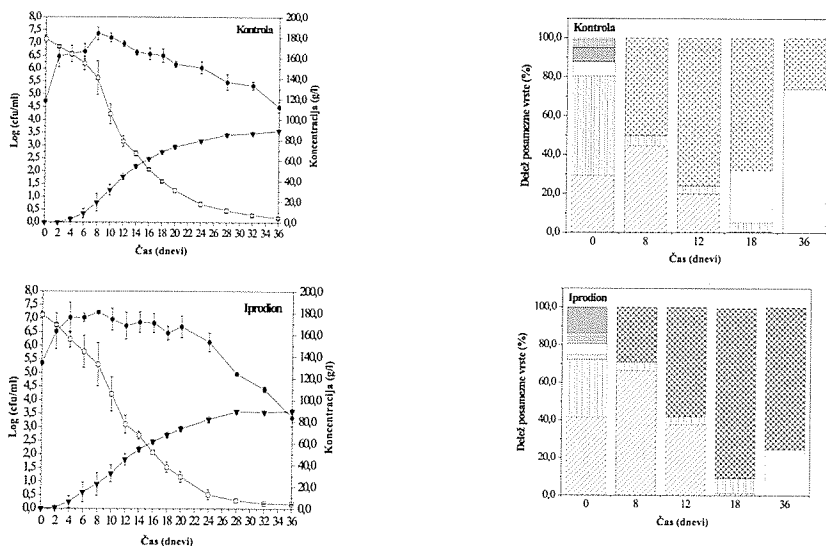
Slika 2: MRL vrednosti (■) in ostanki aktivnih snovi na grozdju v letih 2002 (▨), 2003 (□) in 2004 (⊞).

Figure 2: MRL's and fungicide residues on grapes in 2002 (▨), 2003 (□) and 2004 (⊞).
50 dni obravnavanje ciprodinil+fludioksonil in 68 dni obravnavanje pirimetanil.

Fermentacije so trajale relativno dolgo, zaradi aseptičnih razmer pri trgatvi in predelavi grozdja, kar je vplivalo na nizko začetno število kvasovk v moštu (4,54 (pirimetanil) - 5,31 (iprodition) log cfu/ml). Poglavitne razlike v sestavi kvasovk v moštu med obravnavanji so bile v deležu vrst *Hanseniaspora uvarum* (48,9 % (pirimetanil), 41,5 % (iprodition), 31,7 % (ciprodinil+fludioksonil) in 29,3 % (kontrola)) in *Candida stellata* (65,9 % (ciprodinil+fludioksonil), 51,2 % (kontrola), 35,6 % (pirimetanil) in 30,6 % (iprodition)) na začetku fermentacije (čas 0 dni), v času določitve kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* v večjem deležu (kontrola (8 dan, 50,1 %), iprodion (8 dan, 29,1 %), ciprodinil+fludioksonil (7 dan, 43,0 %) in pirimetanil (12 dan, 63,0 %)) in v času ter obsegu pojavljanja kvasovke *Dekkera bruxellensis*, ki spada med kvarljivce vina. Na koncu posameznih fermentacij smo določili naslednje deleže te kvasovke: 73,8 % (kontrola), 73,4 % (pirimetanil), 24,5 % (iprodition) in 8,6 % (ciprodinil+fludioksonil).

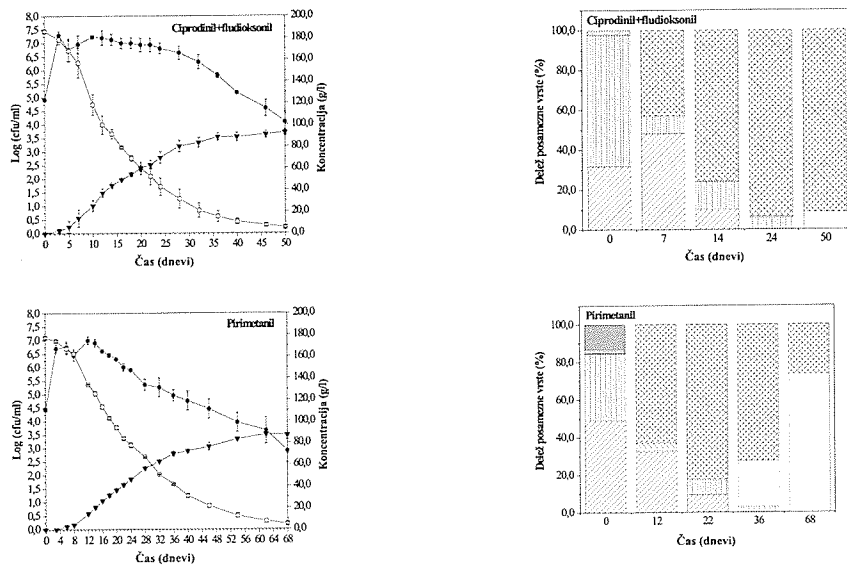
4. SKLEPI

Na podlagi rezultatov lahko trdimo, da ob primerni gojitveni obliki, bujnosti rasti in ampelotehniko ter "normalnih" količinah padavin (lokacija Slap, 2004) uporaba fungicidov za varstvo pred sivo plesnijo ni nujna. Učinkovitost sredstev v našem poskusu od največje proti najmanjši je bila sledeča: ciprodinil+fludioksonil in fenheksamid (rezultati niso prikazani), pirimetanil in iprodion ter vinklozolin. Ob pravilni uporabi sredstev lahko pričakujemo, da bodo ostanki aktivnih snovi pod dovoljenimi količinami. Ostanki preiskovanih aktivnih snovi so bili večji v letih z višjimi poletnimi temperaturami in manjši v letih z višjo količino poletnih padavin (2004>2002>2003).



Slika 3: Deleži posameznih vrst kvasovk in dinamika spontanij fermentacij mošta pri obravnavanijh kontrola in iprodion v letu 2002. Legenda: -●- log (cfu/ml), -□- skupni sladkor, -▼- etanol; ▨ *Hanseniaspora uvarum*, ▩ *Candida stellata*, ▧ *Rhodotorula glutinis*, ▤ *Pichia kluyveri*, ▦ *Sporobolomyces roseus*, ▨ *Cryptococcus liquefaciens*, ▩ *Dekkera bruxellensis*, ▧ *Saccharomyces cerevisiae*.

Figure 3: Percentage of yeast species in must and dynamic of spontaneous wine fermentation in control and iprodione treatments in 2002. Legend: -●- log (cfu/ml), -□- sugar, -▼- ethanol; ▨ *Hanseniaspora uvarum*, ▩ *Candida stellata*, ▧ *Rhodotorula glutinis*, ▤ *Pichia kluyveri*, ▦ *Sporobolomyces roseus*, ▨ *Cryptococcus liquefaciens*, ▩ *Dekkera bruxellensis*, ▧ *Saccharomyces cerevisiae*.



Slika 4: Deleži posameznih vrst kvasovk in dinamika spontanij fermentacij mošta sorte Rebula pri obravnavanjih ciprodinil+fludioksonil in pirimetanil v letu 2002. Legenda: -●- log (cfu/ml), -□- skupni sladkor, -▼- etanol; ■ *Hanseniaspora uvarum*, ▨ *Candida stellata*, ▩ *Pichia kluyveri*, ▪ *Pichia* sp., ▫ *Sporobolomyces roseus*, ▬ *Cryptococcus liquefaciens*, ▭ *Dekkera bruxellensis*, ▮ *Saccharomyces cerevisiae*.

Figure 4: Percentage of yeast species in must and dynamic of spontaneous wine fermentation in cyprodinil+fludioxonil and pyrimethanil treatments in 2002. Legend: -●- log (cfu/ml), -□- sugar, -▼- ethanol; ■ *Hanseniaspora uvarum*, ▨ *Candida stellata*, ▩ *Pichia kluyveri*, ▪ *Pichia* sp., ▫ *Sporobolomyces roseus*, ▬ *Cryptococcus liquefaciens*, ▭ *Dekkera bruxellensis*, ▮ *Saccharomyces cerevisiae*.

Koncentracija kvasovk in deleži vrst kvasovk na grozdju in v moštu so bili odvisni od uporabe fungicidov v vinogradu. Sestava populacije vrst kvasovk v moštu je bila v povezavi s sestavo vrst kvasovk na grozdju (Čadež in sod., neobjavljeni rezultati). Ostanki aktivnih snovi fungicidov so vplivali na potek spontane vinske fermentacije in sicer na trajanje procesa, kinetiko rasti vinskih kvasovk med fermentacijo ter na sestavo vrst in sevov kvasovk *S. cerevisiae* (rezultati niso prikazani) med procesom.

5. ZAHVALA

Avtorji se zahvaljujemo gospodoma R. Peršolji in J. Gregoriču (STS Vrhpolje pri Vipavi - KGZS, KGZ NG) za gostovanje v vinogradih, diplomantom V. Juretič, A. Amalietti, A. Usenik, M. Simčiču in N. Kračun ter Mateju Šerganu in Urški Debelak iz laboratorija Katedre za biotehnologijo za pomoč pri izvedbi poskusa. Raziskavo sta podprli Ministrstvo za visoko šolstvo, znanost in tehnologijo ter Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano (Oznaka projekta V4-0591-01).

6. LITERATURA

- Baša-Česnik, H., Gregorčič, A. 2003. Multirezidualna analizna metoda za določevanje ostankov pesticidov v sadju in zelenjavi. Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, 82, 2: 167-180.
- Cabras, P., Angioni, A., Garau, V. L., Pirisi, F. M., Farris, G. A., Madau, G., Emonti, G. 1999. Pesticides in Fermentative Processes of Wine. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 47: 3854-3857.
- Kurtzman, C.P., Fell, J.W. 1998. The yeasts, a taxonomic study. 3rd ed. Amsterdam, Elsevier: 1055 str.
- Maček, J. 1990. Posebna fitopatologija. Patologija sadnega drevja in vinske trte. Ljubljana, VDO Biotehniška fakulteta, VTOZD za agronomijo: 85-91.
- Manual für Feldversuche im Pflanzenschutz. 1981. Werner Püntener (rdk.). Basel, Agro-Division, Ciba-Geigy AG: 34.
- Möller, E.M., Bahnweg, G., Sandermann, H., Geiger, H.H. 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. Nucleic Acid Research, 20, 22: 6115-6116.
- Raspor, P., Smole Možina, S., Čadež, N. 2001. Identification of yeasts from grape/must/wine system. V: Food microbiology protocols. Spencer J.F.T., Ragout de Spencer A.L. (eds.). (Methods in biotechnology: vol. 14). Totowa, Humana Press Inc.: 263-257.
- Rosslenbroich, H. J., Stuebler, D. 2000. *Botrytis cinerea* - history of chemical control and novel fungicides for its management. Crop Protection, 19: 557-561.
- Smernica za ovrednotenje učinkovitosti fungicidov: *Botrytis cinera* na vinski trti. EPPO PP 1/17(2). 1996. Evropska in mediteranska organizacija za varstvo rastlin: 20-22.
- Viviani-Nauer, A., Hoffmann-Boller, P., Gafner, J. 1997. In vivo detection of folpet and its metabolite phthalimide in grape must and wine. Am. Jour. of Enol. & Vitic., 48: 67-70.
- Yarrow, D. 1998. Methods for isolation, maintenance and identification of yeasts. V: The yeasts, a taxonomic study, 3rd ed. Kurtzman, C.P., Fell, J.W. (eds.). Amsterdam, Elsevier: 77-102