IVES Technical Reviews
vinha & vinho

https://doi.org/10.20870/IVES-TR.2024.8070

Quitosanas e doenças do lenho da videira: estudos laboratoriais e no vinhedo, resultados surpreendentes

Valérie Mayet[1], Pascal Lecomte[2], Bastien Nazaris[1], Lucile Badet[3], Charlotte Gourraud[1], Virginie Moine[1]

[1] BIOLAFFORT, 11 rue Aristide Bergès, F-33270 Floirac, France
[2] INRAE, Université de Bordeaux, ISVV, Bordeaux Sciences Agro, UMR SAVE, 71 avenue Edouard Bourleaux, BP81, F-33883 Villenave d'Ornon, France
[3] ALMAVITIS, 11 rue Aristide Bergès, F-33270 Floirac, France

O potencial das quitosananas para o controlo das doenças do lenho da videira (DLV) foi investigado no âmbito de uma parceria público-privada. Foram realizados testes *in vitro*, experiências de eficácia no vinhedo e análises laboratoriais, para compreender o seu modo de ação. *In vitro*, as quitosanas de pequeno peso molecular (PM), as mais solúveis, foram frequentemente as mais eficazes. No vinhedo, os melhores desempenhos foram aqueles com PM médio, em particular os cloridratos de quitosana, formando uma película protetora. Estes podem ser usados como penso das feridas de poda, corte ou curetagem.

A quitosana é um produto natural extraído da quitina das paredes de fungos, das conchas de crustáceos ou insetos. É utilizado em muitos domínios (medicina, tratamento de águas residuais, cosméticos, etc.), incluindo a enologia[1]. Na proteção de culturas, a quitosana também é conhecida pelas suas propriedades antivirais, antibacterianas, antifúngicas e por contribuir para as defesas naturais das plantas[2]. No entanto, o seu modo de ação no combate direto de pragas vegetais ainda é pouco compreendido. Nas videiras, a quitosana de origem fúngica é uma substância básica aprovada como elicitora dos mecanismos de defesa da planta. Para melhor compreender a variabilidade na eficácia das quitosananas e identificar o melhor candidato para a utilização na videira, foi realizado um estudo de parceria desde 2016. Assim, foram avaliadas 23 quitosananas, mas apenas 16 foram submetidas a vários testes: 7 quitosanas extraídas de crustáceos (OCe3, Ce20, Ca50, J80, S674 e dois cloridratos de quitosana, HA e HS), 5 de fungos (OF3, Fda30, LF43, F329 e cloridrato de quitosana H90) e 4 de insetos (OY5, Y40, Y350 e Y903). As letras identificam as quitosanas, os números indicam o seu PM (kDa) quando conhecido.

In vitro: mais leve, mais eficaz!

A capacidade das quitosananas inibirem o crescimento micelial de dois fungos patogénicos, implicados em doenças do lenho *(Eutypa lata*, *eutypiosis* e *Phaeomoniella chlamydospora*, esca), foi avaliada pela primeira vez em laboratório. Uma vez que apenas oligoquitosanas e cloridratos são solúveis em água, foi desenvolvido um método original (Figura 1).

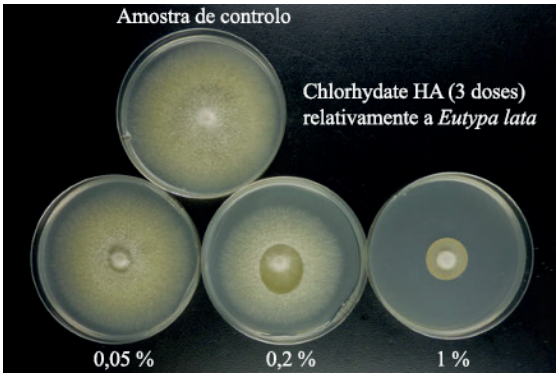


FIGURA 1. Ilustração do método original utilizado para testar quitosanas. Uma alíquota de 300µl é depositada no centro e na superfície de um meio ágar numa placa de Petri. Após a secagem, um *pellet* de micélio é colocado no centro do círculo que contém o produto. A eficácia é calculada medindo o diâmetro da colónia micelial, e comparando-a com o de uma amostra controlo não tratada.

Para as 3 concentrações testadas (0,05; 0,2 e 1%), as quitosanas S674, F329, Y350 e Y903, de PM alto (> 300 kDa), independentemente do agente patogénico, apresentaram consistentemente os menores níveis de eficácia. Por outro lado, as melhores percentagens de eficácia foram observadas com oligoquitosanas (menor PM ≤ a 5 kDa). A origem da quitosana (fungo, crustáceo ou inseto) não pareceu ter qualquer influência nos níveis de eficácia. Assim, os melhores candidatos contra esses dois fungos patogénicos foram oligoquitosanas e quitosanas com PM médio (variação de 5 a 130 kDa) (Tabela 1).

TABELA 1. Efeito das quitosanas, de diferentes origens, testadas *in vitro* na dose de 1% sobre o crescimento micelial de *E. lata* e *P. chlamydospora*. Na maioria das vezes, os produtos foram testados duas ou três vezes.

Quitosanas		Eficácia (%)	
		E. lata	*P. chlamydospora*
Crustáceos	OCe3	**100 ± 0**	**57 ± 18**
	Ce20	**91**	**75**
	CA50	**85 ± 3**	**78 ± 3**
	J80	**35**	**46**
	HA*	**92 ± 1**	**46 ± 22**
	SH*	**90 ± 3**	**43 ± 7**
	S674	**0 ± 0**	**3 ± 4**
Fungo	OF3	**100 ± 0**	**59 ± 11**
	FDA30	**87**	**41**
	LF43	**87 ± 5**	**69 ± 24**
	H90	**86 ± 6**	**45 ± 24**
	F329	**4 ± 6**	**5 ± 7**
Inseto	OY5	**92 ± 1**	**74 ± 17**
	Y40	**90 ± 1**	**62 ± 28**
	Y350	**2 ± 3**	**0 ± 0**
	Y903	**2 ± 3**	**18 ± 6**

*PM desconhecido

No vinhedo: mais leves, menos eficiazes!?

Desde 2016, experiências em vinhedos permitiram avaliar a capacidade da quitosana em proteger feridas de poda contra doenças do lenho, de acordo com o método oficial CEB n°155[3] [4], baseado em infeções artificiais. A eficácia é avaliada de acordo com as taxas de infeção das feridas (30 vides por produto) e pela quantidade dos toros de madeira infetados por ferida (25 toros analisados por vide), em comparação com uma amostra controlo não tratada.

O LF43 (fúngico) foi o primeiro a ser testado no vinhedo, contra *E. lata* (2016, 2017) e *P. chlamydospora* (2017). Utilizado como medida preventiva, através da aplicação por pincelada em feridas de poda na dose de 30%, o LF43 foi ineficaz contra *P. chlamydospora*, mas muito eficaz contra *Eutypa lata* (71% e 77% de eficácia em 2016 e 2017, respetivamente). Infelizmente, a propensão do produto a rachar à medida que seca e o seu custo, desencorajaram estudos mais aprofundados.

A tradução deste artigo para português foi-lhe oferecida pela Sogrape. Consulte https://sogrape.com/pt/sustentabilidade

TABELA 2. Resultados de experiências criadas como medida preventiva no vinhedo em 2018, 2019 e 2021 para avaliar a eficácia preventiva de diferentes quitosanas.

	Eutypa lata		***Phaeomoniella chlamydospora***	
Experiências de 2018 e 2019	215 ascósporos inoculados (2018)		1786 conídios inoculados (2018)	
	355 ascósporos inoculados (2019)		1960 conídios inoculados (2019)	
	Taxa de infeção **Eficácia (%)**		Taxa de infeção **Eficácia (%)**	
	Feridas de poda * n = 30	Toros** n = 750 (30 x 25)	Feridas de poda * n = 30	Toros** n = 750 (30 x 25)
Amostra controlo inoculada (2018 – 2019)	80 [a] – 83,3 [a]	27,2 – 32,9	96,6 [ab] – 100 [a]	47,3 – 50,8
OCe3 pulverizado a 5% (2018)	60 [a] **25**	16,1 **NS** **40,7**	86,7 [ab] **10,2**	38 **NS** **19,7**
OCe3 pulverizado a 10% (2019)	83,3 [a] **0**	36,4 **NS** **0**	96,7 [a] **3,3**	47,7 **NS** **6**
OCe3 pulverizado a 15% (2019)	86,7 [a] **0**	34 **NS** **0**	93,3 [a] **6,7**	44,7 **S** **12,1**
H90 10% pincelado (2019)	33.3 [b] **60**	13,8 **S** **57,9**	33,3 [b] **66,7**	8,9 **S** **82,4**
	Eutypa lata		***Phaeomoniella chlamydospora***	
Experiência 2021	431 ascospores inoculées		1965 conidies inoculées	
	Feridas de poda * n = 30	Toros** n = 750 (30 x 25)	Feridas de poda * n = 30	Toros** n = 750 (30 x 25)
Amostra controlo inoculada	63,3 [a]	22	88 [a]	24,3
HA pulverizado a 2 %	24,1 [b] **61,8**	6,9 **HS** **68,6**	75 [ab] **14,8**	13,6 **NS** **44,2**
HA pincelado a 5%	23,3 [b] **63,2**	1,1 **THS** **95,2**	76,9 [b] **12,6**	15,8 **NS** **34,8**

* Para feridas de poda, as letras ([a, ab, b]) indicam grupos homogéneos resultantes da análise de variância ou de um teste de Kruskal-Wallis (os resultados de 30 feridas de poda foram divididos em 3 repetições de 10 feridas)

** Para toros de madeira (25 examinados por ferida de poda), os resultados foram divididos em 3 classes de acordo com a quantidade de toros infetados por ferida: [0-5], [6-10], [11-25]. As distribuições são então comparadas por um teste de comparação de distribuição χ^2. Cada modalidade tratada foi comparada com o controlo inoculado não tratado. NS = não significativo; S = significativo (α = 5%); SH = Altamente significativo (α = 1%); THS = muito significativo (α = 0,1%).



FIGURA 2. Ferida de poda Cabernet Sauvignon tratada com aplicação por pincelada de cloridrato de quitosana. Fotografia tirada imediatamente após a aplicação.

A escolha recaiu então pela oligoquitosana OCe3, que apresenta um bom desempenho *in vitro*, e cloridrato de H90, em base exploratória (Tabela 2). Testado em 2018 e 2019, em doses de 5, 10 e 15%, o OCe3 não reduziu suficientemente as infeções de feridas de poda com *E. lata* e *P. chlamydospora* (eficácia ainda inferior a 25%). Este resultado foi muito surpreendente em termos de testes *in vitro* (boa eficácia). Por outro lado, o H90, aplicado em 2019 a 10%, controlou significativamente as infeções dos 2 agentes patogénicos (respetivamente 60% e 58% de eficácia na poda de feridas e toros com *E. lata*, e 67% e 82% de eficácia com *P. chlamydospora*). Enquanto a alta viscosidade do cloridrato dificultava a aplicação por pulverização, quando aplicado por pincelada, formava uma barreira protetora (Figura 2).

Uma nova experiência foi realizada em 2021 com cloridrato de HA, aplicado preventivamente por pulverização (P) a 2%, ou por pincelada (B) a 5% (Tabela 2). Com *E. lata*, o HA reduziu significativamente as infeções (eficácia de 62% em P e 63% em B). Este efeito foi confirmado em relação às taxas de toros infetados por ferida: 68% de eficácia em P e 95% em B. Com *P. chlamydospora*, o HA não reduziu significativamente as infeções da ferida (14% e 12% de eficácia). Por outro lado, em relação às taxas de toros infetados com o agente patogénico, o efeito do produto pareceu ser melhor: 44% em P e 34% em B, mas não confirmado estatisticamente. Esta diferença de eficácia, dependendo da aplicação e do fungo estudado, sugeriu um efeito barreira cuja eficácia estaria relacionada com a PM e solubilidade do produto, e ao tamanho dos esporos depositados na película protetora gerada pelo produto após a sua aplicação.

Investigando o modo de ação do cloridrato de quitosana

Para compreender melhor o contraste dos resultados entre os ensaios *in vitro* e *in vivo*, foi realizado um estudo adicional: também derivado do método CEB 155, cortando os tecidos subjacentes das feridas em dez anilhas de cerca de 1 mm de espessura. Este método permite ver a que profundidade os fungos se instalam. Seis fórmulas, todas doseadas a 5%, foram aplicadas por pincelada, como medida preventiva, em feridas de poda: oligoquitosanas OF3 e OCe3, quitosanas, LF43 e Ca50 e cloridratos, H90 e HS. Os resultados mostraram eficácia total de H90 e HS (100%) contra *E. lata* e *P. chlamydospora*, os produtos que impedem a penetração de esporos abaixo da superfície da ferida. As quitosanas LF43 e Ca50 mostraram efeitos moderados (43-60% de eficácia) contra *E. lata*, e nenhum efeito contra *P. chlamydospora*. As oligoquitosanas OCe3 e OF3 não mostraram eficácia (0 a 34%). Este estudo complementar confirmou o efeito de barreira das quitosana de PM médio e, em particular, dos cloridratos solúveis em água.

Conclusão

Embora os testes realizados inicialmente em laboratório tenham demonstrado que as oligoquitosanas tinham um bom potencial de controlo contra dois fungos patogénicos do lenho, foram as quitosanas, em particular, devido à sua solubilidade em água, as que foram as mais capazes de proteger feridas de poda no vinhedo, com eficácia média de 57% em *E. lata* para HA aplicado por pincelada (2 experiências em 2021). À medida que o cloridrato seca e provavelmente se aglomera, parece ser capaz de reter esporos que se podem instalar na superfície das feridas. Atuaria como um penso, pelo que o seu modo de ação seria sobretudo físico, mais fungistático do que fungicida. Poderia impedir que vários fungos patogénicos ascomicetos, caracterizados por grandes esporos, e basidiomicetos penetrassem no lenho, protegendo assim feridas de poda ou corte, ou mesmo videiras curetadas, para evitar reinfeções muito rápidas. Deve notar-se que não foi observada toxicidade com este produto no estudo. Este trabalho foi objeto de um pedido de patente francês sob o número FR2004922. Mas ainda não está disponível qualquer formulação. ■

1 Lárez Velásquez, C. (2023). Chitosan and its applications in oenology. *OENO One, 57*(1), 121–132. https://doi.org/10.20870/oeno-one.2023.57.1.7262

2 El Hadrami, A., Adam, L. R., El Hadrami I., & Daayf, F. (2010). Chitosan in plant protection. *Marine Drugs 8*, 968-987. https://doi.org/10.3390/md8040968

3 Lecomte, P. (2005). *Méthode CEB 155 : Méthode d'étude des préparations anti-fongiques utilisées en traitement des plaies de taille (Eutypiose).*

4 Reis P., Pierron, R., Larignon, P., Lecomte, P., Abou-Mansour, E., Farine, S., Bertsch, C., Jacques, A., Trotel-Aziz, P., Rego, C., &, Fontaine, F. (2019). Vitis methods available to understand and develop strategies for diagnosis and management of grapevine trunk diseases. *Phytopathology 109*(6): 916–931. https://doi.org/10.1094/Phyto-09-18-0349-RVW

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.