IVES Technical Reviews
vigna & vino

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

Chitosani e malattie del legno della vite: studi di laboratorio e in vigneto, risultati sorprendenti

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

Il potenziale dei chitosani nella lotta contro le malattie del legno della vite (MDL) è stato studiato nell'ambito di un partenariato pubblico-privato. Sono stati effettuati test in vitro, prove di efficacia in vigneto e analisi di laboratorio per comprenderne la loro modalità d'azione. In vitro, i chitosani a basso peso molecolare (PM), i più solubili, erano spesso i più efficaci. In vigneto i migliori risultati sono stati quelli a medio PM, in particolare i cloridrati di chitosano che formano una pellicola protettiva. Potrebbero essere utilizzati come una sorta di cerotto sulle ferite da potatura, taglio o *curetage*.

Il chitosano è un prodotto naturale estratto dalla chitina dalle pareti dei funghi o dai carapaci di crostacei o insetti. Trova impiego in numerosi settori (medicina, depurazione delle acque, cosmetica, ecc.) tra cui l'enologia[1]. Nella protezione delle colture, il chitosano è noto anche per le sue proprietà antivirali, antibatteriche, antifungine e per contribuire alle difese naturali delle piante[2]. Tuttavia, il suo meccanismo d'azione nel controllo diretto dei parassiti delle piante rimane poco chiaro. Nella vite, il chitosano di origine fungina è una sostanza approvata come stimolatore dei meccanismi di difesa della pianta. Per comprendere meglio la variabilità dell'efficacia dei chitosani e identificare il miglior candidato per l'uso sulla vite, a partire dal 2016 è stato intrapreso uno studio collaborativo. Pertanto, sono stati valutati 23 chitosani ma solo 16 sono stati oggetto di ulteriori test, vale a dire: 7 chitosani estratti da crostacei (OCe3, Ce20, Ca50, J80, S674 e due cloridrati di chitosano, HA e HS), 5 da funghi (OF3, Fda30, LF43, F329 e cloridrato di chitosano H90) e 4 da insetti (OY5, Y40 , Y350 e Y903). Le lettere identificano i chitosani, i numeri indicano il loro PM (kDa), se noto.

In vitro: il più leggero, il più efficace!

La capacità dei chitosani di inibire la crescita miceliale di due funghi patogeni, coinvolti nelle malattie del legno (*Eutypa lata*, eutypiosis e *Phaeomoniella chlamydospora*, esca), è stata inizialmente valutata in laboratorio. Poiché solo gli oligochitosani e i cloridrati sono solubili in acqua, è stato ideato un metodo originale (Figura 1).

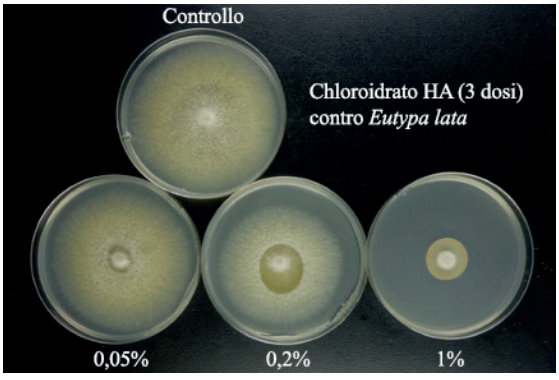


FIGURA 1. Illustrazione del metodo originale utilizzato per testare i chitosani. Un'aliquota di 300 µl viene posta al centro e sulla superficie di un terreno agarizzato in una piastra di Petri. Dopo l'essiccazione, una pastiglia di micelio viene a sua volta posto al centro del cerchio contenente il prodotto. L'efficacia viene calcolata misurando il diametro della colonia miceliale e confrontandolo con quello di un controllo non trattato.

Per le 3 concentrazioni testate (0,05, 0,2 e 1%), i chitosani S674, F329, Y350 e Y903, ad alto peso molecolare (> 300 kDa), qualunque sia l'agente patogeno, hanno mostrato sistematicamente i livelli di efficienza più bassi. Al contrario, le migliori percentuali di efficacia sono state osservate con gli oligochitosani (PM più basso ≤ 5 kDa). L'origine del chitosano (fungo, crostaceo o insetto) non sembra avere influenza sui livelli di efficacia. Pertanto, i migliori candidati contro questi due funghi patogeni sono stati gli oligochitosani e i chitosani con peso molecolare medio (tra 5 e 130 kDa) (Tabella 1).

TABELLA 1. Effetto dei chitosani, di diversa origine, testati *in vitro* alla dose dell'1% sulla crescita miceliale di *E. lata* e *P. chlamydospora*. Molto spesso, i prodotti sono stati testati due o tre volte.

Chitosani		Efficacia (%)	
		E. lata	*P. chlamydospora*
Crostacei	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**
Funghi	OF3	**100 ± 0**	**59 ± 11**
	Fda30	**87**	**41**
	LF43	**87 ± 5**	**69 ± 24**
	H90	**86 ± 6**	**45 ± 24**
	F329	**4 ± 6**	**5 ± 7**
Insetti	OY5	**92 ± 1**	**74 ± 17**
	Y40	**90 ± 1**	**62 ± 28**
	Y350	**2 ± 3**	**0 ± 0**
	Y903	**2 ± 3**	**18 ± 6**

*PM sconosciuto

In vigna: il meno pesante, il meno efficace!?

Dal 2016, le sperimentazioni in vigneto hanno permesso di valutare la capacità del chitosano di proteggere le ferite di potatura dalle malattie del legno, secondo il metodo ufficiale CEB n°155[3] [4], basato sulle infezioni artificiali. L'efficacia viene valutata in base ai tassi di infezione della ferita (30 sarmenti per prodotto) e alle quantità di rametti di legno infetti per ferita (25 rametti analizzati per sarmento), rispetto ad un controllo non trattato.

Il chitosano LF43 (fungino) è stato il primo testato in vigneto, contro *E. lata* (2016, 2017) e *P. chlamydospora* (2017). Applicato come lavaggio preventivo sulle ferite da potatura alla dose del 30%, LF43 si è rivelato inefficace contro *P. chlamydospora* ma molto efficace contro *Eutypa lata* (efficacia 71% e 77% rispettivamente nel 2016 e 2017). Purtroppo la tendenza del prodotto a sgretolarsi durante l'essiccazione e il suo costo hanno scoraggiato il proseguimento del suo studio.

La scelta si è allora spostata sull'oligochitosano OCe3, efficace in vitro, e sul cloridrato H90, a titolo esplorativo (Tabella 2).

La traduzione di questo articolo in italiano vi stata offerta da WineHunter Hub. https://www.winehunterhub.com/

TABELLA 2. Risultati delle prove preventive implementate in vigneto nel 2018, 2019 e 2021 per valutare l'efficacia di prevenzione di diversi chitosani.

	Eutypa lata		*Phaeomoniella chlamydospora*	
Test 2018 e 2019	215 ascospore inoculate (2018)		1786 conidi inoculati (2018)	
	355 ascospore inoculate (2019)		1960 conidi inoculati (2019)	
	Tasso d'infezione **Efficacia (%)**		Tasso d'infezione **Efficacia (%)**	
	Ferite da potatura* n = 30	Rametti** n = 750 (30 x 25)	Ferite da potatura* n = 30	Rametti** n = 750 (30 x 25)
Controllo inoculato (2018 – 2019)	80 **a** – 83,3 **a**	27,2 – 32,9	96,6 **ab** – 100 **a**	47,3 – 50,8
OCe3 polverizzato al 5% (2018)	60 **a** **25**	16,1 **NS** **40,7**	86,7 **ab** **10,2**	38 **NS** **19,7**
OCe3 polverizzato al 10% (2019)	83,3 **a** **0**	36,4 **NS** **0**	96,7 **a** **3,3**	47,7 **NS** **6**
OCe3 polverizzato al 15% (2019)	86,7 **a** **0**	34 **NS** **0**	93,3 **a** **6,7**	44,7 **S** **12,1**
H90 applicato al 10% (2019)	33.3 **b** **60**	13,8 **S** **57,9**	33,3 **b** **66,7**	8,9 **S** **82,4**
	Eutypa lata		*Phaeomoniella chlamydospora*	
Test 2021	431 ascospore inoculate (2021)		1965 conidi inoculati (2021)	
	Ferite da potatura* n = 30	Rametti** n = 750 (30 x 25)	Ferite da potatura* n = 30	Rametti** n = 750 (30 x 25)
Controllo inoculato	63,3 **a**	22	88 **a**	24,3
HA polverizzato al 2%	24,1 **b** **61,8**	6,9 **HS** **68,6**	75 **ab** **14,8**	13,6 **NS** **44,2**
HA applicato al 5%	23,3 **b** **63,2**	1,1 **THS** **95,2**	76,9 **b** **12,6**	15,8 **NS** **34,8**

*Per le ferite da potatura, le lettere ($^{a, ab, b}$) indicano i gruppi omogenei risultanti dall'analisi della varianza o dal test di Kruskal-Wallis (i risultati delle 30 ferite da potatura sono stati suddivisi in 3 ripetizioni di 10 ferite)

** Per i rametti di legno (25 esaminati per ferita da potatura), i risultati sono stati distribuiti in 3 classi in base alla quantità di rami infetti per ferita: [0-5], [6-10], [11-25]. Le distribuzioni sono state quindi confrontate utilizzando un test di confronto delle distribuzioni χ^2. Ciascuna modalità trattata viene confrontata con il controllo inoculato non trattato. NS = non significativo; S = significativo (α = 5%); HS = Altamente significativo (α = 1%); HRT = Molto Altamente Significativo (α = 0,1%).



FIGURA 2. Ferita da potatura di Cabernet-Sauvignon trattata con un rivestimento di chitosano cloridrato. Fotografia scattata immediatamente dopo l'applicazione.

Testato nel 2018 e nel 2019, alle dosi del 5, 10 e 15%, OCe3 non ha ridotto sufficientemente le infezioni delle ferite da potatura provocate da *E. lata* e *P. chlamydospora* (efficacia sempre inferiore al 25%). Questo risultato è stato molto sorprendente alla luce dei test in vitro (buona efficacia). H90, invece, applicato nel 2019 al 10%, ha modulato significativamente le infezioni dei due patogeni (efficacia rispettivamente del 60% e del 58% su ferite da potatura e rametti con *E. lata*, ed efficacia del 67% e 82% con *P. chlamydospora*). Se l'elevata viscosità del cloridrato rendeva difficile l'applicazione a spruzzo, applicato in superficie come film formava una barriera protettiva (Figura 2).

Una nuova sperimentazione è stata avviata nel 2021 con il cloridrato HA, applicato preventivamente mediante spruzzatura (P) al 2% o mediante spalmatura (B) al 5% (Tabella 2). Con *E. lata*, l'HA ha ridotto significativamente le infezioni (efficacia del 62% in P e del 63% in B). Questo effetto è stato confermato per quanto riguarda i tassi di rametti infetti per ferita: efficacia del 68% in P e 95% in B. Contro *P. chlamydospora*, HA non ha ridotto significativamente le infezioni della ferita (efficacia del 14% e 12%). Per quanto riguarda invece i tassi dei rametti infettati dal patogeno, l'effetto del prodotto è sembrato migliore: 44% in P e 34% in B, ma non confermato statisticamente. Questa differenza di efficacia, a seconda dell'applicazione e del fungo studiato, suggerisce un effetto barriera la cui efficacia sarebbe legata al PM, alla solubilità del prodotto e alla dimensione delle spore depositate sulla pellicola protettiva che il prodotto genera dopo la sua applicazione.

Studio della modalità d'azione del chitosano cloridrato

Per comprendere meglio la differenza dei risultati tra i test in vitro e quelli in vivo è stato effettuato uno studio complementare: sempre in base al metodo CEB 155 tagliando i tessuti sottostanti le ferite in dieci rondelle di circa 1 mm di spessore. Questo metodo consente di vedere a quale profondità si insediano i funghi. Sei formulazioni, tutte dosate al 5%, sono state applicate come misura preventiva sulle ferite: oligochitosani OF3 e OCe3, chitosani LF43 e Ca50 e i cloridrati H90 e HS. I risultati hanno mostrato l'efficacia totale di H90 e HS (100%) contro *E. lata* e *P. chlamydospora*, prodotti che impediscono alle spore di penetrare sotto la superficie delle ferite. I chitosani LF43 e Ca50 hanno mostrato effetti medi (efficacia dal 43 al 60%) contro *E. lata* e nulli contro *P. chlamydospora*. Gli oligochitosani OCe3 e OF3 non hanno mostrato efficacia (da 0 a 34%). Questo ulteriore studio ha quindi confermato l'effetto barriera dei chitosani di peso molecolare medio, e in particolare dei cloridrati idrosolubili.

Conclusioni

Mentre i test condotti in laboratorio hanno mostrato che gli oligochitosani avevano un buon potenziale di controllo nei confronti di due funghi patogeni del legno, sono stati i chitosani di peso molecolare medio, in particolare il cloridrato per la sua solubilità in acqua, a essere i più adatti a proteggere le ferite di potatura nella vigna, con un'efficacia media del 57% contro *E. lata* per l'HA applicato per spalmatura (2 test nel 2021). Asciugandosi e probabilmente agglomerandosi, il cloridrato sembra capace di intrappolare le spore che potrebbero depositarsi sulla superficie delle ferite. Agirebbe come una barriera, la sua modalità d'azione sarebbe quindi prevalentemente fisica, più fungistatica che fungicida. Potrebbe aiutare a impedire la penetrazione nel legno di numerosi funghi ascomiceti patogeni, caratterizzati da spore di grandi dimensioni, e basidiomiceti, proteggendo così ferite di potatura o anche ceppi curettati per evitare reinfezioni troppo rapide. Si noti che nello studio non è stata osservata alcuna tossicità per questo prodotto. Questo lavoro è stato oggetto di una domanda di brevetto francese con il numero FR2004922. Ma nessuna formulazione è ancora disponibile. ■

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.