IVES Technical Reviews
rebe & wein

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

Chitosane und Rebholzkrankheiten: unerwartete Ergebnisse aus Labor- und Feldstudien

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

Im Rahmen einer öffentlich-privaten Partnerschaft wurde das Potenzial von Chitosanen zur Bekämpfung von Rebholzkrankheiten (RHK) untersucht. Die Wirkungsweise wurde durch *in vitro*-Tests, Feldversuche, und Laboranalysen evaluiert. Bei den *in vitro*-Versuchen waren Chitosane mit niedrigem Molekulargewicht (MG) am wirksamsten, welche zudem die beste Löslichkeit aufwiesen. Bei den Versuchen im Weinberg schnitten Chitosane mit mittlerem MG am besten ab. Besonderes Potenzial zeigten schutzfilmbildende Chitosanhydrochloride, welche als Wundschutz nach einem Rebschnitt, einer Sanierung von Rebstöcken durch Stammrücknahme oder nach einer Kürettage verwendet werden könnten.

Chitosan ist ein Naturprodukt, welches aus Chitin gewonnen wird, ein Bestandteil der Zellwände von Pilzen und der Schalen von Krustentieren und Insekten. Es wird in verschiedenen Bereichen eingesetzt (Medizin, Abwasserbehandlung, Kosmetik, usw.), darunter auch in der Önologie[1]. Im Pflanzenschutz ist Chitosan für seine antiviralen, antibakteriellen und antimykotischen Eigenschaften bekannt und unterstützt die natürliche Abwehr von Pflanzen[2]. Seine Wirkungsweise bei der direkten Bekämpfung von Pflanzenschädlingen ist allerdings noch nicht genau verstanden. Bei Weinreben ist Chitosan eine Grundsubstanz pilzlichen Ursprungs, die als Auslöser der Abwehrmechanismen der Pflanze anerkannt ist. Ab 2016 wurde in der hier vorgestellten Studie die Variabilität in der Wirksamkeit von Chitosanen untersucht, mit dem Ziel, die besten Kandidaten für den Einsatz an Reben zu identifizieren. 23 Chitosane wurden bewertet, und 16 auf dem Feld getestet: sieben Chitosane, welche von Krustentieren stammten (OCe3, Ce20, Ca50, J80, S674 und zwei Chitosanhydrochloride: HA und HS); fünf, welche von Pilzen stammten (OF3, Fda30, LF43, F329 und Chitosanhydrochlorid H90); sowie vier, welche von Insekten stammten (OY5, Y40, Y350 und Y903). Die Buchstaben kennzeichnen die Chitosane, die Zahlen geben ihr MG (kDa) an, sofern bekannt.

In vitro: je leichter, desto wirksamer!

Die Fähigkeit von Chitosanen, das Myzelwachstum zweier an der Entwicklung von Holzkrankheiten beteiligter pathogener Pilze (*Eutypa lata*: Eutypiosis, *Phaeomoniella chlamydospora*: Esca) zu hemmen, wurde zunächst im Labor untersucht. Da nur Oligochitosane und Hydrochloride in Wasser löslich sind, wurde eine neuartige Methode entwickelt (Abbildung 1).

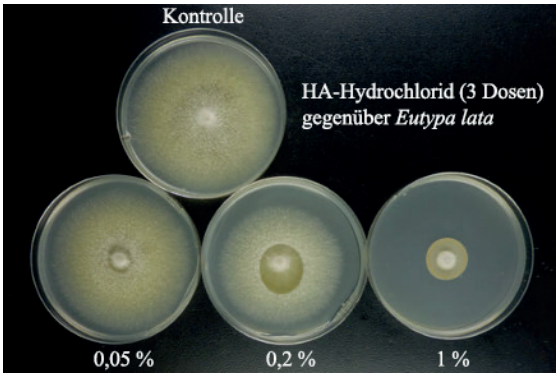


ABBILDUNG 1. Darstellung der neu entwickelten Methode zur Untersuchung der Wirkung von Chitosanen. 300 µL einer Chitosanlösung wurden in der Mitte einer Petrischale platziert, welche ein Agarmedium enthielt. In die Mitte der getrockneten Chitosanlösung wurde anschließend ein Myzelpellet gelegt. Zur Berechnung der Wirksamkeit wurde der Durchmesser der Myzelkolonie gemessen und mit dem einer unbehandelten Kontrolle verglichen.

Die Chitosane mit hohem Molekulargewicht (>300 kDa; S674, F329, Y350 und Y903) zeigten unabhängig vom getesteten Krankheitserreger bei allen getesteten Konzentrationen (0,05, 0,2 und 1 %) systematisch die geringste Wirksamkeit. Dahingegen wiesen Oligochitosane mit den niedrigsten MG (≤5 kDa) unabhängig von ihrer Herkunft (Pilz, Krustentier oder Insekt) die besten Wirksamkeitsprozentsätze auf. Somit sind die Oligochitosane die vielversprechendsten Kandidaten gefolgt von Chitosanen mit mittlerem MG (zwischen 5 und 130 kDa) (Tabelle 1).

Tabelle 1. Die Wirkung von Chitosanen unterschiedlicher Herkunft auf das Myzelwachstum von *E. lata* und *P. chlamydospora*, getestet *in vitro* bei einer Konzentration von 1 %. Die meisten Produkte wurden zwei- oder dreimal getestet.

Chitosan		Wirkungsgrad (%)	
		E. lata	*P. chlamydospora*
Krustentiere	OCe3	**100 ± 0**	**57 ± 18**
	Ce20	**91**	**75**
	Ca50	**85 ± 3**	**78 ± 3**
	J80	**35**	**46**
	HA*	**92 ± 1**	**46 ± 22**
	HS*	**90 ± 3**	**43 ± 7**
	S674	**0 ± 0**	**3 ± 4**
Pilze	OF3	**100 ± 0**	**59 ± 11**
	Fda30	**87**	**41**
	LF43	**87 ± 5**	**69 ± 24**
	H90	**86 ± 6**	**45 ± 24**
	F329	**4 ± 6**	**5 ± 7**
Insekten	OY5	**92 ± 1**	**74 ± 17**
	Y40	**90 ± 1**	**62 ± 28**
	Y350	**2 ± 3**	**0 ± 0**
	Y903	**2 ± 3**	**18 ± 6**

*MG unbekannt

Auf dem Weinberg: je leichter, desto wirksamer!?

2016 begannen die Feldversuche auf den Weinbergen zur Bewertung der Wirksamkeit von Chitosanen, künstlich infizierte Schnittwunden vor Holzkrankheiten zu schützen (gemäß der offiziell anerkannten Methode CEB Nr. 155 der *Commission des Essais Biologiques*[3 4])
Die Wirksamkeit der Behandlungen wurde anhand der Wundinfektionsraten (jeweils 30 Stämme pro Verbindung) und der Anzahl infizierter Holzstücke pro Wunde (25 pro Stamm) im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle beurteilt.
Das von Pilzen stammende LF43 wurde zuerst getestet. Es zeigte bei einer Konzentration von 30 % eine hohe Wirksamkeit gegen *E. lata* (2016: 71 %; 2017: 77 %), war jedoch unwirksam gegen *P. chlamydospora* (2017). Von weiteren Untersuchungen wurde aufgrund der Kosten des Produkts und seiner Neigung, beim Trocknen Risse zu verursachen, allerdings abgesehen.

Dieses Werk steht unter der Lizenz Creative Commons Namensnennung 4.0 International.

TABELLE 2. Die Ergebnisse der Feldversuche, die 2018, 2019 und 2021 im Weinberg durchgeführt wurden, um die präventive Wirkung verschiedener Chitosane zu untersuchen.

Versuche 2018 und 2019	***Eutypa lata***		***Phaeomoniella chlamydospora***	
	215 Ascosporen inokuliert (2018)		1786 Konidien inokuliert (2018)	
	355 Ascosporen inokuliert (2019)		1960 Konidien inokuliert (2019)	
	Infektionsrate **Wirksamkeit (%)**		Infektionsrate **Wirksamkeit (%)**	
	Rebschnittwunden* n = 30	Holzstücke** n = 750 (30 x 25)	Rebschnittwunden* n = 30	Holzstücke** n = 750 (30 x 25)
Kontrolle, inokuliert (2018–2019)	80 [a] – 83,3 [a]	27,2 – 32,9	96,6 [ab] – 100 [a]	47,3 – 50,8
OCe3, 5 %, durch sprühen (2018)	60 [a] **25**	16,1 **NS** **40,7**	86,7 [ab] **10,2**	38 **NS** **19,7**
OCe3, 10 %, durch sprühen (2019))	83,3 [a] **0**	36,4 **NS** **0**	96,7 [a] **3,3**	47,7 **NS** **6**
OCe3, 15 %, durch sprühen (2019)	86,7 [a] **0**	34 **NS** **0**	93,3 [a] **6,7**	44,7 **S** **12,1**
H90, 10 %, durch bestreichen (2019)	33.3 [b] **60**	13,8 **S** **57,9**	33,3 [b] **66,7**	8,9 **S** **82,4**
Versuch 2021	***Eutypa lata***		***Phaeomoniella chlamydospora***	
	431 Ascosporen inokuliert (2021)		1965 Konidien inokuliert (2021)	
	Rebschnittwunden* n = 30	Holzstücke** n = 750 (30 x 25)	Rebschnittwunden* n = 30	Holzstücke** n = 750 (30 x 25)
Kontrolle, inokuliert	63,3 [a]	22	88 [a]	24,3
HA, 2 %, durch sprühen	24,1 [b] **61,8**	6,9 **HS** **68,6**	75 [ab] **14,8**	13,6 **NS** **44,2**
HA, 5 %, durch bestreichen	23,3 [b] **63,2**	1,1 **THS** **95,2**	76,9 [b] **12,6**	15,8 **NS** **34,8**

* Bei den Schnittwunden wurde eine Varianzanalyse oder ein Kruskal-Wallis-Test durchgeführt (die 30 Rebschnittwunden ergeben sich aus je drei Wiederholungen von zehn Wunden) und die homogenen Gruppen sind mit Buchstaben gekennzeichnet (a, ab, b).
** Für die Holzstücke (25 pro Schnittwunde) wurden die Ergebnisse, je nach Anzahl der infizierten Holzstücke pro Wunde, in drei Kategorien eingeteilt: [0-5], [6-10], [11-25]. Anschließend wurde die Verteilung mithilfe eines Chi-Quadrat (χ^2) Verteilungstests überprüft. Jede behandelte Modalität wurde mit der jeweiligen unbehandelten, inokulierten Kontrolle verglichen. NS = nicht signifikant; S = signifikant (α = 5 %); HS = Hochsignifikant (α = 1 %); SHS = Sehr hochsignifikant (α = 0,1 %).



ABBILDUNG 2. Eine mit Chitosanhydrochlorid verschlossene Schnittwunde an einer Cabernet Sauvignon Rebe. Das Foto wurde unmittelbar nach der Anwendung aufgenommen.

Anschließend wurde das Oligochitosan OCe3 getestet, welches *in vitro* eine gute Wirksamkeit zeigte, und - auf explorativer Basis - das Hydrochlorid H90 (Tabelle 2). Trotz der guten *in vitro* Ergebnisse, zeigte sich OCe3 nach der Behandlung von Schnittwunden mit Konzentration von 5, 10 und 15 % wenig wirksam (Wirksamkeit <25 %) gegen Infektionen durch *E. lata* und *P. chlamydospora* (2018 und 2019). Dahingegen erwies sich H90 in einer 2019 durchgeführten Studie als äußerst effektiv. Wunden, welche mit 10 % H90 beschichtet wurden, zeigten einen Wirkungsgrad von 60 % (Rebschnittwunden) bzw. 58 % (Holzstücke) gegen Infektionen mit *E. lata*, und 67 % (Rebschnittwunden) bzw. 82 % (Holzstücke) gegen Infektionen mit *P. chlamydospora*. Die hohe Viskosität des Hydrochlorids erschwerte das Auftragen durch Sprühen, weshalb die Schutzbarriere aufgestrichen werden musste (Abbildung 2).
Ein neuer Versuch begann 2021, wobei vorbeugende HA-Hydrochlorid-Behandlungen durchgeführt wurden: entweder durch Sprühen (S) mit einer Konzentration von 2 % oder durch Bestreichen (B) mit einer Konzentration von 5 % (Tabelle 2). Im Falle von *E. lata* wurden Wundinfektionen deutlich reduziert (Wirksamkeit: S, 62 %; B, 63 %). Dieser Effekt wurde durch die Anzahl infizierter Holzstücke pro Wunde bestätigt (Wirksamkeit: S, 68 %; B, 95 %). Keine signifikante Reduktion hinsichtlich der Wundinfektionsraten konnte bei *P. chlamydospora* festgestellt werden (Wirksamkeit: S, 14 %; B, 12 %). Bei der Anzahl der mit dem Erreger infizierten Holzstücke schien die Wirkung dahingegen besser zu sein (Wirksamkeit: S, 44 %; B, 32 %), was sich jedoch statistisch nicht bestätigte. Dieser Unterschied in der Wirksamkeit je nach Anwendung und untersuchtem Pilz deutete auf eine Barrierewirkung hin, deren Wirksamkeit mit dem MG und der Löslichkeit des Produkts in Zusammenhang steht. Ein weiterer Faktor ist die Größe der Sporen, die sich auf dem Schutzfilm ablagern, welcher von dem Produkt gebildet wird.

Untersuchungen zur Wirkungsweise von Chitosanhydrochlorid

Um den Unterschied in den Ergebnissen zwischen den *in vitro*- und *in vivo*-Tests besser zu verstehen, wurde eine zusätzliche Studie durchgeführt. Unter Verwendung der CEB 155-Methode wurde das Gewebe unter den Wunden in zehn Scheiben mit einer Dicke von etwa 1 mm geschnitten. Anhand dieser Methode konnten wir sehen, in welcher Tiefe sich die Pilze ansiedelten. Die sechs verschiedenen Verbindungen wurden, bei einer Konzentration von 5 %, als vorbeugende Maßnahme auf Wunden aufgetragen: OF3- und OCe3-Oligochitosane, LF43- und Ca50-Chitosane, sowie H90- und HS-Hydrochloride. Die Gesamtwirksamkeit von H90 und HS gegen *E. lata* und *P. chlamydospora* betrug 100 %. Die Verbindungen verhinderten ein Eindringen der Sporen unter die Wundoberfläche. Die Chitosane LF43 und Ca50 zeigten eine mittelmäßige Wirksamkeit: 43 - 60 % gegen *E. lata*, und 0 % gegen *P. chlamydospora*. Die Oligochitosane OCe3 und OF3 zeigten keine Wirksamkeit (0 - 34 %). Diese zusätzliche Studie bestätigte somit die Barrierewirkung von Chitosanen mit mittlerem Molekulargewicht und insbesondere von wasserlöslichen Hydrochloriden.

Fazit

Während die zunächst im Labor durchgeführten Versuche andeuteten, dass Oligochitosane ein gutes Wirksamkeitspotenzial gegen zwei holzpathogene Pilze haben, waren es die Chitosane mit mittlerem Molekulargewicht, und insbesondere Hydrochloride, die aufgrund ihrer Wasserlöslichkeit den besten Wundschutz im Feldversuch zeigten. Die durchschnittliche Wirksamkeit von HA-Hydrochlorid gegen *E. lata* lag nach dem Bestreichen von Wunden bei 57 % (zwei Versuche im Jahr 2021). Während des Trocknens und möglicherweise durch Polymerisierung ist dieses Hydrochlorid in der Lage, die Sporen abzufangen, die sich auf den Wunden absetzen. Die Wirkungsweise gleicht grundsätzlich einem Verband und ist daher hauptsächlich physikalischer Natur, und somit eher fungistatisch als fungizid. Dies könnte pathogene Ascomycota-Pilze, die sich durch große Sporen auszeichnen, sowie Basidiomycota daran hindern, durch Wunden nach dem Rebschnitt oder einer Stammsanierung in das Holz einzudringen, und könnte sogar kürettierte Reben vor zu schnellen Neuinfektionen schützen. In dieser Studie wurde keine Toxizität der Verbindungen beobachtet. Diese Arbeit ist Gegenstand einer französischen Patentanmeldung unter der Nummer FR2004922. Es steht jedoch noch keine Formulierung zur Verfügung. ■

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