





# Il Mal dell'Esca della Vite

## Interventi di ricerca e sperimentazione per il contenimento della malattia

### Progetto MESVIT



Agenzia Regionale per lo Sviluppo  
e l'Innovazione nel settore Agricolo-forestale  
via Pietrapiana, 30 - 50121 Firenze  
tel. 055 27551 - fax 055 2755216/2755231  
www.arsia.toscana.it  
e-mail: posta@arsia.toscana.it

*Coordinamento editoriale:*  
Varo Bucciantini, Piero Braccini - ARSIA

*Coordinamento scientifico del progetto di ricerca:*  
Giuseppe Surico - Università di Firenze,  
Dipartimento di Biotecnologie Agrarie,  
Sezione di Patologia vegetale  
e-mail: giuseppe.surico@unifi.it

*Coordinamento della pubblicazione:*  
Giuseppe Surico, Laura Mugnai  
Università di Firenze, Dipartimento di Biotecnologie  
Agrarie, Sezione di Patologia vegetale

*Cura redazionale, grafica e impaginazione:*  
LCD srl, Firenze

Stampa: Tipografia Il Bandino, Firenze

ISBN 978-88-8295-115-3  
Fuori commercio, vietata la vendita  
© Copyright 2010 ARSIA Regione Toscana



*Coordinatore del Progetto:*  
**Università degli Studi di Firenze**  
Dipartimento di Biotecnologie Agrarie  
Sezione di Patologia vegetale

*Progetto di ricerca interregionale, Programma "Sviluppo rurale" – Sottoprogramma  
"Innovazione e ricerca" (Legge 23 dicembre 1999, n. 499 - Programmi interregionali III fase)*

## Presentazione

Il settore vitivinicolo in Italia ha raggiunto nel corso degli anni una significativa crescita in termini qualitativi. Uno sviluppo favorito e sostenuto da diversi fattori, relativi sia alla produzione sia al mercato, connessi alla razionalizzazione e all'ammodernamento degli impianti e all'aggiornamento delle tecniche di gestione e di commercializzazione.

Questo ruolo fondamentale assunto dalla viticoltura è anche il risultato della capacità degli imprenditori e dei tecnici di cogliere i risultati della ricerca scientifica e applicare le innovazioni in grado di esaltare la qualità e i caratteri distintivi delle produzioni.

La ricerca della qualità impone di operare scelte fortemente correlate tra le diverse variabili: il vitigno, la struttura del vigneto e la tecnica colturale sono considerati estremamente connessi. In tale contesto risulta importante acquisire indicazioni che favoriscano le scelte innovative e sviluppare conoscenze in grado di orientare le decisioni delle imprese vitivinicole.

In questo nuovo scenario diventa determinante il ruolo che può essere svolto dai soggetti istituzionali preposti alla ricerca e al trasferimento delle innovazioni al fine di favorire l'applicazione di tecniche o informazioni volte sia a risolvere specifiche problematiche a valenza territoriale sia a interagire nella fase del processo produttivo.

Anche nel settore vitivinicolo alcune questioni restano tuttora aperte e necessitano di essere risolte per favorire un miglioramento sia delle condizioni colturali sia della qualità delle produzioni. In particolare, nell'ambito della fitopatologia, alcune avversità particolarmente aggressive causano agli impianti di viti problemi talvolta gravi al punto da compromettere irrimediabilmente la stessa coltura.

Una di queste è il mal dell'esca o complesso esca così come ci viene proposto dagli specialisti del settore. Da molti anni il mal dell'esca costituisce un grave problema per la viticoltura, sia in Italia che all'estero. In questo arco di tempo sono stati realizzati progetti di ricerca e sperimentazione in molte aree colpite dalla malattia, promossi da vari Enti e gestiti da diversi gruppi di ricerca. Lo svolgimento di queste attività ha prodotto una conoscenza più approfondita della malattia per i suoi aspetti epidemiologici, fisiologici e molecolari e, in particolare, ne ha evidenziato l'estrema complessità, tale che il concetto stesso di mal dell'esca va oggi ben al di là di quanto si era imparato a percepire nel passato. Tuttavia, il lavoro non si può consi-

derare concluso perché molte sono le risposte che i numerosi ricercatori che si occupano del problema devono approfondire e, soprattutto, perché vivaisti e viticoltori non sono stati messi nelle condizioni di fronteggiare il mal dell'esca con probabilità di successo.

Da queste considerazioni è emersa la necessità di promuovere un progetto di ricerca che si ponesse l'obiettivo, attraverso un coordinamento delle Istituzioni scientifiche, sia di risolvere gli aspetti prettamente scientifici, sia di giungere a una strategia di lotta compatibile con i moderni concetti di sostenibilità in agricoltura.

Anche le Regioni e le Province autonome italiane da tempo hanno rilevato l'esigenza di operare una forte sinergia su tematiche di ricerca di particolare interesse applicativo per il comparto agricolo, attraverso la promozione e l'attuazione di iniziative di ricerca coordinate.

Questo progetto è il risultato del lavoro portato avanti dalla "Rete Interregionale per la ricerca agraria e forestale" riconosciuta dalla Conferenza dei Presidenti delle Regioni e delle Province Autonome a partire dall'ottobre del 2001 e della quale è stata affidata la Segreteria alla Regione Toscana e per essa ad ARSIA.

La Rete Interregionale è finalizzata a creare un collegamento tra le Regioni, per sviluppare sinergie e collaborazioni, e porsi quale interfaccia organizzata sia del Ministero dell'Università e della Ricerca che del Ministero delle Politiche agricole, alimentari e forestali con lo scopo di contribuire alla definizione del piano nazionale triennale della ricerca agraria. La Rete è organizzata attraverso Gruppi di competenza, articolati principalmente per filiere produttive, che hanno il compito di individuare e definire la domanda d'innovazione nei vari settori; il gruppo di competenza per il settore vitivinicolo è coordinato da ARSIA, che ha avuto di conseguenza il compito di gestire il progetto interregionale sul mal dell'esca della vite attuato tramite bando.

Il soggetto attuatore di tale progetto è stato il Dipartimento di Biotecnologie Agrarie dell'Università di Firenze che si è avvalso per la realizzazione di 13 gruppi di ricerca e oltre 50 aziende vitivinicole, vivaistiche e associazioni di settore. Il coordinamento scientifico del progetto è stato curato dal prof. Giuseppe Surico, docente di Patologia vegetale presso la suddetta istituzione scientifica.

L'attività progettuale ha affrontato diversi argomenti: epidemiologia dei funghi coinvolti nelle malattie del complesso esca; interazione pianta-patogeni; diagnosi; effetti delle malattie sull'ospite; lotta. Per ciascuno di questi temi sono stati ottenuti risultati significativi che, da un lato, possono considerarsi acquisizioni definitive e, dall'altro, costituiscono utile premessa per ulteriori avanzamenti.

I risultati del progetto sono illustrati nel presente volume, che è articolato in argomenti tematici in modo da poter mettere in risalto tutti gli aspetti della malattia e costituire un riferimento certo per tutti coloro che intendano documentarsi sulla problematica dell'esca.

Con il bando emanato da ARSIA per conto di quattordici Regioni e della Provincia autonoma di Trento si ritiene di aver soddisfatto le aspettative delle componenti imprenditoriali e tecniche del settore vitivinicolo e allo stesso tempo delle Istituzioni scientifiche: infatti è stata recepita l'importanza strategica del mal dell'esca; è stata offerta la possibilità di formare un gruppo di lavoro costituito da circa 70 ricercatori operativi in 11 diverse regioni italiane; è stata avviata un'attività di ricerca e sperimentazione di carattere applicativo e di livello interregionale; è stata messa a punto una rete di scambio di conoscenze e modalità operative sicuramente utili per migliorare le conoscenze sul mal dell'esca e le tecniche e per il suo impiego in vivaio e in campo. Altrettanto importante ed efficace è stata l'attività di divulgazione per la quale è stato registrato un considerevole impegno sia da parte degli Enti aderenti al progetto sia da parte delle Istituzioni scientifiche partecipanti all'attuazione delle attività.

Per questi motivi mi è gradito rivolgere un ringraziamento al prof. Surico, quale coordinatore scientifico, ai partner progettuali nonché alle imprese vitivinicole e vivaistiche che hanno sostenuto il progetto, alle Regioni Abruzzo, Basilicata, Campania, Friuli Venezia Giulia, Liguria, Lombardia, Marche, Molise, Piemonte, Puglia, Sardegna, Sicilia, Toscana, Umbria e alla Provincia autonoma di Trento che hanno aderito e partecipato al comitato di progetto, alla Conferenza delle Regioni e Province autonome e al Ministero delle Politiche agricole, alimentari e forestali, per aver contribuito concretamente alla realizzazione dell'attività e alla pubblicazione di questo volume.

Maria Grazia Mammuccini  
*Direttore ARSIA*

## Prefazione

Gli argomenti trattati in questo volume disegnano il quadro complessivo del mal dell'esca così come risulta ai numerosi ricercatori che da qualche tempo studiano questa malattia. Ne consegue che i risultati ottenuti dalle attività di ricerca e sperimentazione svolte nell'ambito del progetto MESVIT sono arricchite, o quanto meno discusse o valutate criticamente, anche alle luce delle esperienze di ricerca svolte in questi ultimi anni in Paesi diversi dall'Italia.

I contributi di circa 70 diversi autori, tutti impegnati, a vario titolo, nel progetto MESVIT, sono stati suddivisi in sette sezioni e 47 capitoli. La prima sezione argomenta sulle ricerche svolte sul mal dell'esca tra la fine dell'Ottocento e i primi 30 anni del Novecento, sul concetto che si aveva di mal dell'esca e su un nuovo modo di interpretare la malattia (al momento solo una proposta sottoposta al vaglio della comunità scientifica internazionale) giusto alla luce dei risultati del progetto; la seconda e la terza affrontano tutti gli aspetti che riguardano le modalità di svernamento dei patogeni dell'esca, la produzione dell'inoculo e la sua diffusione nel tempo e nello spazio, le operazioni di vivaio e le possibilità di infezione durante le operazioni di allestimento delle barbatelle, l'incidenza del mal dell'esca in alcune regioni italiane; la quarta sezione richiama l'attenzione sui possibili meccanismi di formazione dei sintomi sulle foglie; la quinta è dedicata alla diagnosi dei funghi dell'esca; la sesta e la settima sezione, infine, trattano, rispettivamente, dei danni e della protezione delle piante, in vivaio e in campo.

Tutti gli articoli compresi nelle diverse sezioni sono stati revisionati per l'aspetto redazionale e resi uniformi, per quanto possibile, per la terminologia utilizzata. Non si è operato, salvo pochi casi, sui risultati esposti e di questi ultimi si lascia la responsabilità ai relativi

autori. In qualche caso, all'inizio delle sezioni vi è una premessa (spesso a firma diversa) utile per introdurre l'argomento.

La bibliografia, per maggiore comodità di consultazione, è stata suddivisa in tre parti: una prima parte, inclusa nel capitolo I.3 elenca, in ordine cronologico, i lavori sul mal dell'esca (circa 90) pubblicati dal 1873 al 1985 (pp. 55-58); la seconda contiene i lavori citati (più di 350) pubblicati sul mal dell'esca, da autori italiani e stranieri (pp. 501-519); la terza bibliografia elenca gli altri lavori citati nei vari articoli che compongono questo volume (pp. 521-542).

Il progetto svolto ha risolto molti degli interrogativi posti dal mal dell'esca, ma non tutti. Ad esempio, non sono ancora stati decifrati con certezza i meccanismi di formazione dei sintomi fogliari dell'esca e, anche per questo, non è stata trovata una strategia di lotta sicuramente vincente. Sono state però gettate solide basi per poter continuare le ricerche con migliori prospettive di risultati ancor più positivi. L'augurio è che le ricerche di cui si argomenta possano essere continuate. Intanto, vengono elencate alcune misure preventive che, se seguite con attenzione, possono condurre a una migliore convivenza con l'esca.

La lettura di questo lavoro è dunque consigliata a chi desidera avere una conoscenza completa di ciò che si è riusciti a sapere finora sul mal dell'esca, senza per questo addentrarsi nell'ormai mastodontica, in gran parte in inglese, letteratura scientifica al riguardo. Lettura indicata soprattutto a tecnici, viticoltori e vivaisti affinché prendano coscienza del fatto che la ricerca non ha lesinato gli sforzi, in questo supportata dal sostegno di enti per lo più locali, per cercare di risolvere il grave problema fitosanitario posto alle viti dal mal dell'esca.

Giuseppe Surico  
*Università di Firenze*  
*Dipartimento di Biotecnologie Agrarie*  
*Sezione di Patologia vegetale*

## Sommario

<b>I. Le avversità della vite, notizie storiche e terminologia</b>	19
I.1 Le avversità della vite – G. Surico	21
I.2 Per una storia linguistica di <i>Esca</i> – E. Montanari	26
I.3 Notizie storiche sul mal dell'esca – G. Surico	35
I.4 Verso una nuova definizione del concetto di esca – G. Surico, L. Mugnai, G. Marchi	59
<b>II. Il mal dell'esca: agenti causali e note epidemiologiche</b>	63
II.1 Il mal dell'esca e la carie bianca del legno: agenti causali, sintomatologia e casi studio di esca giovane – L. Mugnai, M. Guiggiani, F. Bazzo, G. Marchi, G. Surico	65
II.2 Origine e sviluppo nel tempo delle infezioni di <i>Phaeoacremonium aleophilum</i> e <i>Phaeoacremonium aleophilum</i> : dal vivaio al campo – G. Marchi, L. Mugnai, G. Surico	89
II.3 Il materiale di moltiplicazione della vite e il possibile ruolo nella trasmissione dei funghi associati al mal dell'esca – S. Pollastro, W. Habib, A. Pichierri, M.A. Mannoni, D. Bellotto, G. Lucchetta, G. Dal Cortivo, S. Serra, M. Borgo, F. Faretra	93
II.4 Forme di svernamento dei funghi dell'esca, fonti dell'inoculo, recettività delle ferite – S. Frisullo, A. Carlucci, F. Lops, L. Michelon, C. Pellegrini, I. Pertot, M. Quaglia, A. Zizzerini, S. Serra, M.A. Mannoni, V. Ligios, A. Demontis	104
II.5 Suscettibilità del vitigno al mal dell'esca e influenza del portinnesto: osservazioni in Toscana e in Sardegna – Premessa – G. Marchi	122
II.5.1 Incidenza del mal dell'esca su Cabernet Sauvignon, Chardonnay, Sangiovese e Trebbiano toscano in Toscana – G. Scalabrelli, R. Gucci, G. Caruso, C. Bertolla, L. Andreini, R. Viti	124
II.5.2 Incidenza del mal dell'esca su Cannonau, Sauvignon Blanc e Cabernet Sauvignon in Sardegna – S. Serra, M.A. Mannoni, V. Ligios	126
<b>III. Gravità e diffusione della malattia nei vigneti di alcune regioni italiane</b>	129
Premessa – G. Surico	131
III.1 Il mal dell'esca della vite in Abruzzo – F. Calzarano, V. D'Agostino	132
III.2 Il mal dell'esca della vite in Emilia-Romagna – S. Di Marco, F. Osti	136
III.3 Il mal dell'esca della vite in Liguria – B. Pesenti Barili, M. Ghironi	140
III.4 Il mal dell'esca della vite nelle Marche – G. Romanazzi, S. Murolo, L. Pizzichini, S. Nardi	143
III.5 Il mal dell'esca della vite in Piemonte – S. Cravero, S. Bergaglio, E. Paravidino	160
III.6 Il mal dell'esca della vite in Puglia – S. Frisullo, A. Carlucci, F. Lops	162
III.7 Il mal dell'esca della vite in Sardegna – S. Serra, M.A. Mannoni, V. Ligios	165
III.8 Il mal dell'esca della vite in Sicilia – S. Burruano, A. Alfonzo, G. Conigliaro, V. Mondello, L. Torta	171
III.9 Il mal dell'esca della vite in Toscana – G. Marchi, G. Surico, L. Mugnai, P. Braccini	178
III.10 Il mal dell'esca della vite in Trentino – L. Michelon, C. Pellegrini, I. Pertot	182
III.11 Il mal dell'esca della vite in Umbria – G. Natalini, M. Quaglia	184

III.12 Il mal dell'esca della vite in Veneto – <i>M. Borgo</i>	186		
III.13 Analisi statistica della distribuzione spaziale del mal dell'esca della vite in alcuni vigneti italiani – <i>G. Marchi, S. Burruano, S. Di Marco, F. Osti, I. Pertot, G. Surico</i>	191		
<b>IV. Interazione pianta-patogeni-ambiente</b>	205		
IV.1 Fattori di virulenza dei funghi dell'esca. Enzimi esocellulari e crescita dei funghi dell'esca in presenza di fenoli – <i>G. Marchi, L. Mugnai, G. Surico</i>	207		
IV.2 Fattori di virulenza dei funghi dell'esca. Fitotossine di <i>P. chlamydospora</i> , <i>P. aleophilum</i> e <i>F. mediterranea</i> : produzione e attività biologica – <i>A. Evidente, F. Peduto, A. Andolfi, G. Marchi, L. Mugnai, G. Surico</i>	214		
IV.3 Monitoraggio di marcatori chimici di stress idrico in foglie di vite con sintomi di esca – <i>L. Calamai, E. Zini, L. Cantalupo, C. Comparini</i>	232		
IV.4 Alterazioni degli scambi gassosi causati dal mal dell'esca			
IV.4.1 Misurazioni su foglia singola e sull'intera chioma di piante di vite in vaso – <i>G.B. Mattii, E. Bardi, C. Calabrese, A. Giorgini</i>	241		
IV.4.2 Misurazioni su foglia singola di piante di vite in campo – <i>R. Gucci, G. Caruso, C. Bertolla, L. Andreini</i>	261		
IV.5 Conducibilità idraulica in tralci di piante di vite colpite dal mal dell'esca – <i>L. Andreini, G. Scalabrelli, R. Gucci, G. Caruso, C. Bertolla, R. Viti</i>	269		
IV.6 Alterazioni istologiche degli internodi e dei piccioli fogliari – <i>G. Scalabrelli, R. Gucci, G. Caruso, C. Bertolla, L. Andreini, R. Viti</i>	272		
IV.7 Espressione dei sintomi fogliari dell'esca in funzione della disponibilità di acqua nel suolo e germogliamento delle gemme			
IV.7.1 Monitoraggio di piante di vite in vaso – <i>G. Surico, G. Marchi, L. Mugnai, F. Peduto</i>	276		
IV.7.2 Andamento del germogliamento delle gemme in piante di vite colpite dall'esca – <i>G. Scalabrelli, R. Gucci, G. Caruso, C. Bertolla, L. Andreini, R. Viti</i>	292		
IV.8 Risposta di difesa al mal dell'esca nella zona di infezione – <i>C. Amalfitano, D. Agrelli, A. Evidente</i>	296		
<b>V. Diagnosi dei funghi dell'esca</b>	305		
V.1 Tecniche di diagnosi applicabili ai funghi associati ad alterazioni del legno della vite – <i>S. Pollastro, A. Carlucci, W. Habib, F. Lops, S. Frisullo, F. Faretra</i>	307		
V.2 Caratterizzazione di quattro nuove specie di <i>Phaeoacremonium</i> isolate da piante di vite – <i>S. Essakhi, L. Mugnai, P.W. Crous, J.Z. Groenewald, G. Surico</i>	375		
V.3 Metodiche enzimatiche e immunochimiche di diagnosi dei funghi dell'esca – <i>A. Andolfi, A. Cimmino, A. Evidente, M. Iannaccone, R. Capparelli, L. Mugnai, G. Surico</i>	382		
V.4 Rintracciabilità di un fungo nei tessuti della pianta: il caso di <i>Phaeomonniella chlamydospora</i> trasformata con la proteina verde fluorescente sintetica (sGFP) – <i>L. Landi, S. Murolo, G. Romanazzi</i>	388		
<b>VI. Mal dell'esca e qualità delle uve e dei mosti</b>	401		
VI.1 Effetti dell'esca sulla qualità di mosti e vini – <i>F. Calzarano, C. Amalfitano, L. Seghetti, M. Del Carlo, V. D'Agostino</i>	403		
VI.2 Stato nutrizionale di viti affette da esca – <i>F. Calzarano, C. Amalfitano, L. Seghetti, M. Del Carlo, V. D'Agostino</i>	412		
VI.3 Contenuto di <i>trans</i> -resveratrolo in foglie e acini di viti colpite da esca – <i>F. Calzarano, C. Amalfitano, L. Seghetti, M. Del Carlo, V. D'Agostino</i>	421		
VI.4 Parametri biochimici correlabili alla qualità e allo stress in grappoli vinificabili di viti sintomatiche per l'esca in vigneti dell'Emilia-Romagna – <i>F. Osti, G. Bertazza, S. Di Marco</i>	427		
VI.5 Danni e qualità delle uve – <i>G. Scalabrelli, L. Andreini, G. Ferroni</i>	435		
VI.6 Resveratrolo e salute umana – <i>A. Evidente, A. Andolfi</i>	442		
<b>VII. Strategie di lotta contro il mal dell'esca: note storiche e nuove conoscenze</b>	447		
VII.1 La lotta contro il mal dell'esca: cenni storici – <i>S. Di Marco</i>	449		
VII.2 La lotta contro il mal dell'esca in vivaio – <i>S. Di Marco, F. Osti</i>	456		
VII.3 La lotta contro il mal dell'esca in vigneto			
VII.3.1 Protezione delle ferite fresche di potatura con prodotti biologici a base di <i>Trichoderma</i> – <i>S. Di Marco</i>	464		
VII.3.2 Ipoclorito di sodio per la protezione delle ferite – <i>G. Scalabrelli, G. Ferroni</i>	468		
VII.3.3 Utilizzazione di mastici nella protezione delle ferite da potatura e nella prevenzione delle infezioni – <i>S. Frisullo, A. Carlucci, F. Lops</i>	472		
VII.4 Effetti di trattamenti antiperonosporici con fosetyl Al sul mal dell'esca – <i>S. Di Marco</i>	475		
VII.5 Effetti di trattamenti con biostimolanti sul mal dell'esca – <i>S. Di Marco</i>	479		
VII.6 Effetto di trattamenti nutrizionali sulla comparsa dei sintomi fogliari e su caratteristiche compositive della produzione in vigneti affetti da esca propria – <i>F. Calzarano, C. Amalfitano, L. Seghetti, V. D'Agostino</i>	483		
VII.7 Considerazioni generali e finali sulla lotta: indicazioni per vivaisti e viticoltori – <i>S. Di Marco, L. Mugnai, G. Surico</i>	489		
<b>Considerazioni conclusive</b> – <i>G. Surico</i>	495		
<b>Bibliografia</b>	499		
Bibliografia specifica sul Mal dell'esca	501		
Bibliografia	521		
Indice analitico degli Autori	543		

## Autori

### Alfonzo Antonio

Università degli Studi di Palermo  
Dipartimento di Scienze Entomologiche,  
Fitopatologiche, Microbiologiche,  
Agrarie e Zootecniche (Dip.to S.En.Fi.Mi.Zo.)  
viale delle Scienze - 90128 Palermo

### Agrelli Diana

Università di Napoli "Federico II"  
Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta,  
dell'Ambiente e delle Produzioni Animali  
via Università, 100 - 80055 Portici (NA)

### Amalfitano Carmine

Università di Napoli "Federico II"  
Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta,  
dell'Ambiente e delle Produzioni Animali  
via Università, 100 - 80055 Portici (NA)

### Andolfi Anna

Università di Napoli "Federico II"  
Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta,  
dell'Ambiente e delle Produzioni Animali  
via Università, 100 - 80055 Portici (NA)

### Andreini Lucia

Università degli Studi di Pisa  
Dipartimento di Coltivazione e Difesa  
delle Specie Legnose "G. Scaramuzzi"  
via del Borghetto, 80 - 56124 Pisa

### Bardi Elisa

Università degli Studi di Firenze  
Dipartimento di Ortoflorofruitticoltura  
viale delle Idee, 30 - 50019 Sesto Fiorentino (FI)

### Bazzo Francesco

Università degli Studi di Firenze  
Dipartimento di Biotecnologie Agrarie  
Sezione di Patologia vegetale  
p.le delle Cascine, 28 - 50144 Firenze

### Bellotto Diego

Consiglio per la Ricerca e la sperimentazione  
in Agricoltura - Centro di ricerca per la Viticoltura  
viale XXVIII Aprile, 26 - 31015 Conegliano (TV)

### Bergaglio Stefano

Anadiag Italia  
strada Savonesa, 9 - fraz. Rivalta Scrivera  
15050 Tortona (AL)

### Bertazza Gianpaolo

CNR - Consiglio Nazionale delle Ricerche  
Istituto di Biometeorologia, Sezione di Bologna  
via Gobetti, 101 - 40129 Bologna

### Bertolla Claudio

Università degli Studi di Pisa  
Dipartimento di Coltivazione e Difesa  
delle Specie Legnose "G. Scaramuzzi"  
via del Borghetto, 80 - 56124 Pisa

### Borgo Michele

Consiglio per la Ricerca e la sperimentazione  
in Agricoltura - Centro di ricerca per la Viticoltura  
viale XXVIII Aprile, 26 - 31015 Conegliano (TV)

### Braccini Piero

ARSIA - Agenzia Regionale per lo Sviluppo  
e l'Innovazione nel settore Agricolo-forestale  
via Pietrapiana, 30 - 50121 Firenze

### Burrano Santa

Università degli Studi di Palermo  
Dipartimento di Scienze Entomologiche,  
Fitopatologiche, Microbiologiche,  
Agrarie e Zootecniche (Dip.to S.En.Fi.Mi.Zo.)  
viale delle Scienze - 90128 Palermo

### Calabrese Claudia

Università degli Studi di Firenze  
Dipartimento di Ortoflorofruitticoltura  
viale delle Idee, 30 - 50019 Sesto Fiorentino (FI)

### Calamai Luca

Università degli Studi di Firenze,  
Dipartimento di Scienze  
delle Produzioni vegetali, del Suolo  
e dell'Ambiente Agroforestale (DIPSA)  
Sezione di Scienza del Suolo  
e Nutrizione della Pianta  
p.le delle Cascine, 28 - 50144 Firenze

### Calzarano Francesco

Università degli Studi di Teramo  
Dipartimento di Scienze degli Alimenti  
via C.R. Lerici, 1 - 64023 Mosciano S.A. (TE)

### Cantalupo Livio

Università degli Studi di Firenze  
Dipartimento di Biotecnologie Agrarie  
Sezione di Patologia vegetale  
p.le delle Cascine, 28 - 50144 Firenze

### Capparelli Rosanna

Università di Napoli "Federico II"  
Facoltà di Scienze Biotecnologiche  
via Università, 100 - 80055 Portici (NA)

### Carlucci Antonia

Università degli Studi di Foggia  
Dipartimento di Scienze Agro-ambientali,  
Chimica e Difesa vegetale  
via Napoli, 25 - 71100 Foggia

### Caruso Giovanni

Università degli Studi di Pisa  
Dipartimento di Coltivazione e Difesa  
delle Specie Legnose "G. Scaramuzzi"  
via del Borghetto, 80 - 56124 Pisa

### Cimmino Alessio

Università di Napoli "Federico II"  
Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta,  
dell'Ambiente e delle Produzioni Animali  
via Università, 100 - 80055 Portici (NA)

### Comparini Cecilia

Università degli Studi di Firenze  
Dipartimento di Biotecnologie Agrarie  
Sezione di Patologia vegetale  
p.le delle Cascine, 28 - 50144 Firenze

### Conigliaro Gaetano

Università degli Studi di Palermo  
Dipartimento di Scienze Entomologiche,  
Fitopatologiche, Microbiologiche,  
Agrarie e Zootecniche (S.En.Fi.Mi.Zo.)  
viale delle Scienze - 90128 Palermo

### Cravero Sergio

Regione Piemonte, Settore Fitosanitario  
via Livorno, 60 - 10144 Torino

### Crous Pedro W.

Centraalbureau voor Schimmelcultures  
Fungal Biodiversity Centre  
Uppsalaalaaan, 8 - 3584 CT Utrecht (Olanda)

### D'Agostino Vincenzo

Università degli Studi di Teramo  
Dipartimento di Scienze degli Alimenti  
via C.R. Lerici, 1 - 64023 Mosciano S.A. (TE)

### Dal Cortivo Gianluca

Consiglio per la Ricerca e la sperimentazione  
in Agricoltura - Centro di ricerca per la Viticoltura  
viale XXVIII Aprile, 26 - 31015 Conegliano (TV)

### Del Carlo Michele

Università degli Studi di Teramo  
Dipartimento di Scienze degli Alimenti  
via C.R. Lerici, 1 - 64023 Mosciano S.A. (TE)

### Demontis Angelo

Università degli Studi di Sassari  
Dipartimento di Protezione delle Piante  
via E. De Nicola, 1 - 07100 Sassari

### Di Marco Stefano

CNR - Consiglio Nazionale delle Ricerche  
Istituto di Biometeorologia, Sezione di Bologna  
via Gobetti, 101 - 40129 Bologna

### Essakhi Salwa

Università degli Studi di Firenze  
Dipartimento di Biotecnologie Agrarie  
Sezione di Patologia vegetale  
p.le delle Cascine, 28 - 50144 Firenze

### Evidente Antonio

Università di Napoli "Federico II"  
Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta,  
dell'Ambiente e delle Produzioni Animali  
via Università, 100 - 80055 Portici (NA)

### Faretra Francesco

Università degli Studi di Bari, Dipartimento di Protezione delle Piante e Microbiologia applicata  
via Amendola, 165/A - 70125 Bari

### Ferroni Giuseppe

Università degli Studi di Pisa  
Dipartimento di Coltivazione e Difesa  
delle Specie Legnose "G. Scaramuzzi"  
via del Borghetto, 80 - 56124 Pisa

### Frisullo Salvatore

Università degli Studi di Foggia  
Dipartimento di Scienze Agro-ambientali,  
Chimica e Difesa vegetale  
via Napoli, 25 - 71100 Foggia



**Ghironi Massimiliano**

Regione Liguria, Centro Agrometeorologia applicata regionale, loc. Pallodola - 19038 Sarzana (SP)

**Giorgini Alessio**

Università degli Studi di Firenze  
Dipartimento di Ortoflorofruitticoltura  
viale delle Idee, 30 - 50019 Sesto Fiorentino (FI)

**Groenewald Joannes Z.**

Centraalbureau voor Schimmelcultures  
Fungal Biodiversity Centre  
Uppsala, 8 - 3584 CT Utrecht (Olanda)

**Gucci Riccardo**

Università degli Studi di Pisa  
Dipartimento di Coltivazione e Difesa  
delle Specie Legnose "G. Scaramuzzi"  
via del Borghetto, 80 - 56124 Pisa

**Guiggiani Marco**

Università degli Studi di Firenze  
Dipartimento di Biotecnologie Agrarie  
Sezione di Patologia vegetale  
p.le delle Cascine, 28 - 50144 Firenze

**Habib Wassim**

Università degli Studi di Bari  
Dipartimento di Protezione delle Piante  
e Microbiologia applicata  
via Amendola, 165/A - 70125 Bari

**Iannaccone Marco**

Università di Napoli "Federico II"  
Facoltà di Scienze Biotecnologiche  
via Università, 100 - 80055 Portici (NA)

**Landi Lucia**

Università Politecnica delle Marche  
Dipartimento di Scienze Ambientali  
e delle Produzioni Vegetali  
via Breccie Bianche - 60131 Ancona

**Ligios Virna**

Università degli Studi di Sassari  
Dipartimento di Protezione delle Piante  
via E. De Nicola, 1 - 07100 Sassari

**Lops Francesco**

Università degli Studi di Foggia  
Dipartimento di Scienze Agro-ambientali,  
Chimica e Difesa Vegetale  
via Napoli, 25 - 71100 Foggia

**Lucchetta Gianluca**

Consiglio per la Ricerca e la sperimentazione  
in Agricoltura - Centro di ricerca per la Viticoltura  
viale XXVIII Aprile, 26 - 31015 Conegliano (TV)

**Mannoni Maria Angela**

Università degli Studi di Sassari  
Dipartimento di Protezione delle Piante  
via E. de Nicola, 1 - 07100 Sassari

**Marchi Guido**

Università degli Studi di Firenze  
Dipartimento di Biotecnologie Agrarie  
Sezione di Patologia vegetale  
p.le delle Cascine, 28 - 50144 Firenze

**Mattii Giovanni**

Università degli Studi di Firenze  
Dipartimento di Ortoflorofruitticoltura  
viale delle Idee, 30 - 50019 Sesto Fiorentino (FI)

**Michelon Lorenza**

IASMA - Centro SafeCrop, Fondazione "E. Mach"  
via E. Mach, 1 - 38010 San Michele all'Adige (TN)

**Mondello Vincenzo**

Università degli Studi di Palermo  
Dipartimento di Scienze Entomologiche,  
Fitopatologiche, Microbiologiche,  
Agrarie e Zootecniche (S.En.Fi.Mi.Zo.)  
viale delle Scienze - 90128 Palermo

**Montanari Elio**

Università degli Studi di Firenze  
Facoltà di Lettere, Dipartimento  
di Scienze dell'Antichità "G. Pasquali",  
p.za Brunelleschi, 4 - 50121 Firenze

**Mugnai Laura**

Università degli Studi di Firenze  
Dipartimento di Biotecnologie Agrarie  
Sezione di Patologia vegetale  
p.le delle Cascine, 28 - 50144 Firenze

**Murolo Sergio**

Università Politecnica delle Marche  
Dipartimento di Scienze Ambientali  
e delle Produzioni vegetali  
via Breccie Bianche - 60131 Ancona

**Nardi Sandro**

ASSAM - Agenzia Servizi Settore  
Agroalimentare Marche, Servizio Fitosanitario  
via Alpi, 21 - 60131 Ancona

**Natalini Giovanni**

ARUSIA - Agenzia Regionale Umbra  
per lo Sviluppo e l'Innovazione in Agricoltura  
via Fontevogge, 51 - 06124 Perugia

**Osti Fabio**

CNR - Consiglio Nazionale delle Ricerche  
Istituto di Biometeorologia, Sezione di Bologna  
via Gobetti, 101 - 40129 Bologna

**Paravidino Elisa**

Tenuta Cannona  
località Cannona, 518 - 15071 Carpeneto (AL)

**Peduto Francesca**

Università degli Studi di Firenze  
Dipartimento di Biotecnologie Agrarie  
Sezione di Patologia vegetale  
p.le delle Cascine, 28 - 50144 Firenze

**Pellegrini Chiara**

IASMA - Centro SafeCrop, Fondazione "E. Mach"  
via E. Mach, 1 - 38010 San Michele all'Adige (TN)

**Pertot Ilaria**

IASMA - Centro SafeCrop, Fondazione "E. Mach"  
via E. Mach, 1 - 38010 San Michele all'Adige (TN)

**Pesenti Barili Beatrice**

Regione Liguria  
Centro di Agrometeorologia applicata  
loc. Pallodola - 19038 Sarzana (SP)

**Pichierri Arianna**

Università degli Studi di Bari  
Dipartimento di Protezione delle Piante  
e Microbiologia applicata  
via Amendola, 165/A - 70125 Bari

**Pizzichini Laura**

ASSAM - Agenzia Servizi Settore  
Agroalimentare Marche, Servizio Fitosanitario  
via Alpi, 21 - 60131 Ancona

**Pollastro Stefania**

Università degli Studi di Bari  
Dipartimento di Protezione delle Piante  
e Microbiologia applicata  
via Amendola, 165/A - 70125 Bari

**Quaglia Mara**

Università degli Studi di Perugia  
Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali  
borgo XX Giugno, 74 - 06121 Perugia

**Romanazzi Gianfranco**

Università Politecnica delle Marche  
Dipartimento di Scienze Ambientali  
e delle Produzioni vegetali  
via Breccie Bianche - 60131 Ancona

**Seghetti Leonardo**

Università degli Studi di Teramo  
Dipartimento di Scienze degli Alimenti  
via C.R. Lerici, 1 - 64023 Mosciano S.A. (TE)

**Serra Salvatorica**

Università degli Studi di Sassari  
Dipartimento di Protezione delle Piante  
via E, De Nicola, 1 - 07100 Sassari

**Scalabrelli Giancarlo**

Università degli Studi di Pisa  
Dipartimento di Coltivazione e Difesa  
delle Specie Legnose "G. Scaramuzzi"  
via del Borghetto, 80 - 56124 Pisa

**Surico Giuseppe**

Università degli Studi di Firenze  
Dipartimento di Biotecnologie Agrarie  
Sezione di Patologia vegetale  
p.le delle Cascine, 28 - 50144 Firenze

**Torta Livio**

Università degli Studi di Palermo  
Dipartimento di Scienze Entomologiche,  
Fitopatologiche, Microbiologiche,  
Agrarie e Zootecniche (S.En.Fi.Mi.Zo.)  
viale delle Scienze - 90128 Palermo

**Viti Raffaella**

Università degli Studi di Pisa  
Dipartimento di Coltivazione e Difesa  
delle Specie Legnose "G. Scaramuzzi"  
via del Borghetto, 80 - 56124 Pisa

**Zazzerini Antonio**

Università degli Studi di Perugia  
Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali  
borgo XX Giugno, 74 - 06121 Perugia

**Zini Elisa**

Università degli Studi di Firenze  
Dipartimento di Biotecnologie Agrarie  
Sezione di Patologia vegetale  
p.le delle Cascine, 28 - 50144 Firenze

# **I. Le avversità della vite, notizie storiche e terminologia**



## I.1 Le avversità della vite

Giuseppe Surico\*

“Et però credo che molta felicità sia agli homini  
che nascono dove si trovano i vini boni”

Leonardo da Vinci

La vite (*fig. 1*), fra tutte le piante coltivate, è quella che soffre di un maggior numero di malanni. Poche altre colture agrarie sono infatti così prese di mira da funghi, virus, batteri, fitoplasmi, nematodi, insetti e acari (*tabb. 1-6*).

Inoltre, poiché la vite è stata sin dall'inizio della sua coltivazione pianta preziosa e cara all'uomo, diversi sono gli autori che nei secoli hanno scritto delle sue sofferenze e dei modi migliori di coltivarla onde ricavare da essa massimo frutto, per quantità e qualità. Da questi scritti possiamo quindi apprendere che alcune delle malattie che ci sono oggi note non erano sfuggite all'attenzione dei primi viticoltori e a quella di appassionati e dotti naturalisti (Marco Porcio Catone, Marco Terenzio Varrone, Publio Virgilio Marone, Lucio Giunio Moderato Columella, Plinio ecc.). Perfino malattie che riteniamo relativamente recenti, almeno in Europa, potrebbero aver fatto la loro



Fig. 1 - Vitis vinifera

\* Università di Firenze email: giuseppe.surico@unifi.it

**Tab. 1 - Malattie fungine della chioma (foglie e grappoli)**

- Peronospora (*Plasmopara viticola*)
- Oidio (*Erysiphe necator*; *Oidium tuckeri*)
- Botrite (*Botrytis cinerea*, *Botryotinia fuckeliana*)
- Black rot - Marciume nero degli acini (*Guignardia bidwellii*; *Phyllosticta ampellicida*)
- Phomopsis - Escoriosi (*Phomopsis viticola*; *Cryptosporella viticola*)
- Antracnosi (*Elsinoë ampelina*; *Sphaceloma ampelinum*)
- Rot brenner - Rossore parassitario (*Pseudopezicula tracheiphila*; *Phialophora tracheiphila*)
- Bitter rot (*Greeneria uvicola*)
- White rot - Marciume bianco degli acini (*Coniella diplodiella*)
- Ripe rot (*Glomerella cingulata*; *Colletotrichum gloeosporioides*)
- Macrophoma rot (*Botryosphaeria dothidea*)
- Angular leaf spot (*Mycosphaerella angulata*; *Cercospora brachypus*)
- Diplodia Cane dieback (*Diplodia natalensis*; "*Botryosphaeria*" *rhodina*)
- Fumaggine (*Cladosporium herbarum*)
- Berry rots - Marciume degli acini - Raisin molds (Invasori primari: *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Botrytis cinerea*, *Elsinoë ampelina*, *Diplodia natalensis*, *Greeneria uvicola*, *Phomopsis viticola*. Invasori secondari: *Aspergillus niger*, *Penicillium* spp., *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus stolonifer* ecc.)
- Ruggine (*Physopella ampelopsidis*)
- Leaf blight (*Mycosphaerella personata*; *Pseudocercospora vitis*)
- Leaf Blotch (*Briosia ampelophaga*)
- Zonate leaf spot (*Cristulariella moricola*)
- Septoria leaf spot - Melanosi (*Septoria ampelina*)
- Altri funghi minori (*Anthostomella pullulans*, *Cladosporium viticola*, *Phaeoramularia dissiliens*, *Rhytisma vitis*, *Asperisporium minutulum*)

**Tab. 2 - Malattie fungine del tronco e delle radici**

- Eutipiosi (*Libertella blepharis*; *Eutypa lata*)
- Esca (*Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum*, *Fomitiporia mediterranea*)
- Black dead arm (*Sphaeropsis malorum*; "*Botryosphaeria*" *stevensii*)
- Verticilliosi (*Verticillium dahliae*)
- Marciumi radicali da
  - Armillaria mellea*
  - Phymatotrichum omnivorum*
  - Demathophora necatrix* (*Rosellinia necatrix*)
  - Phytophthora* spp. (*cactorum*, *parasitica*, *cryptogea*, *megasperma* ecc.)

**Tab. 3 - Malattie causate da batteri**

- Rogna (*Agrobacterium vitis*)
- Bacterial blight - Mal nero (*Xanthomonas ampelina*)
- Malattia di Pierce (*Xylella fastidiosa*) (non presente in Italia)

**Tab. 4 - Malattie causate da fitoplasmi**

- Flavescenza dorata (vettore: *Scaphoideus titanus*; fitoplasmi del gruppo *Elm Yellow*s)
- Legno nero (sinonimi: Bois noir, Vergilbungskrankheit; vettore: *Hyalesthes obsoletus*; fitoplasmi del gruppo Stolbur)
- Grapevine Yellow (American Grapevine Yellow) (fitoplasmi del gruppo WX)
- Australian Grapevine Yellow (*Candidatus Phytoplasma australiense*)
- Altri giallumi (fitoplasmi del gruppo AY, Ca. *Phytoplasma asteris*)

**Tab. 5 - Malattie causate da virus e viroidi**

- Complesso dell'arricciamento (degenerazione infettiva) (GFLV)
  - Malformazioni infettive (ceppi deformanti di GFLV)
  - Giallume infettivo (ceppi cromogeni di GFLV)
- Accartocciamento fogliare (GLRaV 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ...)
- Complesso del legno riccio
  - Butteratura del legno di *Vitis rupestris* (GRSPaV)
  - Scanalatura del legno del Kober 5BB (GVA)
  - Suberosi corticale (GVB)
  - Scanalatura del legno di LN33 (sconosciuto)
- Scolorazione perinervale (viroidi della picchiettatura gialla della vite, da soli o in associaz. con GFLV)
- Maculatura infettiva (fleck) (GfKV)
- Disaffinità d'innesto (GLRSLaV, GLRaV-2, GVB)
- Enazioni
- Necrosi delle nervature (GRSPaV)
- Mosaico delle nervature

**Tab. 6 - Altre malattie e cause di danni**

- Nematodi parassiti della vite
- Insetti e acari parassiti della vite (vedi oltre)
- Fattori abiotici (grandine, freddo, elevata temperatura, carenza o eccesso idrico, vento, inquinanti atmosferici ecc.)
- Danni da pratiche colturali e fitosanitarie improprie
- Carenze alimentari-nutrizionali

Tab. 6a - Malattie provocate da acari

Acari eriofidi	<i>Calepitrimerus vitis</i> (agente dell' "acariosi")
	<i>Colomerus vitis</i> (agente dell' "erinosi")
Acari tetranychidi	<i>Panonychus ulmi</i> (ragnetto rosso dei fruttiferi)
	<i>Eotetranychus carpini</i> (ragnetto giallo)

Tab. 6b - Malattie provocate da insetti\*

Tisanotteri	Tripide della vite ( <i>Drepanothrips reuteri</i> )
Ditteri	Cecidomia fogliare [ <i>Janetiella</i> (= <i>Dichelomyia oenophila</i> )
Coleotteri	Bostrichi ( <i>Sinoxylon perforans</i> , <i>S. sexdentatum</i> )
Oziorinchi	Oziorinco ( <i>Otiorrhyncus</i> spp.)
	Sigaraio ( <i>Bytiscus betulae</i> )
Emitteri	Cocciniglia del corniolo ( <i>Parthenolecanium corni</i> )
	Cocciniglia nera della vite ( <i>Pulvinaria vitis</i> )
	Cocciniglie farinose della vite ( <i>Planococcus ficus</i> , <i>P. citri</i> , <i>Pseudococcus longispinus</i> , <i>P. obscurus</i> )
	Fillossera della vite ( <i>Daktulosphaira vitifoliae</i> = <i>Phylloxera vastatrix</i> )
	Cicalina bufalo americana ( <i>Stictocephala bisonia</i> )
	Cicalina della flavescenza dorata ( <i>Scaphoideus titanus</i> )
	Cicalina gialla ( <i>Zygina rhamnii</i> )
	Cicalina verde ( <i>Empoasca vitis</i> )
	Metcalfa ( <i>Metcalfa pruinosa</i> )
	Tignoletta ( <i>Lobesia botrana</i> )
Lepidotteri	Tignola ( <i>Eupoecilia ambiguella</i> )
	Eulia ( <i>Argyrotenia pulchellana</i> )
	Zigena ( <i>Theresimima ampelophaga</i> )

\* Specie più ricorrenti nei vigneti italiani.

comparsa nei nostri ambienti in tempi più remoti. Ad esempio Dante, nel *Canto XII* del *Paradiso* dice, a proposito di San Domenico (vv. 85-87):

In piccol tempo gran dottor si feo,  
Tal che si mise a circuir la vigna  
Che tosto *imbianca* se il vignaio è reo

Inoltre, nel secolo XVII alcuni contratti di affitto del Luganese parlano di compensi nel caso in cui nelle uve si mostrasse il *morbo farinella*.

Interessanti indizi (ma solo indizi o curiose coincidenze?), quelli citati, della presenza di oidio nella regione mediterranea molto prima del 1847.

Comunque, indipendentemente dalla loro prima comparsa, certo è che numerose sono

le malattie che colpiscono la vite e fra queste quelle alle quali si è sempre dato maggiore importanza sono peronospora, oidio e botrite. A queste tre malattie si è aggiunta, a partire dalla metà degli anni ottanta, anche l'esca. In effetti, l'incidenza dell'esca (relativamente alta anche in epoche precedenti) è andata progressivamente aumentando a partire dall'anno, il 1985, in cui intense gelate hanno colpito molte regioni italiane. Nel 1986 furono rilevate in alcune contrade della Toscana incidenze del mal dell'esca del 15-20% in vigneti di 15-20 anni e leggermente meno in vigneti di 7-10 anni. Le ragioni di questo improvviso incremento andrebbero cercate, tuttavia, visto anche il carattere della malattia, in fatti avvenuti ben prima del 1985. Al riguardo sono state formulate diverse ipotesi (Surico *et al.*, 2006): impiego negli anni sessanta e settanta di materiale vivaistico non sempre di buona qualità; progressivo maggiore impiego di fungicidi selettivi a scapito di principi attivi a più largo spettro d'azione; nuovi portinnesti; nuove pratiche colturali e nuove forme di allevamento della vite; coltivazione della vite anche in aree marginali; progressivo aumento della presenza nell'ambiente dei funghi dell'esca; ecc. In ogni caso, la situazione che si è generata dal 1986 in poi è stata tale che diversi sono stati i progetti di ricerca avviati per studiare il "problema esca". Le prime iniziative sono sorte in Lombardia e subito dopo in Toscana. L'interesse si è via via esteso ad altre regioni fino ad arrivare, nel 2004, al progetto interregionale, descritto in prefazione, dei cui risultati principali in questo testo si dà un resoconto riassuntivo.

Una precisazione occorre tuttavia fare riguardo all'uso della parola *esca* in questo testo. Il termine *esca* è stato usato, in epoca moderna, per indicare le piante di vite cariate che seccavano improvvisamente. Esca era il nome della malattia; carie bianca il sintomo interno; apoplezia il sintomo esterno e, spesso, esito finale dell'affezione. All'apoplezia si sono poi aggiunti i sintomi cloro-necrotici sulle foglie i quali sono diventati il segno distintivo dell'esca. Tuttavia, gli studi svolti in numerose strutture scientifiche hanno accertato almeno tre fatti incontrovertibili: la complessità dei fenomeni fitopatologici che si accompagnano al manifestarsi dell'esca; il coinvolgimento in questi fenomeni di più specie fungine, ciascuna delle quali può dare origine a sintomi diversi; la scomposizione dell'esca in più sindromi fra loro diverse per sintomatologia o cadenza temporale. In questo contesto, onde evitare confusione nel lettore (e in chi scrive), si continuerà a usare la parola *esca*, da sola, con riferimento generico all'intero complesso di malattie (cfr. *cap. I.4 per una più dettagliata argomentazione sull'uso dei termini riferiti all'esca*), pur consapevoli che questo termine ha ormai poco in comune con il suo significato originario.

## I.2 Per una storia linguistica di *Esca*

Elio Montanari\*

1. Nella lessicografia relativa all'italiano *esca* la registrazione di una quarta accezione «*esca della vite o mal dell'esca*», ovvero di “malattia della vite e di altre piante, causata da funghi” ha fatto il suo ingresso solo una cinquantina di anni fa, per una via e attraverso modalità che, a mio avviso, si rivelano non esenti da qualche difficoltà.

Nella sistemazione precedente, di *esca* venivano infatti sostanzialmente identificate tre accezioni, una prima: “cibo, nutrimento, alimento”, normalmente segnalata come antiquata e letteraria; una seconda: “allettamento”, nella pesca e nella caccia, e poi figuratamente; una terza, infine, decisamente tecnica: “materiale per accendere il fuoco”, ricevendo le scintille suscitate dalla pietra focaia per mezzo dell'acciarino<sup>1</sup>.

Nel *Dizionario Enciclopedico Italiano* dell'Istituto della Enciclopedia Italiana<sup>2</sup> compare, dopo l'illustrazione tradizionale di *esca* nelle sue tre accezioni, una sezione finale a parte, sotto il titolo *Esca della vite*, con una diffusa trattazione della patologia vegetale. L'origine di tale innovazione si dovrà senz'altro alla voce «*esca della vite*» che compare, del tutto separata dalla voce generalista «*esca*» (dedicata esclusivamente all' «*esca nella caccia e nella pesca*», e all' «*esca da fuoco*») nell'*Enciclopedia Italiana* (Treccani)<sup>3</sup>.

Attraverso questa via, la quarta accezione di *esca* («*esca della vite, o mal dell'esca*») entra nella grande lessicografia italiana: nel fondamentale dizionario del Battaglia<sup>4</sup> come «*esca*<sup>2</sup>», ovvero come lemma distinto da «*esca*<sup>1</sup>» articolato nelle tre accezioni ‘tradizionali’; nel vocabolario di Duro<sup>5</sup>, e nel recentissimo dizionario di De Mauro<sup>6</sup>, più equilibratamente, come accezione

\* Università di Firenze email: montanari\_e@unifi.it

<sup>1</sup> Tale sistemazione si riscontra già nell'archetipico *Vocabolario degli Accademici della Crusca*, Venezia, 1612, e si è propagata fino ad oggi. Senza diffondersi in una dossografia che sarebbe sterminata, si può almeno segnalare che, per quanto riguarda la terza accezione, “*esca da fuoco*”, nei vari lessici o non viene indicata la natura del materiale che si accende con le scintille provenienti dalla pietra focaia, o si dice che è un vegetale, o si indica trattarsi di un fungo disseccato. Nelle mie – certo non complete – ricerche, ho trovato solo due vocabolari nei quali si afferma che *esca* è anche una specie di fungo (più o meno diffusamente descritto), dal quale, essiccato, si ricava l' «*esca da fuoco*» (presentata dunque, linguisticamente, come valore secondario): *Dizionario critico enciclopedico della lingua italiana dell'abate D'ALBERTI DI VILLANUOVA*, Milano, 1825<sup>2</sup>; E. MESTICA, *Dizionario della lingua italiana*, Torino, 1936.

<sup>2</sup> Vol. IV (DEU-FORF), Roma, 1956, s.v. Riprodotto nel *Lessico Universale Italiano* dell'Istituto dell'Enciclopedia Italiana, Roma, vol. VII (ELF-FIN), 1971, s.v.

<sup>3</sup> *Enciclopedia Italiana di scienze, lettere, arti*, Roma, vol. XIV (ENO-FEO), 1932.

<sup>4</sup> S. BATTAGLIA, *Grande Dizionario della Lingua Italiana*, Torino, vol. V (E-FIN), 1968, s.v.

<sup>5</sup> *Vocabolario della lingua italiana*, autore e direttore A. DURO, Roma, vol. II (D-L), 1987, s.v.

<sup>6</sup> *Grande Dizionario Italiano dell'Uso*. Ideato e diretto da T. DE MAURO, Torino, vol. II (CH-FL), 1999, s.v.

paritetica alle altre (in entrambi, formalmente, la terza, dopo una prima, quella più generale – suddivisa in “cibo”, “*esca in pesca e caccia*”, “allettamento” –, e una seconda, “*esca da fuoco*”).

L'origine ‘enciclopedistica’ della nuova accezione introdotta deve però aver indebitamente pesato sulla sua valutazione linguistica. Nel vocabolario del Battaglia, nella sezione finale dedicata all'etimologia di *esca*<sup>2</sup>, si legge «voce dotta, lat. *ēscā* ‘*esca*’ (v. ESCA<sup>1</sup>), che si estese al fungo della vite» [cfr. Isidoro 17-10-18, segue la citazione nella pagina seguente, ¶ paragrafo 2.]. Con tale analisi, e con la separazione stessa dei lemmi, si suggerisce quindi – anche se non senza ambiguità – che *esca*<sup>2</sup> sia una neoformazione tecnica, e che quindi rientri nei numerosi casi nei quali, recentemente, a un oggetto di natura scientifica è stato attribuito, in ambito colto, un nome più o meno sapientemente – e talvolta più o meno correttamente, ma non sarebbe questo il caso – desunto dal latino.

Anche nel *Dizionario Enciclopedico Italiano*, ripreso poi nel vocabolario di Duro (per entrambi si veda qui sopra), dopo aver sottolineato che l' «*esca da fuoco*» è costituita da un fungo (senz'altro identificato con il *Fomes fomentarius*), trattando dell'accezione fitopatologica, con riferimento alla vite, e anche ad altre piante, si indica l'agente patogeno, lo stesso *Fomes fomentarius*, curiosamente senza trarne le pur ovvie conseguenze, e portando anzi fuori strada, dal momento che si conclude affermando che la malattia trasforma «il legno in una massa molle che ricorda l'*esca* usata per accendere il fuoco», suggerendo quindi solo un rapporto analogico, del tutto secondario.

Gli utenti di tale complesso lessicografico non possono quindi non ricavarne che *esca* nell'accezione di “*esca della vite, o mal dell'esca*” sia una voce dotta, una neoformazione tecnica, almeno in parte propiziata da considerazioni analogiche, e che quindi sostanzialmente si sottragga alla storia della tradizione ininterrotta del latino *esca*. Non viene invece mai ricordato che in tale accezione *esca* non è una pur felice riesumazione di archeologia linguistica, ma, al contrario, un termine desunto dalla lingua dei contadini, o dei vignaioli (¶ cap. I.3 in questo stesso volume). Parimenti non viene sottolineata una pur evidente analisi linguistica, che cioè *esca* non è il nome della patologia, bensì dell'agente patogeno (del tipo quindi di “mal della pietra”), e che il meccanismo di formazione deve essere partito da un'espressione quale “avere l'*esca*” (del tipo quindi di “avere i vermi”).

In prima conclusione, nonostante la recenziarietà dell'attestazione, l'analisi linguistica dell'italiano “*esca (della vite)*” non può che essere indissolubilmente inserita in quella del latino *esca*, di cui il termine base è continuazione ininterrotta.

2. In latino, la configurazione semantica del sostantivo *esca* (di etimologia evidente e sicura, derivando dalla radice \**ed-* del verbo *edo*, «mangiare») corrisponde sostanzialmente a quella della sua continuazione italiana «*esca*» che si è vista (con la sola eccezione, apparentemente, di “malattia della vite o di altre piante”, della quale, a quanto ho potuto appurare dagli strumenti lessicografici, non si danno attestazioni dirette ed esplicite)<sup>7</sup>.

<sup>7</sup> Ricorrendo a vari strumenti, ho potuto vagliare circa 3500 attestazioni di *esca*, dall'antichità fino al XVI secolo: si tratta però solo di attestazioni letterarie (mancando ancora un'agevole possibilità di vagliare le attestazioni documentarie).

Il primo significato del latino *esca* è infatti «cibo», di attestazione singolarmente ampia, sia dal punto di vista quantitativo (suddivisibile in un notevole numero di subaccezioni specifiche), sia da quello cronologico, estendendosi per tutto l'arco della latinità, fin dal suo esordio (Livio Andronico, *Carm. fr.* 12).

Già antichissima è comunque la seconda accezione, “allettamento”, sia propriamente (“cibo per attirare i pesci, o altri animali”), sia figuratamente (già in Plauto, *Asin.* 221, una meretrice usata come “esca”).

Anche la terza accezione dell'italiano *esca* (“esca da fuoco”) è ben attestata in latino, ancorché in modo numericamente assai contenuto, e presso autori molto tardi.

L'attestazione fondamentale è quella di Isidoro di Siviglia, che deve essere più diffusamente analizzata. Nel X capitolo del XVII libro dell'opera *Etymologiae sive Origines* (del primo terzo del VII secolo) Isidoro affronta l'etimologia dei nomi dei vegetali che denomina ‘ortaggi’ (*olera*), e al §18, trattando dei funghi, afferma:

fungi, quod aridi ignem acceptum concipiant; φῶς enim ignis est, unde et esca vulgo dicitur, quod sit fomes ignis et nutrimentum

“i funghi (si chiamano così) perché disseccati ricevono in sé il fuoco che accolgono<sup>8</sup>; infatti il *phos*<sup>9</sup> (‘luce’) è fuoco, donde (il fungo) è comunemente detto anche esca, in quanto è alimento e nutrimento del fuoco”.

Ciò che qui interessa non è ovviamente il tenore dell'etimologia (fantasiosamente assurda come di norma presso gli antichi), ma da un lato il fatto che, parlando dei funghi, Isidoro li collega immediatamente e principalmente alla loro utilizzazione come “esca da fuoco”, dall'altro l'esplicita affermazione che il fungo è detto anche *esca*, asseritamente dall'utilizzazione che sembra la principale<sup>10</sup>. Se quest'ultimo passaggio – come tutte le inferenze degli etimologisti antichi – può essere oggetto di discussione (☞ *qui oltre, paragrafo 4.*), la precisa notazione lessicale di una comune (e popolare) accezione “fungo (senz'altro)” per *esca* non può, a mio avviso, essere contestata (almeno per l'epoca di Isidoro). La per altro scontata assurdità dell'etimologia deve aver fatto trascurare una preziosa testimonianza: in nessuno degli strumenti lessicografici del latino compare infatti un'accezione “fungo (senz'altro)” per *esca*, che ritengo invece opportuno recuperare.

Come si è accennato, per l'accezione tecnica di *esca* come “esca da fuoco” non si ha co-

<sup>8</sup> Si noti che l'autore si vale della terminologia, e dell'immagine complessiva, del concepimento animale e umano, secondo la dottrina antica (che riservava alla femmina esclusivamente il ruolo, puramente passivo, di incorporazione e nutrimento): solo alla luce dell'implicito paragone l'espressione è pienamente comprensibile.

<sup>9</sup> Ho preferito traslitterare il termine greco (ovvero «luce») non solo per riprodurre lo scarto linguistico offerto dall'autore, ma anche per mantenere l'ancorché modesta allitterazione che lega *phos* a *fungus*, ovvero l'unico appiglio alla (pseudo)etimologia.

<sup>10</sup> L'utilizzazione del fungo come *fomes* del fuoco è attestata già da Plinio, *Nat.*, 16.208: *teritur ergo lignum ligno ignemque concipit adtritum, excipiente materie aridi fomitis, fungi vel foliorum facillimo conceptu*; 36.138: *qui clavo vel altero lapide percussi scintillam edunt, quae excepta sulphure aut fungis aridis vel foliis dicto celerius praebet ignem*.

munque solo un'attestazione lessicografica, ma anche testimonianze dirette, presso due autori medici, Vindiciano (della fine del IV secolo) e il suo allievo Teodoro Prisciano (dell'inizio del V secolo), con una significativa, quindi, retrodatazione dell'impiego.

Vindiciano (nella *Lettera all'imperatore Valentiniano*, 8)<sup>11</sup> in un elenco di interventi chirurgici comprende: *imponi etiam escas* («imporre anche esche»); Teodoro Prisciano (nel II libro, *Logicus*, dell'*Euporiston*)<sup>12</sup> offre tre attestazioni: (18) *locis vero impatienter dolentibus etiam escae ustiones impono* («sulle parti insopportabilmente doloranti impongo anche bruciature di esca»); (48) *item escae locis imponendae sunt ustiones* («parimenti sulle parti si devono imporre bruciature di esca»); (62) *escas et cauteris partibus thoracis infligo* («sottopongo le parti del torace a esche e cauteri»). Si tratta quindi, evidentemente, in ogni caso, di bruciature per mezzo della brace di un'esca accesa.

Va comunque segnalato che parte dei testimoni testuali di Teodoro offre in luogo di *esca* la variante *isca* (☞ *qui sotto, e, qui oltre, paragrafi 3. e 4.*).

Solo la forma *isca* compare infine in un glossario (probabilmente dell'VIII-IX secolo), che contiene anche corrispondenze con il germanico, e ove appunto<sup>13</sup> *isca* è glossato esclusivamente con *tyndrin*, ovvero il diretto antenato degli attuali inglese *tinder* e tedesco *Zunder* (“esca da fuoco”): significativo è quindi che di *esca/isca* risulti solo l'accezione tecnica.

Al termine di questa prima analisi del versante latino più antico si può concludere che l'opinione comune è che l'accezione tecnica di *esca* (“esca da fuoco”) sia un naturale sviluppo del significato primario «cibo», come si è visto implicitamente affermare Isidoro («è comunemente detto anche esca, in quanto è alimento e nutrimento del fuoco»). Conferma di tale percorso si potrebbe trovare in un complesso di attestazioni<sup>14</sup>, ove *esca* viene usato (senza alcun riferimento al tecnicismo “esca da fuoco”) come “una materia che alimenta il fuoco” (ovvero come ‘alimento’ del fuoco), ma si deve segnalare che, a fronte dell'equilibrata diffusione dell'impiego di *esca* in tutta la letteratura latina (che si è già accennata), questo uso specifico è confinato agli autori cristiani (comprese le traduzioni bibliche), con l'unica eccezione di Macrobio, in contesto, comunque, esasperatamente tecnico<sup>15</sup>. Tale localizzazione, linguistica, stilistica e cronologica, è pienamente congruente con quella dell'accezione “esca da fuoco”, ma pone legittimi interrogativi su quale sia stato il punto – e quindi il senso, la direzione – di diffusione.

Nel medioevo latino le numerosissime attestazioni di *esca* si mantengono nel quadro semantico di quelle classiche e tardoantiche, ovvero con quasi assoluta prevalenza dell'accezione originaria (“cibo”) e di quella, altrettanto antica, come si è visto, di “allettamento” (a partire da “cibo esposto per catturare prede”). Sporadiche le attestazioni di *esca* come

<sup>11</sup> In *Marcelli De medicamentis liber*, Berlin, 1968 (*Corpus Medicorum Latinorum*, V).

<sup>12</sup> *Editi a V. Rose*, Lipsiae 1894.

<sup>13</sup> *Corpus Glossariorum Latinorum*, vol. V, ed. G. GOETZ, Lipsiae 1894, p. 367, 27.

<sup>14</sup> Enuceate dal *Thesaurus linguae Latinae*, s.v. *esca*, II A (col. 855, 56-67).

<sup>15</sup> *Sat.*, 7, 16, 24. Si sta trattando dell'uso di legni diversi per alimentare i fuochi utilizzati in varie tecnologie: nell'esempio che ci riguarda, per la fusione e la lavorazione del vetro il fuoco è alimentato da legno di tamerici (*qui vitro solvendo formandoque curant de arbore cui myricae nomen est igni suo escam ministrant*).

“alimento del fuoco”<sup>16</sup> e, più specificamente, come “esca da fuoco”, normalmente con menzione della pietra focaia e dell'acciarino<sup>17</sup> (o anche della lente di cristallo, che concentrando i raggi solari è in grado di accendere un'esca<sup>18</sup>).

3. La questione è però più complessa, per l'esistenza del vocabolo greco ἴσκα (*iska*), attestato anch'esso in ambito medico, e in epoca piuttosto tarda, con un campo semantico strettamente sovrapponibile a quello complessivo del tecnicismo latino *esca* “da fuoco” che si è visto.

Aezio Amideno (medico del VI secolo) attesta (VII 91) che «alcuni, seguendo ciecamente un uso barbarico [ovvero estraneo alla medicina greca], a fronte dei reumi cronici intorno agli occhi, bruciano le tempie o per mezzo di farmaci, o per mezzo della parte interna dei tronchi del noce, ciò che chiamano *iskai*. Altri anche arroventando il ferro fanno la cauterizzazione»<sup>19</sup>.

Alessandro Tralliano (medico del VI secolo) attesta (I. XII) un ingrediente per cataplasmi, alternativo all'aglio, e quindi, ovviamente, consistente in vegetali «che presso i barbari sono denominati *iskai*»<sup>20</sup>. Assai importante è comunque l'esplicita affermazione trattarsi di parola non greca (né, certo, latina: ☞ *qui sotto, e paragrafo 4.*)<sup>21</sup>.

<sup>16</sup> *Pauca problemmata de enigmatibus ex tomis canonicis* (sec. VIII), *Praefatio et libri de Pentateucho Moysi, De Numeris*, par. 444 (lin. 73); Agobardo di Lione (sec. VIII-IX), *De spe et timore* (lin. 919); Stefano di Borbone (sec. XIII), *Tractatus de diversis materiis praedicabilibus*, 1.4.2 (lin. 251), 1.4.6 (lin. 1224).

<sup>17</sup> Nel Messale mozarabico e negli Statuti dell'Ordine Certosino (cfr. C. DU FRESNE DU CANGE, *Glossarium mediae et infimae latinitatis*, ... ed. nova ... a L. FAVRE, Niort, 1884, s.v.); Beato di Liébana (seconda metà dell'VIII sec.), *Commentarius in Apocalipsin*, 2.5.33 (lin. 222), 2.5.40 (lin. 3), 2.5.41 (lin. 8); Raimondo Lullo, *Liber de forma Dei*, dist. 5 (lin. 1788).

<sup>18</sup> Ruperto di Deutz (sec. XI-XII), *Liber de divinis officiis*, 5, p. 182 (lin. 1465); Giovanni Belet (sec. XII), *Summa de ecclesiasticis officiis*, 107 (lin. 12); Guglielmo Duranti (seconda metà del XIII sec.), *Rationale divinarum officiorum*, 4.15.6 (lin. 111), 6.80.1 (lin. 9).

<sup>19</sup> «τινὲς βαρβαρικῶ νόμῳ δουλεύοντες, ἐπὶ τῶν χρονιζόντων περὶ τοὺς ὀφθαλμοὺς ρευμάτων καίουσι τοὺς κροτάφους, ἤτοι διὰ φαρμάκων, ἢ τῆ ἐντεριῶν τῶν καρῦτων ξύλων, ὃ καλοῦσιν ἴσκα. τινὲς δὲ καὶ σίδηρον ἐκπυρῶσαντες ποιοῦνται τὴν καύσιν». L'editore (A. Olivieri, in *Aetii Amideni Libri medicinales V-VIII*, Berolini 1950 [*Corpus Medicorum Graecorum*, VIII 2] stampa ἴσκα, segnalando comunque in apparato la variante ἴσκα, che, sulla base del quadro complessivo, credo decisamente da preferire).

<sup>20</sup> Ed. Th. PUSCHMANN, Wien, 1878 (rist. anast. Amsterdam, 1963), lib. XII (*De podagra*), p. II.535 P.: «αὶ παρὰ τοῖς βαρβάροις ἴσκα καλοῦμεναι». Puschmann (p. 534, n. 1) riferisce l'interpretazione di un commentatore rinascimentale secondo il quale *iskai* dovrebbe essere interpretato nell'accezione (consueta in ambito medico) di “esca da fuoco” per piccole cauterizzazioni, senza prendere però una posizione precisa, nemmeno in sede di traduzione. Più favorevole in tal senso è invece G. GUNDERMANN, *Germanische Wörter bei Griechen und Römern*. I, «Zeitschrift für Deutsche Wortforschung», 8. 1906/07, p. 113 sgg. (a p. 119). L'andamento complessivo della trattazione di Alessandro smentisce però una siffatta interpretazione: si sta qui trattando solo di cataplasmi, e dal momento che certamente l'*iska* era un fungo, si dovrà concludere che qui se propone un diverso uso, senza alcuna relazione con quello, da essiccato, per “esca da fuoco”.

<sup>21</sup> Si è visto qui sopra Aezio Amideno definire «uso barbarico» (almeno nella fattispecie clinica) la cauterizzazione per mezzo di ciò che i seguaci di tale uso chiamano *iskai*. Ciò potrebbe comportare che, come la terapia è definita ‘estranea alla medicina greca’, così anche la denominazione sia ‘barbarica’, ovvero non di origine greca (né, ovviamente, latina). Tale esegesi è — a mio avviso — non sicura, ma, certo, la possibile conferma dell'affermazione ‘linguistica’ di Alessandro non può essere trascurata.

Paolo Egineta (medico del VII secolo) afferma (VI, 49) anch'egli che «alcuni non cauterizzano col ferro, ma con quelle che sono chiamate *iskai*: sono le *iskai* dei corpi spugnosi che crescono sulle querce e sui noci»<sup>22</sup>. Anche successivamente (VI, 50) Paolo ripete che alcuni cauterizzano «con piccoli cauterii di ferro, altri per mezzo delle cosiddette *iskai*»<sup>23</sup>.

Nel periodo bizantino le attestazioni di *iska* confermano l'accezione di “esca da fuoco” non solo nell'ambito tecnico dell'uso medico, ma anche nella vita quotidiana: gli imperatori Leone VI il Filosofo e Costantino VII Porfirogenito, in elenchi di suppellettili, riportano più volte *pyrekbola* e *iskai* («pietre focaie ed esche») <sup>24</sup>. Anche negli scolii triciniani al v. 768 delle *Nuvole* di Aristofane, relativi all'*hyalos*, la lente di cristallo con cui si può accendere il fuoco, si spiega che facendo passare attraverso la lente i caldi raggi del sole estivo «accostando quella che comunemente è detta *iska* mirabilmente da questa accendono il fuoco»<sup>25</sup>. Inoltre, nel *Lessico* dello pseudo Zonara, *iska* è glossata come «legno in cui si accende il fuoco»<sup>26</sup>.

Si deve infine segnalare che nel *Mega Lexikon tēs Hellēnikēs glōssēs* del Dēmētrakos<sup>27</sup> (fondamentale lessico di tutta la lingua greca, dalle origini fino alla contemporaneità) la voce ἴσκα viene registrata come appartenente anche alla lingua popolare, ovvero al neogreco, sotto la definizione “vegetale parassito, fungo agarico che cresce sulla quercia”. La sopravvivenza nell'uso contemporaneo è attestata nella lettera di Th. Pavlou di Alaşehir (nell'entroterra di Smirne) riferita da M. Ravaz, docente a Montpellier, nell'articolo intitolato *Sur le folletage ou apoplexie de la vigne*, comparso il 9 dicembre 1906 su «Le Progrès agricole et viticole» (☞ *cap. I.3 in questo stesso volume*). In tale lettera si descrive una malattia della vite, chiamata *iska*, nome che indica anche la massa legnosa friabile che si può estrarre dall'interno del tronco cariato. Fino al grande esodo del 1922 l'entroterra smirneo era abitato da greci, e non si può fare a meno di notare che Alaşehir si trova a circa 80 chilometri dall'antica Tralle, la patria di Alessandro, che si è visto qui sopra conoscere l'appartenenza linguistica di *iska*, ancorché si limiti a segnalare che è parola non greca.

Per quanto riguarda il versante greco complessivo, si può dunque, almeno provvisoriamente, concludere che *iska* è saldamente attestata come “esca da fuoco”, nel suo uso quotidiano con la pietra focaia, e nel suo uso specifico in ambito medico, per produrre cau-

<sup>22</sup> Ed. I.L. HEIBERG, Lipsiae (1921) 1924 (*Corpus Medicorum Graecorum*, IX 2) «ἔτεροι δὲ οὐδὲ σίδηρῳ καίουσιν, ἀλλὰ ταῖς καλοῦμεναις ἴσκαϊς: εἰσὶ δὲ σπογγώδη τινὰ σώματα αἱ ἴσκαϊ ἐν ταῖς ὄρυσι καὶ ταῖς καρύαις γινόμεναι».

<sup>23</sup> «οἱ μὲν σιδηροῖς λεπτοῖς καυτηρίοις, οἱ δὲ διὰ τῶν καλουμένων ἰσκῶν».

<sup>24</sup> Leonis *Tactica*, 5, 4 (PG 107, 717 D) «πυρέκβολα καὶ ἴσκας» (grafia itacistica); Constantini Porphyrogeniti *De caerimoniis Aulae Byzantinae*, appendice al libro I (ex rec. Io. Iac. REISKII, Bonnae 1829, p. 471, 17-18 e p. 474, 1-2 [PG 112, 904 A; 909 D]) «πυρέκβολον μετὰ ἴσκας ε πυρέκβολα μετὰ ἴσκας».

<sup>25</sup> *Prolegomena de Comoedia Scholia in Achamenses, Equites, Nubes*, fasc. III 2, *Scholia recentiora in Nubes*, ed. W.J.W. KOSTER, Groningen, 1974, ad 768d: «προσαγαγόντες τὴν κοινῶς λεγομένην ἴσκαν παραδόξως ἐκ ταύτης πῦρ ἄπτουσιν».

<sup>26</sup> *Iohannis Zonarae Lexicon ...* edidit I.A.H. TITTMANN, Lipsiae 1808, s.v. ἴσκα: «ξύλον ἐν ᾧ ἄπτεται τὸ πῦρ».

<sup>27</sup> Δ. ΔΗΜΗΤΡΑΚΟΥ, *Μέγα λέξικον τῆς ἐλληνικῆς γλώσσης*, Ἀθήναι, 1933-, s.v. ἴσκα.



terizzazioni, verisimilmente in modo meno invasivo rispetto al ferro incandescente. L'*iska* è un fungo (si veda Paolo di Egina) e non solo usato (ovviamente disseccato) come “esca da fuoco”, ma anche per cataplasmi (si veda Alessandro di Tralle)<sup>28</sup>. Però con *iska* si indica anche l'interno (friabile) di un tronco, verosimilmente attaccato e cariato dal fungo, parimenti utilizzabile come “esca da fuoco” (si veda Aezio Amideno, e anche lo pseudo Zonara).

Si è visto affermare Alessandro di Tralle che la parola non è greca: la patria dell'autore può far ragionevolmente pensare a una lingua anatolica (ancora popolarmente utilizzata almeno fino all'inizio dell'età bizantina – come, ad esempio, il frigio): si veda comunque immediatamente qui oltre.

4. Resta quindi solo da affrontare la questione, ormai ineludibile, del rapporto etimologico fra il latino *esca* e il greco *iska*.

A una prima rassegna della letteratura, l'opinione largamente prevalente è senz'altro che il greco *iska* sia un prestito proveniente dal latino. Tale è la posizione di Walde-Hofmann nel fondamentale vocabolario etimologico del latino<sup>29</sup>, ove il latino *esca* nell'accezione di “cibo” come *fomes ignis* (ovvero “esca da fuoco”) viene considerato primario rispetto al greco *iska* che ne deriverebbe, come pure nell'altrettanto basilare vocabolario etimologico romanzo di Meyer-Lübke<sup>30</sup> (e nel *Dizionario etimologico italiano* di Battisti)<sup>31</sup>. Anche sul versante neogreco Meyer<sup>32</sup> registra *iska* fra i prestiti dal latino. Per un accurato *status quaestionis* sulla linea interpretativa che vuole *iska* derivante dal latino *esca* si veda Sofer<sup>33</sup>, nella ricerca che prende le mosse dalla già analizzata testimonianza di Isidoro di Siviglia.

A tale interpretazione (che ovviamente ha il suo punto di forza nel fatto che in latino l'accezione “esca da fuoco” appare come palesemente motivata all'interno del non problematico *esca* come “cibo” – ovvero come ‘alimento del fuoco’ –, laddove in greco *iska* è del tutto isolato e non trasparente) si sottraggono due fondamentali strumenti lessicografici, il *Thesaurus linguae Latinae* nella già citata voce *esca* (ove si afferma, di *esca* nell'accezione di “esca da fuoco” come possibile derivato dal valore base: “ma la parola, che spesso viene scritta *iska*, sembra essere di tutt'altra origine: cfr. ἴσκα”)<sup>34</sup>, e soprattutto, l'autorevole, e più recente, dizionario etimologico greco di Chantraine<sup>35</sup>, ove di ἴσκα non si dà etimologia, né tanto meno si accetta una derivazione dal latino *esca*.

<sup>28</sup> E forse, come si è detto, anche Aezio Amideno.

<sup>29</sup> *Lateinisches etymologisches Wörterbuch* von A. WALDE, 3., neubearbeitete Auflage von J.B. HOFMANN, Heidelberg, 1938, s.v. *esca* (invariato nelle edizioni successive).

<sup>30</sup> *Romanisches etymologisches Wörterbuch* von W. MEYER-LÜBKE, 3. Vollständig neuarbeitete Auflage, Heidelberg, 1935, s.v. *esca* (n. 2913).

<sup>31</sup> *Dizionario etimologico italiano*, Firenze, 1966, s.v. *esca* (l'opera è sotto la direzione di C. BATTISTI, cui si deve, in particolare, la responsabilità e la cura esclusiva della lettera E, che qui ci riguarda).

<sup>32</sup> G. MEYER, *Neugriechische Studien. III. Die lateinischen Lehnworte im Neugriechischen*, p. 21, «Sitzungsberichte der Philosophisch-Historischen Classe der k. Akademie der Wissenschaften», 132. Band, Wien, 1895, III.

<sup>33</sup> J. SOFER, *Lateinisches und romanisches aus den Etymologiae des Isidorus von Sevilla*, Göttingen 1930 (rist. an. Hildesheim, New York, 1975), pp. 129-131.

<sup>34</sup> «attamen vox, quae saepe iska scribitur, omnino alterius originis esse videtur: cfr. ἴσκα».

<sup>35</sup> *Dictionnaire étymologique de la langue grecque. Histoire des mots* par P. CHANTRAINE, Paris, 1968.

Se Chantraine si limita a ignorare un'affermata e diffusa posizione ormai quasi vulgata (con un silenzio, quindi, estremamente eloquente), nel *Thesaurus linguae Latinae* viene citata la ricerca di Gundermann<sup>36</sup>, ove appare la considerazione, a mio avviso fondamentale, che la testimonianza di Alessandro Tralliano<sup>37</sup> esclude una derivazione dal latino, con la sua affermazione trattarsi di un prestito da una lingua “barbara”. Purtroppo Gundermann ne trae una conclusione inaccettabile, che cioè la seriorità delle attestazioni (a partire dalla fine del IV secolo) non può che far pensare alle popolazioni che nel periodo erano senz'altro denominate ‘barbare’, ovvero le popolazioni germaniche (proponendo un'etimologia che ricollegerebbe *iska* alla radice del tedesco *Asche*, e che è stata giustamente respinta)<sup>38</sup>.

Anche senza considerare l'esplicita, e ben difficilmente eludibile, affermazione diretta di Alessandro di Tralle che la parola *iska* non è di origine greca, ma nemmeno latina, da un esame approfondito delle singole attestazioni, e del quadro complessivo che ne risulta, sembra comunque assai improbabile che un tecnicismo latino così spinto, e di ambito palesemente popolare, possa essere penetrato nella terminologia greca, parimenti popolare, relativa a vegetali e alle loro patologie, nonché a una tecnologia elementare e di uso quotidiano.

Astrattamente molto più probabile appare una via inversa, ma non lineare, comportante una separatezza iniziale del latino *esca* e dell'ormai greco (ancorché linguisticamente non di origine greca) *iska*, con un successivo sostanziale incrocio accompagnato da una forte rivitalizzazione paretimologica (impiantata su una situazione materiale comune al mondo greco e a quello latino, ovvero l'utilizzazione come “esca da fuoco” di funghi disseccati, i medesimi funghi parassiti di alberi e responsabili di una patologia vegetale non indifferente). Secondo la soluzione che propongo, quindi, il greco *iska* (nel suo completo significato di “fungo epifito” e, disseccata, di “esca da fuoco”) si sarebbe affacciato al mondo latino, ove sarebbe stato popolarmente reinterpretato come *esca* (*ēscā*: la pronuncia era molto vicina), ovvero come “alimento (del fuoco)” assumendo anche, nel calco semantico comportato dall'incrocio, il valore di “fungo”<sup>39</sup>. La trattazione di Isidoro che si è diffusamente esaminata (☞ *qui sopra*, *paragrafo 2.*), nella parte ove si afferma che il fungo è detto comunemente (o popolarmente) *esca* in quanto alimento e nutrimento del fuoco, si rivelerebbe dunque corretta, ancorché inconsapevolmente (si tratta comunque di una valutazione personale, sorretta da un'analisi linguistica rudimentale), non già nell'ambito di uno sviluppo semantico interno al solo latino, ma nell'intricato incrocio con un termine proveniente dal greco.

<sup>36</sup> *Art. cit.*, pp. 116-119.

<sup>37</sup> E forse anche, come si è visto, di Aezio Amideno.

<sup>38</sup> In un primo momento fu accolta da MEYER-LÜBKE (nell'edizione del suo *Romanisches etymologisches Wörterbuch*, Heidelberg, 1911), che al n. 4552 aveva registrato, sia pur dubitativamente, un «*iska* (germ.)» “esca da fuoco”, ma nell'edizione definitiva del 1935 (si veda qui sopra) il lemma è soppresso. Si vedano anche le opposizioni di SOFER, *op. cit.*, *loc. cit.*, e di WALDE-HOFMANN, *op. cit.*, s.v. (con la bibliografia citata).

<sup>39</sup> Un siffatto incrocio – per sua natura di ambito popolare –, che avrebbe quindi introdotto nel latino *esca* una specifica connessione con l' ‘accensione del fuoco’, potrebbe essere stato anche il punto di irradiazione degli usi di *esca* come generico ‘alimento del fuoco’ che si sono visti qui sopra (n. 2) caratteristici di un livello del latino più popolare.

Una soluzione che preveda un incrocio è plausibile non solo nell'ambito semantico che si è sin qui illustrato, ma ha una conferma, a mio avviso decisiva, anche in ambito fonetico. Negli esiti romanzi di *esca* si riscontrano infatti perturbazioni areali che vedono forme presupponenti *isca*, che Meyer-Lübke (si veda qui sopra) giudica “non chiare”, limitandosi a riferire precedenti proposte di un incrocio con *viscum* (nell'accezione di “pania”, avvicinate quindi a *esca* come elemento della trappola)<sup>40</sup>, ipotesi invece pienamente accettata dal già citato studio di Sofer (p. 130). Ora un tale incrocio (che per altro è difficilmente compatibile con le già ricordate forme *isca*, o varianti *isca* in luogo di *esca* nella tradizione manoscritta dei testi esaminati qui sopra) è francamente inaccettabile, e solo la presunzione che vuole il greco *iska* derivante dal latino *esca* ha fatto chiudere gli occhi sulla soluzione più ovvia ed evidente, ovvero in latino un incrocio col greco che si palesa (ancorché non in modo equibratamente simmetrico) sia sul versante significativo, sia sul versante grafico.

Credo che la soluzione che qui propongo sia ragionevole anche perché la possibilità alternativa, che lo sviluppo terminologico del latino *esca* sia giunto in modo del tutto autonomo e indipendente a un valore esattamente corrispondente a quello del greco *iska* (ovvero di un quasi omofono) esclusivamente in virtù del caso, mi pare di per sé estremamente improbabile<sup>41</sup>.

Non da scartare, infine, una variante alternativa dell'ipotesi, che cioè *iska* appartenga al fondo linguistico mediterraneo preindeuropeo, comune all'oriente e all'occidente, e che quindi l'incrocio abbia avuto luogo indipendentemente già in latino, e sia stato solo rafforzato dalla successivamente acquisita corrispondenza col greco (in un termine ereditato da una lingua anatolica, tributaria del medesimo fondo linguistico).

5. Si può quindi concludere che, se in latino non si danno attestazioni esplicite ed evidenti di *esca* come “malattia delle piante”, tutto lascia supporre che ciò dipenda solo dall'incompletezza delle attestazioni, perché sicuro e indiscutibile è il suo valore come “fungo”, e (attraverso il soccorso di *iska*) come fungo epifito, che produce gli effetti ora riconosciuti come “male dell'esca”.

Considerando anzi solidarmente – come ormai pare inevitabile – il complesso greco/latino *iska/esca*, in tutte le complesse articolazioni che si sono illustrate, credo che la sua storia linguistica fornisca una preziosa base per l'approfondimento diacronico dell' “esca della vite”.

<sup>40</sup> Anche l'incrocio proposto ha comunque difficoltà fonetiche, per superare le quali sono state proposte vere acrobazie (si veda SOFER e MEYER-LÜBKE, *cit.*).

<sup>41</sup> L'improbabilità rasenta l'incredibilità, ove si consideri che in latino, per spiegare gli anomali esiti romanzi presupponenti un *isca*, non si è potuto fare a meno di ipotizzare un incrocio fonetico con una parola iniziante con *(v)isc-*, ma diversa da *iska*.

## I.3 Notizie storiche sul mal dell'esca

Giuseppe Surico\*

### I.3.1 Premessa

In più occasioni è stato scritto che l'esca è malattia della vite nota probabilmente già ai primi contadini che si sono messi a coltivare la preziosa pianta. È stato anche scritto che una descrizione dell'esca è presente in testi che risalgono al Medioevo o anche a epoche precedenti. Si citano al riguardo la *Storia naturale* di Gaio Plinio Secondo (23-79 d.C.), il libro *Kitab al-Felahah* (*Libro di Agricoltura*) di Ibn al-Awam (? – 1185) e il *Trattato dell'Agricoltura* (scritto in lingua latina e tradotto in volgare alcuni anni dopo la morte dell'autore) del 1304, di Pietro de' Crescenzi o Pier Crescenzio (1230? – 1320?). Queste ultime due opere rappresentano, insieme al trattato greco, i *Geoponica* (opera stampata per la prima volta nel 1539 – sulla base di una compilazione anteriore, la *Sinossi delle pratiche agricole*, scritta nel IV secolo da Vindonio Anatolio di Beirut – e attribuita, almeno in parte, a Cassiano Basso, vissuto probabilmente nel VI secolo nell'impero bizantino), le prime opere agronomiche di rilievo (pregevole, in particolare, quella di Ibn al-Awam) dopo l'ultima grande opera agronomica della Latinità: la *Naturalis Historia* di Plinio il Vecchio (fig. 1).

Una lettura forse più attenta di alcune parti di questi e altri scritti rivela che mentre l'apoplessia (nel senso di morte improvvisa della pianta) e la carie (trasformazione del legno in una massa friabile, inconsistente) sono fatti che non sono sfuggiti all'osservazione di naturalisti e viticoltori, i tipici sintomi fogliari dell'esca (foglie “tigrate”) o non sono stati mai descritti o sono stati descritti ma in modo tale da rendere difficile una loro identificazione come sintomi della malattia. Non c'è comunque traccia (almeno nelle opere consultate e almeno fino al 1926) di una descrizione delle foglie “tigrate” in associazione alla carie e tanto meno all'apoplessia. Di seguito i risultati di un breve esame di alcuni scritti, antichi e più recenti, volto alla ricerca del percorso scientifico che ha portato a combinare in un'unica malattia, carie, foglie tigrate e apoplessia.



Fig. 1 - Frontespizio della *Naturalis historia* di Plinio il Vecchio

\* Università di Firenze email: giuseppe.surico@unifi.it

### I.3.2 Origine e significato dei termini esca-iska

Le accurate ricerche lessicografiche di Elio Montanari (<sup>ES</sup> cap. I.2) sul termine *iska*, in greco, e sul corrispondente latino *esca* sembrano aver accertato (nei limiti del sia pure ampio numero di documenti consultati) la mancanza, in latino, di sicure attestazioni riguardanti l'uso della parola *esca* come malattia delle piante o, più specificamente, della vite. Più certo è invece l'uso di entrambi i termini come fungo che produceva effetti poi noti come *mal dell'esca* e, successivamente e più precisamente, come *carie bianca del legno di vite*.

Abbondanti sono invece i riferimenti all'impiego del legno cariato di vari alberi (querchia e noce fra i più citati), così come del materiale ricavato da funghi essiccati, come combustibile per accendere il fuoco. A quest'ultimo riguardo, giova ricordare la fiorente industria dell'esca che sorse a Fontanigorda (con succursali a Genova, Ferrara, Ravenna, Marsiglia) dove per secoli (l'attività si interruppe nel periodo compreso fra le due guerre mondiali) è stata prodotta *esca* (oltre che bende emostatiche) utilizzando come materia prima i carpofori di *Fomes fomentarius* (*fomes* = alimento, *esca* per il fuoco), un fungo basidiomicete il cui corpo fruttifero somiglia allo zoccolo di un cavallo, chiamato, per questo uso, anche *fungo dell'esca*. *Falso fungo dell'esca*, ma solo perché di minore qualità, era chiamato invece *Phellinus igniarius* (sinonimi di questo fungo sono *Boletus igniarius*, *Fomes igniarius*, *Fomes trivialis*, *Phellinus trivialis*, *Polyporus igniarius*) (fig. 2). L'uso molto antico dei carpofori di *F. fomentarius* come *esca* per accendere il fuoco è anche verosimilmente attestato dal ritrovamento di frammenti del fungo, insieme a pezzetti di pirite e selce (usati probabilmente per far scoccare la scintilla), nella borsa che portava legata alla cintola il cosiddetto "Uomo del Similaun", vissuto nell'alta Val Senales circa 5000 anni fa, la cui mummia è stata scoperta nel 1991 sulle Alpi Venoste (ghiacciaio di Similaun, 3210 m s.l.m.) al confine fra Italia e la Valle del Tirolo austriaco Ötztal.



Fig. 2 - Carpofori di *Fomes fomentarius* (a) e di *Phellinus igniarius* (b)

### I.3.3 Prime notizie sull'apoplessia e sulla carie del legno

In un articolo intitolato *Sur le folletage ou apoplexie de la vigne*, comparso il 9 dicembre 1906 su "*Le Progres agricole et viticole*", M. Ravaz, docente a Montpellier, riferisce di una lettera ricevuta da un certo signor Th. Pavlou di Alasehir, nei pressi di Smirne, in Turchia. Pavlou chiede a Ravaz, suo insegnante in un corso di agricoltura, di raggiungerlo su "una curiosa malattia della vite" che da quelle parti è chiamata "Iska" e che viene osservata in vigneti di più di 6 anni, quasi mai prima di questa età. Pavlou così descrive la malattia in questione: "in luglio si osservano nel vigneto viti le cui foglie improvvisamente seccano, dapprima il parenchima e poi anche le nervature. Branche e tralci dell'anno seccano completamente e poi anche i grappoli. A volte è colpita l'intera pianta, altre volte solo qualche tralcio (fig. 3). Il fenomeno è fulminante e impiega non più di un giorno per completarsi. Se si pratica un taglio del ceppo nel punto in cui si dipartono le branche si può estrarre dall'interno del tronco una massa legnosa friabile che è chiamata *iska* (*iska* è quindi la malattia e *iska* è anche il legno cariato). L'asportazione di questo legno degradato arresta la malattia". In effetti, in inverno, i viticoltori più attenti, riferisce Pavlou, sanno riconoscere le viti ammalate poiché l'estremità dei tralci non è perfettamente lignificata e allora, al momento della potatura, asportano le parti cariate dalle viti ritenute ammalate e l'anno successivo la malattia non si mostra. È un intervento, quest'ultimo, efficace, secondo Pavlou, ma che occorre ripetere ogni anno.



Fig. 3 - Vite apoplettica

Pavlou si chiede nella sua lettera se la malattia che ha descritto corrisponde, come a lui sembra, a quella del '*folletage*', di cui Ravaz ha trattato nel suo corso alla Scuola di Agricoltura di Montpellier, frequentata a suo tempo anche da Pavlou, e che, quindi, *folletage*, normalmente attribuito a cause fisiologiche (così si esprime Viala, già nel 1887, in *Maladies de la vigne*, p. 431), e *iska* non siano la stessa malattia. Pavlou riferisce anche di aver osservato una striscia gialla sotto la corteccia di cui anche aveva parlato Ravaz nelle sue lezioni (la descrizione di questo sintomo è poi ripresa da Arnaud e Arnaud nel 1931 e da altri autori e più recentemente anche da Larignon quando descrive, nel 2001, un non chiaramente identificato caso di *Black dead arm*).

Tre fatti interessanti si colgono nella lettera di Pavlou:

1. con il termine *iska* veniva indicata l'apoplezia della vite (oltre che il legno cariato);
2. la malattia compariva improvvisamente e il suo decorso era fulminante;
3. nella descrizione della malattia non si fa cenno a sintomi diversi dall'avvizzimento.

Riguardo a quest'ultimo punto si potrebbe, dunque, affermare, a meno che le cose non siano cambiate nel tempo, che, quando e se venivano osservati i sintomi fogliari che si sono poi ritenuti propri dell'esca, essi venivano assegnati a qualche altro accidente che colpiva la vite. Ma potrebbe esserci anche un'altra spiegazione. Per i francesi il *folletage* (= disseccamento improvviso della pianta) era determinata all'epoca da cause fisiologiche. Così Pavlou, limitandosi a ciò che aveva imparato dalle lezioni di Ravaz, riferisce nella sua lettera solo del colpo apoplettico e non menziona i sintomi fogliari. Ma quest'ultima possibilità è da scartare per le ragioni spiegate oltre.

A ogni modo, Ravaz risponde a Pavlou che le caratteristiche dell'*iska* gli paiono identiche a quelle del *folletage* o *apoplezia*: "le piante muoiono in entrambi i casi dopo aver mostrato gli stessi sintomi interni (carie)". L'aspetto interessante che rileva Ravaz nella lettera di Pavlou è la pratica di risanamento mediante asportazione della carie dalle piante ammalate. L'esito positivo di questa operazione sembra stabilire, è la deduzione di Ravaz, una relazione di causa ed effetto tra la carie e il *folletage*-apoplezia. La carie dunque provocherebbe il disseccamento improvviso delle piante.

Per verificare questo punto Ravaz esamina un grande numero di viti morte per apoplezia confermando che sempre, queste viti, presentano la carie nel legno. Comincia così a consolidarsi l'ipotesi di una correlazione fra carie e apoplezia.

### I.3.4 Riferimenti storici su Apoplezia, Carie, Esca e Mal dell'esca

Alla morte improvvisa di una qualsivoglia pianta da tempo viene dato il nome di apoplezia (parola latina di origine greca: *αποπληξια*, der. di *αποπλησσειν* 'stordire', comp. di *πλεσσειν* 'colpire'). L'apoplezia la si può considerare un fenomeno eclatante nella sua manifestazione, ma abbastanza aspecifico, potendo essere dovuto a cause sia patologiche sia fisiologiche.

Apoplezia, così come carie e, per certi versi, anche esca sono parole che, come prima detto, ricorrono talvolta negli scritti di autori antichi ma mai, almeno così sembra, riferiti a un'unica malattia o a un'unica pianta.

#### Catone e Plinio

Nelle opere che trattano di agricoltura di Catone il Censore (*De Agri Cultura*) e di Gaio Plinio Secondo (*Storia naturale*) non ci sono riferimenti specifici che ci fanno ricordare l'apoplezia o il mal dell'esca. Diversamente accade per la carie del legno. Ad esempio Plinio, quando tratta della potatura della vite, ci dice che "...bisogna tagliare sempre fra due gemme, per non arrecare ferite agli occhi [*gemme*] nella parte tagliata. Se questa si presenta nera [*forse necrosi o carie*] ritengono che sia guasta, e che si debba tagliare fino a trovare il sano, perché da ciò che è difettoso non può uscire legno utile (libro XVII, edizione Einaudi del 1984, p. 619)". In un altro passaggio Plinio ricorda Catone quando questi definisce in modo sintetico e secondo la

sua maniera i difetti della terra: "Evita di calcare la terra carriata col carro o col gregge". Che cosa crediamo, scrive Plinio, "che egli [*Catone*] abbia voluto indicare di così temibile, con questa espressione, da proibire quasi di camminarvi [*sul terreno di una vigna*]? Riconduciamoci alla "*carie del legno*" – scrive Plinio –, e ci renderemo conto che i difetti che egli tanto detesta sono quelli di un terreno arido, pieno di crepe, scabro, biancastro, corrosivo, spugnoso". Plinio sembra ritenere che un terreno con queste caratteristiche possa portare alla carie del legno (carie è parola latina proveniente da radice indoeuropea che indica "rompere, rovinare" e che significa putrefazione, tarlatura, corrosione, marciume del legno o delle ossa).

Infine, Plinio, riferendo dei lavori agricoli in vigna, fa un accenno alla sofferenza (disseccamento?) delle viti per l'azione di venti caldi: "In questo spazio di tempo [*verosimilmente fra la fine di luglio e la fine di agosto*] si gioca la sorte delle viti, poiché per le uve è decisivo quell'astro [*Sirio*] che abbiamo chiamato Canicola [*ancora oggi la canicola rappresenta il periodo del maggiore caldo estivo, dal 24 luglio al 26 agosto; in particolare il caldo afoso delle ore centrali della giornata, caratterizzato da alti valori di temperatura e umidità e assenza di vento. Il nome deriva dal latino Canicula – "piccolo cane" –, ovvero la stella più luminosa – Sirio – della costellazione del Cane Maggiore*]; da questo si dice che esse hanno il *carbonchio* [*carbunculus* o *carbunculatio*], perché è come se venissero bruciate da un carbone ardente" (libro XVIII, p. 811). Di *carbonchio* Plinio parla anche a proposito di un annerimento dei germogli bruciati dalle gelate di primavera o per effetto della rugiada (pp. 635 e 813).

#### Pietro de' Crescenzi e Ibn al-Awam

Pietro de' Crescenzi in *De nocuenti che advengono alle viti, e di loro cure*, cap. XVIII del suo *Trattato di Agricoltura*, riferisce dei danni che possono derivare alle viti e alle uve a causa di piante infestanti, del gelo, della brina, di insetti e di qualche altra avversità, ma non sembra dare notizie (anche in altri capitoli del suo libro) di un'affezione la cui descrizione somigli all'esca. Invece, Ibn al-Awam, il quale trae le sue informazioni in gran parte dal *Nabathaen Agriculture* di Ibn Wahshiya (X secolo) – che a sua volta usa come fonti vari scrittori greci, latini, indiani e arabi – descrive nel cap. XIV del suo *Kitab al-Felahah* una malattia in cui le foglie, ma anche, in parte, viticci e acini, acquistano un intenso colore rosso mentre i piccioli delle foglie divengono nerastri e i tralci avvizziscono. Giudicati nel complesso e con qualche distinguo, questi sintomi potrebbero riferirsi all'esca come pure all'attuale malattia di Pierce, o all'accartocciamento fogliare o a chissà cos'altro.

#### Davide Carboni

In uno scritto del 1810, Davide Carboni, pubblico perito agrimensore vtrallese, autore di un volume intitolato *Il Geometra Perito*, nel riferire della malattia allora nota con il nome di *Poliarchia* (p. 99) – fessurazione della corteccia lungo il pedone a causa di eccessivo nutrimento e conseguente necessità da parte della pianta di aprire la sua corteccia per sfuggire al rischio di *strozzamento* – ci ricorda che giusto in caso di strozzamento "è come se la pianta si uccide da se stessa o soffre, per meglio dire, una specie di *apoplezia*".

Nelle stesse pp. 98-99 scrive anche: "evvi l'altro male, al quale sono soggetti bene spesso gli alberi, che nel centro legnoso se ne converte parte in certa materia, o sostanza spongosa, che quindi per eccesso di calore, perdendo ogni forza eccitante, si circoscrive il proprio nu-

trimento, e perde affatto la sostanza, o consistenza, e qualità lignea, acquistando quella di un'estrema mollezza, e siccità insieme, che dicesi *Esca d'occhio*, suscettibile per la sua siccità di prendere fuoco a' soli raggi solari ... ne succedono vani tali nel pedone, o ne' rami di essi alberi, che a ogni forza non ordinaria de' venti vanno ivi a sgamollare". Della stessa classe e natura, continua Carboni, "è press'a poco l'altra *Esca* che si genera dagli stati legnosi, o siano vasi trasversali del tronco, sebbene di assai minore suscettibilità, tutto che derivi dalle stesse cause, o principi, e sia formata dello stesso legno in lunghe strisce lungo il pedone".

Carboni non accenna alla vite, ma è chiaro che il termine *esca* era utilizzato per indicare la massa di legno cariato degli alberi.

#### Filippo Re

Filippo Re (1763-1817), professore di Botanica e Agricoltura nella Regia Università di Modena, nel suo *Saggio teorico pratico sulle Malattie delle Piante* (seconda edizione, 1817) utilizza il termine *Morte subitanea* (o *Fuoco*) per indicare l'improvviso disseccamento di un albero (pp. 86 e 87-90). La causa del Fuoco o Morte subitanea era da ricercarsi "nell'estremo ardore della stagione". Il grande caldo era anche all'origine del cosiddetto *Secchereccio degli alberi*, a cui andava soggetta anche la vite (i termini *Morte subitanea* e *secchereccio* possono essere interpretati come sinonimi di apoplezia ed entrambi potevano riguardare la vite). Filippo Re cita anche un rimedio suggerito da Virgilio per difendere le piante di vite "dalla rabbia del cane estivo che fende il terreno" e, quindi, dal *secchereccio*: "si prendano delle pietre e dei grandi mattoni e si pongano al piede delle piante" onde proteggere il terreno e le radici dall'azione diretta dei raggi del sole e conservare così un po' di umidità per la pianta. A parte queste poche indicazioni Filippo Re, che si avventura nel suo *Saggio teorico pratico...* in una sua personale suddivisione (malattie steniche; malattie asteniche; malattie derivate ora dallo stato stenico ora dall'astenico; lesioni e malattie indeterminate) e, spesso, ridenominazione, secondo le sue convinzioni, delle malattie fino ad allora note, non ci fornisce, proprio a causa di ciò, alcuna indicazione sulla malattia dell'esca o, comunque, sulla carie del legno. A quest'ultimo riguardo si può ricordare un altro passaggio di Filippo Re: quando discute delle varie forme di Lebbra (mucosa, lichenosa, fungosa e mista, tutte malattie derivate ora dallo stato stenico ora da quello astenico) riferisce, a proposito della *Lebbra fungosa*, che "sugli alberi molto vecchi vi può crescere il *Boletus igniarius* [sinonimo di *Fomes igniarius*], cioè il fungo da far esca, l'agarico e altri di consistenza legnosa" (p. 140).

In nessun'altra occasione Filippo Re, che è patologo vegetale, accenna all'esca o alla carie del legno. Lo fa invece, come abbiamo visto Davide Carbone che è agrimensore e che pur ha letto, perché ne riferisce (p. 90), la prima edizione del *Saggio teorico pratico...* di Filippo Re (precedente al 1810).

#### Henri Marès

Un primo, chiaro riferimento alla morte improvvisa di piante di vite la si trova invece in un libro di epoca più recente, il *Livre de la Ferme*, di Henri Marès (1865, p. 263): "Noi designiamo, con il nome di apoplezia, una malattia terribile e molto antica, che colpisce le viti in mezzo all'estate facendole morire in qualche giorno. Per i contadini dell'Hérault [Dipartimento francese il cui capoluogo è Montpellier] questa morte è dovuta al soffiare di venti

impetuosi che, in una giornata calma e calda, nascono improvvisamente lasciando presagire un cambiamento del tempo. Le piante sono prese da questo turbinio di vento e seccano improvvisamente e rapidamente. La malattia compare qua e là, su singoli ceppi, senza essere contagiosa o epidemica, altrimenti sarebbe stata l'ostacolo più serio, scrive Marès, alla coltivazione della vigna. L'apoplezia si osserva soprattutto nei terreni ricchi e profondi... E dopo un'annata piovosa si hanno più colpi apoplezzici che negli anni asciutti".

Marès scrive anche che la malattia si presenta improvvisamente *senza sintomi premonitori* e che, internamente, quando si taglia un vecchio ceppo, si osserva un colore rosso venato di bruno. Quella di Marès è verosimilmente la prima descrizione di una qualche accuratezza della carie del legno di vite e dell'apoplezia. Manca, tuttavia, la descrizione dei sintomi fogliari.

### I.3.5 La ricerca sull'esca negli anni venti del XX secolo

Gli anni dal 1922 al 1926 sono stati gli anni in cui i ricercatori francesi hanno pubblicato i contributi più significativi alla conoscenza dell'esca e della maniera di curarla.

Il termine *esca* per indicare la malattia comincia verosimilmente a circolare negli ambienti scientifici francesi nei primi anni venti. Infatti, nel corso di una discussione su un articolo presentato da M. Gard nel 1922 (*L'apoplexie de la Vigne et les formes résupinées du Fomes igniarius*) e pubblicato sul *Bollettino della Società di Patologia vegetale di Francia*, viene detto che la malattia è molto comune in alcune parti d'Italia (circondario di Barletta e di Brindisi, provincia di Lecce), dove è nota con il nome di esca (questa informazione, comunque, è stata data per la prima volta da Viala - vedi oltre). Viene anche affermato che questo nome sarebbe da preferire a quello di apoplezia per indicare la malattia. Di questa opinione erano anche altri autori francesi: Moreau, Vinet e, soprattutto, come accennato prima, Viala.

Nell'articolo di Gard è riportato che il termine *apoplezia* è da riferirsi all'improvviso avvizzimento delle piante di vite, avvizzimento che non può essere attribuito a aridità del terreno perché si verifica, secondo l'autore, con uguale frequenza sia in terreni asciutti sia durante la stagione piovosa. L'analisi da parte di Gard delle viti ammalate rivela la trasformazione del



Fig. 4 - Carpoforo di *Fomitiporia mediterranea* su vite

legno in una massa soffice, spugnosa, contenente un abbondante micelio caratteristico delle Polyporaceae (a questo risultato era giunto Ravaz già nei primi anni del Novecento).

Gard scrive, inoltre, che i viticoltori di Smirne hanno chiamato il legno spugnoso “iska” (notizia già nota a Ravaz, quanto meno dalla lettera di Pavlou) e che Viala ha ottenuto colture pure del fungo poi identificato da Mangin e Patouillard come *Fomes igniarius* (sinonimo del *Polyporus igniarius* di Ravaz). Gard ritrova fruttificazioni resupinate del fungo (fig. 4) su viti ammalate (nei distretti della Gironda, Charente e Lot-et-Garonne) e le compare con altre forme resupinate del fungo su quercia, acacia, e diversi tipi di fruttiferi. A causa delle diversità riscontrate crea una nuova varietà, *viticidus*. Fra l'altro, Gard osserva che il micelio del fungo si estende dalla zona infetta al legno sano adiacente e che può trovarsi in branche di due anni di età e perfino nei tralci dell'anno. L'infezione ha origine dalle larghe ferite quali quelle della potatura.

Secondo Gard, i sintomi dell'apoplezia sarebbero provocati dalla ostruzione dei vasi da parte delle ife e anche da tille e gomme del legno.

Nella discussione sull'articolo a cui si è prima accennato Patouillard si dice convinto che il fungo di Gard non rappresenti una nuova varietà di *Fomes*. Viala, d'altro canto, afferma che il fungo è molto sensibile all'azione dell'acido arsenioso, utilizzato già da diversi anni contro la malattia (quindi prima del 1922). Inoltre, *F. igniarius* è un vigoroso demolitore del tannino per mezzo di un'ossidasi secreta dal micelio in accrescimento nel legno e il fungo avanza solo dopo che l'enzima ha aggredito il tannino accumulato nei tessuti vivi del legno. Nel *Manuale di Patologia vegetale* a cura di Goidanch, del 1964, ancora si fa riferimento a questa ossidasi del fungo. La crescita attiva del fungo si ha quindi solo nei tessuti ricchi in tannino, e l'attacco di solito interessa piante dopo i 15 anni di età. Prima di questa età i trattamenti con acido arsenioso non sono, quindi, normalmente richiesti. Secondo Ravaz l'esca poteva interessare anche piante molto più giovani, in particolare o esclusivamente in quei casi in cui si ripiantava la vite in siti che avevano ospitato piante morte per apoplezia da esca.

Nel n. 1514 (1923) della “*Revue de Viticulture*” l'ing. P. Marsais illustra, sulla base delle lezioni tenute dal prof. P. Viala all'Institut National Agronomique di Parigi, la *malattia dell'esca della vite*, accompagnando la descrizione con una tavola a colori (Marsais è un ingegnere agronomo che in più occasioni ha raccolto in articoli divulgativi quanto ascoltato alle lezioni di Viala a Versailles). Nell'articolo sono riportate informazioni:

- sulle condizioni ottimali di crescita artificiale del fungo (substrati contenenti tannino come ad esempio acido pirogallico);
- sulle modalità di colonizzazione del legno da parte di *F. igniarius*: il fungo si insedia dapprima nel midollo e da qui, in 3-4 anni, giunge a colonizzare l'intero cilindro centrale. Passeranno poi altri 8-9 anni prima che la pianta muoia;
- sulla comparsa di sintomi esterni della malattia: quando il fungo ha ormai invaso le zone esterne del cilindro centrale si osserva caduta improvvisa delle foglie, morte delle branche ecc.;
- sull'età suscettibile delle piante: le piante più sensibili sono quelle di 25-30 anni perché più ricche in tannino; mentre le piante di meno di 10 anni sono immuni o quasi perché normalmente molto povere di tannino. All'epoca le analisi sul contenuto in tannini sono state svolte in Italia da tale dott. Garino Canina di Asti;
- sui sintomi a carico delle foglie, che però poco somigliano a quelle dell'esca (accar-tocchia-

mento, macchiettatura, tessitura diafana, ravvicinamento delle nervature, una tinta grigio scura delle foglie sulle viti più vecchie, essiccamento. Invece, somiglianza emerge, forse per la prima volta, nella descrizione di “attacchi lievi”: macchie gialle o rosse sulla lamina, arrossamento dei margini fogliari e delle aree internervali).

Al di là della correttezza delle informazioni contenute nell'articolo di Marsais (in particolare, la descrizione dei sintomi fogliari sembra quella di almeno tre malattie diverse: accartocciamento, eutipiosi e esca), dal 1923-1924 si comincia a usare nel mondo scientifico il termine esca insieme o in sostituzione a quello di apoplezia. Ma la materia rimane ancora estremamente confusa.

Un altro interessante articolo è pubblicato nel 1923 da Moreau e Vinet sui Comptes Rendus dell'Accademia di Agricoltura di Francia: *Contribution à l'étude de l'apoplexie de la Vigne et de son traitement*. Gli autori seguono per tre anni consecutivi gli sviluppi dell'apoplezia in un vigneto di 1,5 ettari con 6.750 viti a Belle-Beille (Angers, Maine-et-Loire) e accertano che la malattia, ritenuta peculiare del sud della Francia, era ben presente anche nell'Ovest. Nel 1920 il numero di viti morte a Belle-Beille furono il 35%, nel 1921 il 10 e nel 1922 il 65%. L'esame accurato delle viti morte permise di accertare che il 90% nel 1920 e l'80% nel 1921 di esse era attaccato dal “fungo dell'esca”, *F. igniarius*.

Lo sviluppo della malattia appare molto graduale, con la fase finale (apoplezia) che insorge inaspettatamente allorquando essa (la malattia) raggiunge uno sviluppo tale per cui i tessuti (ostruzione dei vasi già supposta da Gard) non sono più in grado di convogliare verso le foglie sufficiente acqua per compensare le perdite per traspirazione (anche in questo caso la malattia, cioè l'esca, viene identificata con la carie). Talvolta, comunque, un progressivo avvizzimento delle foglie e dei viticci può indicare la prossima morte di una branca. In taluni casi branche parzialmente defogliate formano nuovi germogli in luglio o agosto, in considerazione del fatto che la minore traspirazione dovuta alla caduta delle foglie appare sufficiente a preservare la vitalità delle gemme e la loro successiva schiusura.

Interessante appare la descrizione dell'andamento nel tempo della malattia: “anno dopo anno la malattia è segnalata da una graduale clorosi, una incompleta maturazione del legno dei tralci e l'avvizzimento di singole branche. L'esame dei tessuti interni quasi sempre rivela la presenza di legno cariato caratteristico della malattia dell'esca. La morte della pianta spesso si verifica verso la fine della stagione vegetativa, con la maggior parte degli eventi mortali collocati fra il 15 settembre e il 26 ottobre (in Italia e in Francia sono stati però accertati casi di apoplezia anche nel mese di giugno).

Anche Moreau e Vinet, pur fornendo una descrizione della progressione della malattia, non accennano ai tipici sintomi fogliari dell'esca.

### I.3.6 La monografia di Pierre Viala sull'esca

L'articolo più completo sull'esca è del 1926 ed è firmato da Pierre Viala (1859-1936), professore di Viticoltura presso l'Institut National Agronomique di Versailles (Parigi) e *grand nom* della scienza francese. Nell'articolo Viala riassume 20 anni di studi sull'esca. Intanto, riguardo al nome *esca* che viene dato alla malattia, Viala scrive che più o meno dal 1904-1905 al 1914-

915, M. Ch. Lemarchand, appaltatore di lavori pubblici a Parigi e proprietario dell'azienda La Badessa a Squinzano, in provincia di Lecce, gli ha recapitato, dopo sue istruzioni, numerosi ceppi apoplettici di vite e gli ha riferito informazioni raccolte fra i viticoltori della zona. Tali viticoltori chiamavano la malattia *Escha* (scritta con l'*h* secondo la pronuncia francese di *esca*) e ciò convince Viala a scrivere nel suo articolo che le piante di vite che muoiono per apoplezia lo fanno sotto l'azione dell'*Escha italiana*. In Toscana invece, i contadini, "se li viene domandato che cosa è accaduto a quella vite che così carica d'uva si è seccata, vi rispondono che è *razzata* (colpo violento)" (*Trattato di Agricoltura*, scritto fra il 1710 e il 1729 da Domenico Falchini, fattore nella fattoria di Lappoggi di proprietà medicea). È Viala, dunque, a esprimere la necessità di riprendere l'antico nome di *Esca* (o *Iska*) utilizzato dai viticoltori greci e italiani (o del Salento) per indicare quella forma di apoplezia dovuta a cause parassitarie, quelle stesse individuate qualche anno prima da Ravaz. Diversi autori francesi faranno proprie le idee di Viala o aggiungeranno le loro a quelle del collega più famoso e, anche prima del 1926, cominceranno, nei loro articoli, a parlare di *esca* come sinonimo di apoplezia.

Viala ha molto viaggiato ai suoi tempi e le sue visite in molti Paesi (e le informazioni ricevute) gli permettono di dire che "l'*esca* è endemica nei vigneti di tutto il mondo" (non sa dire solo del Sud America, dell'Australia e del Capo di Buona Speranza). Egli trova l'*esca* in tutti i vigneti dell'Europa e dell'Asia occidentale rilevando situazioni molto gravi a Smirne, in Siria e nella Palestina. La malattia è presente in Spagna (Catalogna e Andalusia), in Grecia, soprattutto in Macedonia (a Naoussa l'*esca* non ha risparmiato alcun ceppo) e nelle isole di Creta, Samos e Corfù e, naturalmente, in Italia (particolarmente grave nel Salento: dal 1904 al 1913 il 32% delle viti è andato distrutto nel vigneti della fattoria La Badessa). Da altri scritti si sa che l'*esca* era presente anche in Svizzera, in Tunisia e in Algeria.

Viala fornisce qualche dato sull'incidenza della malattia (qui da intendersi come casi di apoplezia) in vari altri vigneti: a Cavallès (Gard, sulle rive del Rodano) 8% in vigneti di 25-30 anni (dal 2 al 5% in altre parcelle degli stessi vigneti); a Grémian (vicino a Cournonterral, Hérault), 6% all'anno; a Cournonterral, in alcuni anni, 5%; nella Charente (dati di M.B. Lafon) 13% in vigneti di 20 anni, 15-20% in vigneti di 15 anni e 10-25% in vigneti da 20 a 30 anni; da 3 a 6,5% in vigneti nei pressi di Angers.

Il quadro presentato sembra anche più grave di quello che constatiamo ai giorni nostri. Una parte, per noi interessante, della monografia di Viala è dedicata ai sintomi sulle foglie.

"L'effetto dell'*esca* sulle foglie è indiretta: ... l'azione del micelio (agente della carie), che non raggiunge i tralci dell'anno né le foglie, si traduce nei casi più numerosi, quelli apoplettici, nella morte brusca di tutte le foglie che, fino al momento dell'apoplezia, appaiono del tutto normali, verdi e turgide. In qualche ora, al massimo uno o due giorni, i vasi attivi del legno cessano di trasportare acqua verso l'alto e le foglie, nel periodo di più intensa traspirazione (agosto) e/o al momento dell'invaiaitura, quando le radici aspirano dalle foglie il massimo delle sostanze ivi elaborate, cessano di ricevere acqua e seccano improvvisamente. Il parenchima fogliare impallidisce, acquista poi un colore verde sporco, poi verde grigiastro. Poi pendono sui rami e appaiono come se fossero state immerse nell'acqua bollente. Nel caso di *esca* meno brusca e progressiva da un anno all'altro, alla tinta verde spento succede, fra le nervature, una tinta da foglia morta. Queste altre manifestazioni della malattia non sono da Viala attribuite allo *Stereum* (per Viala è *Stereum necator* e non *Phellinus igniarius* l'agente dell'apoplezia)

poiché non sopravviene poi la morte brusca della pianta. E pur tuttavia in queste piante la carie è sempre presente nel tronco e nelle branche. Viala si chiede allora se questi non siano casi particolari di sintomi dell'*esca* di cui potrebbe essere responsabile lo stato individuale della pianta e avanza al riguardo alcune ipotesi esplicative: in pratica, in queste piante la carie interesserebbe solo una porzione limitata del legno e, quindi, la linfa potrebbe ancora avere una discreta circolazione nel legno e il passaggio nelle foglie della ossidasi del fungo sarebbe ridotto (più diluita). Ciò procurerebbe alle foglie sintomi più lievi.

In situazioni particolari (terreni silicei, argilloso-silicei, sabbiosi) si vedono anche altri sintomi sulle foglie: una tinta giallo-limone intensa, brillante, che interessa tutta la foglia (più raramente solo una parte del parenchima internervale) e tutte le foglie della pianta. Le foglie sono anche un po' lacinate e le piante muoiono 3-4 anni dopo la comparsa dei primi sintomi. Anche questi sintomi sarebbero dovuti all'*esca* (perché il legno internamente appare, almeno in qualche punto, cariato) ma Viala aggiunge, che la causa potrebbe anche essere diversa.

Quindi Viala passa alla descrizione delle note foglie tigrate (fig. 5), che costituiscono un altro caso speciale dell'*esca*. "Foglie e rami hanno un colore un po' più pallido, ma restano verdi. Poi, nel mese di luglio, il bordo della lamina fogliare si decolora leggermente e tale decolorazione si spinge verso l'interno mantenendosi fra le nervature; piccole aree di colore giallo biancastro, vagamente circolari, sfumate ai bordi, appaiono disseminate sulla pagina fogliare. Tali aree acquistano poi, passando attraverso diversi stadi, la tinta delle foglie morte. La pianta sopravvive uno o due anni e finisce per soccombere senza però subire il colpo apoplettico... Le aree decolorate, che presentano una elevata variazione di colori: dal bianco giallastro al bruno e fino al rosso vivo, formano una sorta di mosaico sulla pagina fogliare".

Infine, un'ultima alterazione indiretta delle foglie provocata dall'*esca*, alterazione che Viala ha riprodotto artificialmente, nel 1911 e 1912, quando ha cercato di dimostrare la patogenicità di *S. purpureum*. Al proposito Viala scrive che nel 1889 aveva descritto un'alterazione delle foglie di vite con il nome di *résorption* (i cloroplasti sono meno numerosi, le nervature ravvicinate, la foglia nel suo complesso appare diafana, quasi trasparente) e nel 1893 un altro sintomo patologico con il nome di *jauberdat* (prezzemolatura). Quest'ultimo è riferito da Viala al *roncet*, un termine, questo, piuttosto vago che si ricollega a dei sintomi piuttosto che a malattie defini-



Fig. 5 - Foglie "tigrate" di mal dell'*esca* raffigurate nell'articolo di Viala del 1926

te nelle quali rientrano il mal nero italiano, la *marromba* portoghese, il *court-noué* francese. Per Viala, *résorption* e *jauberdats* sono semplici sintomi comuni a diverse malattie (come la febbre per le malattie dell'uomo), incluso l'esca.

Come si vede, il massimo e più continuo studioso dell'esca e delle altre malattie della vite (nel 1887 si reca ad Anaheim, per studiare, per conto degli americani, il mal della California e ciò sottolinea la sua autorevolezza nel settore della viticoltura) considera come casi speciali di esca (ma non esclude, a onor del vero, altre cause), alcune malattie che solo anni più tardi saranno diagnosticate correttamente: giallumi (forse le foglie di colore giallo-limone), degenerazione infettiva o eutipiosi (le foglie con nervature ravvicinate, prezzemolate), deperimento progressivo (le viti che nei terreni silicei soffrono già dal primo anno e deperiscono progressivamente). Rimarranno fuori da una corretta interpretazione le sole foglie tigrate o mosaicate che da questo momento saranno considerate parte integrante dell'esca (la cosiddetta *forma cronica*, all'epoca considerata tutt'al più una forma lieve dell'apoplezia) in assenza, tuttavia, allora come dopo il 1926, di un qualsiasi riscontro di campo o sperimentale.

### I.3.7 Il black measles e altre malattie in California

La confusione esistente nella corretta definizione di un nutrito gruppo di malattie sulla vite è ben evidenziata in un articolo pubblicato da F.T. Bioletti (1865-1939), di origine italiana, nel 1923 sul *Bollettino della California (Berkeley) Agricultural Experiment Station*. Nell'articolo viene scritto che ci sono in California, sulla vite, diverse oscure malattie alle quali vengono assegnate nomi diversi: Black measles, Spanish measles, Black mildew, Blight, Anaheim disease, California disease, Santa Clara disease e Top disease. Tutte queste malattie sembrano in qualche modo correlate fra loro, quanto a sintomi e, di conseguenza, a cause; alla malattia descritta in Europa come "*brunissure*" (imbrunimento, malattia che Viala e Sauvageau assegnano, un po' avventurosamente, a una *Plasmodiophora vitis*) e ad altre due malattie osservate in California, Water berries e Grape shrivel. I sintomi principali di queste malattie sono macchie di diverso aspetto, aree necrotiche sulle foglie; macchie sugli acini, loro ammorbidimento e disidratazione con riduzioni nel contenuto di zuccheri, acidità, colore e profumo; avvizzimento dell'apice dei germogli; mancata o imperfetta maturazione dei tralci e ridotto contenuto in amido; macchie scure e striature nel legno; crescita ridotta e morte di tralci, branche e perfino dell'intera pianta. Su una stessa pianta possono apparire varie combinazioni di questi sintomi, ma mai tutti insieme.

Bioletti, nel tentativo di fare chiarezza, distingue i vari casi osservati in tre tipi:

- I. California (o Anaheim) vine disease e Santa Clara disease;
- II. Black measles, Spanish measles, Black mildew (variazioni locali dello stesso gruppo o gruppi di sintomi): questo tipo si distingue dal precedente solo per la distribuzione delle piante ammalate nel vigneto (gruppi di piante in certe parti del vigneto; singole piante irregolarmente distribuite; singole parti della stessa pianta) e per la minore gravità. La malattia è sporadica ma comune nei distretti viticoli caratterizzati da bassa piovosità, che sia praticata o meno l'irrigazione;
- III. Water berries e Grape-shrivel: in questo caso la diversità dai tipi precedenti consiste nel fatto che I sintomi sono interamente, o quasi, localizzati sugli acini.

Secondo Bioletti i tre tipi di malattie sono tre stadi o classi di gravità della stessa malattia. Invece, oggi sappiamo che il tipo I corrisponde alla malattia di Pierce i cui sintomi fogliari somigliano, in qualche modo, a quelli dell'esca. È stato poi Bonnet, nel 1926 - *A promising remedy for black measles of the vine* - a sostenere, giustamente, che il black measles è da ritenersi identico alla malattia conosciuta in Europa come apoplezia, variamente attribuita a *Fomes igniarius*, *Stereum hirsutum* o *Stereum necator* e che la malattia si poteva curare con applicazioni a base di arsenico visto anche, lui scrive, i buoni risultati ottenuti in Francia e in Algeria.

Quanto alle cause delle malattie elencate, Bioletti, pur non escludendo l'intervento di un qualche microrganismo, le individua in abbondanza di vegetazione e scarsità di acqua nel suolo. Così, in occasione di tre gravi epidemie, verso la fine dell'Ottocento, Bioletti individua in tutte le occasioni condizioni simili: 1. una serie di anni con piogge abbondanti; 2. un anno siccitoso immediatamente dopo la serie piovosa; 3. abbondanza di vegetazione nell'anno immediatamente precedente l'anno siccitoso; 4. rapida morte delle piante nell'anno immediatamente successivo a quello siccitoso. Nel caso dell'esca sembra che un'estate asciutta e calda sia favorevole all'apoplezia.

### I.3.8 Il mal dell'esca in Spagna

A. Garcia Lopez è l'autore di un articolo comparso nel 1924 sul *Boletino Agric. Tecn. y Econ.* e intitolato *La apopleja de la Vid o enfermedad del 'esca'*. L'articolo, in cui viene confermata la sinomia tra esca e apoplezia, riprende sostanzialmente notizie provenienti da autori francesi e fornisce un quadro della malattia in Spagna.

### I.3.9 Gli studi di Newton B. Pierce in California e in Europa sulle malattie della vite

Nel 1882 nelle contrade di Los Angeles, San Bernardino e Orange compare una nuova, terribile, malattia, il *mal di California*, di cui si occupano anche Viala e Sauvageau. Questi due ricercatori assegnano la malattia a un fungo mixomicete, *Plasmodiophora californica*, di cui poi si perdono le tracce nella letteratura scientifica. Data la gravità del problema il Ministero dell'Agricoltura negli Stati Uniti d'America invia N.B. Pierce prima in California e poi anche in Europa, dove vi si trattiene 5 mesi. Pierce scrive un primo rapporto nel 1889 e un secondo nel 1892: *The California Vine Diseases*.

Quest'ultimo rapporto comprende 11 capitoli:

- nel primo Pierce esamina, fra l'altro, gli aspetti economici, davvero gravi, della nuova malattia;
- il secondo capitolo comprende la storia della viticoltura nella California meridionale, onde accertare se nei siti adiacenti a quelli da cui si importò la vite esistesse una malattia simile al mal di California;
- nel terzo capitolo vengono descritti i caratteri dei vari organi delle piante ammalate (un sintomo che ci interessa è quello di macchie giallastre o rosse sparse nel parenchima e/o lungo i margini);



- nel quarto viene seguito lo sviluppo della malattia a partire da Anaheim, primo focolaio;
- i capitoli quinto, sesto e settimo comprendono lo studio del suolo, della “fognatura”, dell’irrigazione, dell’ombreggiamento e degli agenti atmosferici in rapporto alla malattia;
- l’ottavo capitolo riguarda le pratiche viticole (sistemi di potatura, di innesto, la moltiplicazione per barbatella, per semi ecc.) seguite in California;
- nel nono capitolo vengono esaminate le relazioni fra la nuova malattia e quelle già conosciute della vite: i marciumi delle radici da *Dematophora* (poi *Rosellinia necatrix* (studiata dallo stesso Pierce nei dintorni di Napoli), *Agaricus melleus* (poi *Armillaria mellea*) e da una specie di *Graphium*. Tra i funghi che attaccano la parte aerea vengono ricordati la *Peronospora* (poi *Plasmopara viticola* (nel 1887 ritenuta dai viticoltori la causa del mal di California); l’oidio (*Uncinula spiralis* poi *Uncinula necator*) apparso nel 1859 in California; l’antracnosi (*Sphaeloma ampelinum*) e il black rot (*Guignardia bidwelli*), due malattie ancora sconosciute in California; *Cladosporium viticolum* e *Septosporium heterosporium*.

Segue la descrizione dei parassiti animali e quella di alcune malattie ritenute non parassitarie: la *clorosi* per condizioni fisiologiche sfavorevoli; un *marciume* delle radici dovuto a un complesso di condizioni sfavorevoli di terreno, di umidità, di clima; il *Mal nero* che, sulla base degli studi di Baccarini e di Cugini, si assegnerà poi a un batterio allora ritenuto speciale. Pierce accenna poi a esami istologici del legno di viti morte per vecchiaia, per marciume e per *folletage*, a una malattia detta *mal rosso* dai contadini, osservata ad Anagni e il cui aspetto ricordava abbastanza il mal di California. Tuttavia, Pierce ritiene il mal rosso identico al *secchereccio* descritto da Macchiati (Comes, diversamente da altri – Cugini, Macchiati, Mori, Cubani – lo considerò invece una forma di mal nero). Pierce fa poi un parallelo tra mal di California, *rougeout* e *folletage* ritenendo distinte, al pari di Foex, Rabot, Gayon e Cuboni, le tre malattie. Infine, in Italia si ritiene che Viala e Sauvageau abbiano messo in chiaro la malattia con l’identificazione della loro *Plasmiodiophora californica*. Il mal di California, che prenderà poi il nome di malattia di Pierce, sarà invece chiarito solo negli anni settanta con l’identificazione di *Xylella fastidiosa*.

I due ultimi capitoli sono dedicati ad alcuni tentativi di lotta che non diedero alcun risultato e a uno sguardo sintetico, incluso alcune ricerche batteriologiche sulla malattia, delle notizie riportate nei precedenti capitoli.

Il lavoro di Pierce sottolinea l’impegno profuso nel tentativo di diagnosticare una malattia tuttora molto grave e ci offre un panorama delle malattie della vite note alla fine dell’Ottocento, ma non dà alcuna indicazione circa il mal dell’esca.

### I.3.10 Il mal dell’esca in Italia nel Novecento

Nel nostro Paese non sono stati svolti studi specifici sull’esca, almeno nel periodo in cui invece intensa era la ricerca in Francia. Al “Primo Congresso per le Malattie della Vite”, tenutosi a Milano dal 18 al 23 settembre del 1881, si è discusso di fillossera, peronospora, oidio, mal nero, antracnosi ma non di apoplezia. In un opuscolo sulle *Malattie crittogamiche della vite e modo di combatterle*, pubblicato nel 1895 da Ugo Brizi, allora giovane assistente alla

Regia Stazione di Patologia vegetale di Roma, sono citate le seguenti malattie: peronospora, oidio o crittogama, antracnosi o vajolo, mal bianco o marciume delle radici, mal nero, carie bianca, black-rot, melanosi o bitter rot (o anche malattia dell’amaro), *Botrytis cinerea*, varie altre crittogame, in parte poi scomparse dalla letteratura scientifica, (fumaggine da *Capnodium salicinum*; *Cercospora viticola*; un *Fusarium zavianum*; *Briosia ampelophaga*; *Tubercularia fuliginea*; *Alternaria vitis*; *Phyllosticta vitis*; *Phoma vitis*, *Diplodia viticola*; *Pestalozzia vitis*; *Macrophoma acinorum*; *Cladosporium roeslerii*; *Phoma negrianum*), annerimento delle foglie o brunissure (osservato per la prima volta nel 1893 e assegnato inizialmente a una *Plasmiodiophora vitis*), rogna o tubercolosi (secondo Viala una conseguenza di danni da freddo; secondo Cuboni una batteriosi), malattia di California (malattia terribile, studiata sul posto da Viala e da questi e Sauvageau assegnata a una *Plasmiodiophora californica*), alcune malattie non parassitarie (colpo di sole o bruciatura delle foglie; mal secco o scottatura degli acini; effetti del gelo sui tralci e le gemme; colatura; clorosi). Dell’apoplezia non si fa alcun cenno. Invece, molti anni più tardi (1941) lo stesso Brizi, nel volume *Malattie delle piante agrarie*, quando tratta delle malattie della vite accenna all’apoplezia da *Stereum necator* (indicato da Viala come agente causale della malattia) il quale “penetra nella pianta attraverso i tagli e le ferite di potatura, specialmente alla spalla, arriva fino al midollo, determina una alterazione profonda nel legno che perde la consistenza diventando bruno molle e filaccioso, donde il nome *mal dell’esca* (le piante avevano l’esca, cioè il legno cariato, che era causa del male = malattia). In tal modo la circolazione acquosa è disturbata, rallentata e, a un certo momento, non nelle viti giovani, ma in quelle che hanno superato almeno i 15 anni, soppressa bruscamente”. Brizi non accenna ad alcun sintomo fogliare del mal dell’esca. Una trattazione più completa della malattia viene invece fatta da Raffaele Ciferri nel 1955 (*Manuale di Patologia vegetale*). Questo autore intanto riconosce che si è molto discusso sulle cause dell’esca o apoplezia o *mal dello spacco* (altro nome della malattia perché i sarmenti o il tronco spesso si fendono longitudinalmente) e ipotizza che, oltre a una eziologia fungina, la malattia potrebbe avere anche un’origine fisiologica. Inoltre, rileva che la variabilità dei sintomi è grande e anche la loro sequenza temporale è spesso molto diversa sulle piante ammalate. Alcuni altri passaggi di Ciferri evidenziano certezze, perplessità e incertezze:

1. seguendo i più moderni trattatisti, e l’Arnaud in particolare, ammettiamo l’identità dell’esca con l’apoplezia parassitaria e probabilmente con il *mal della California* (ma ciò si rivelerà inesatto);
2. l’apoplezia, che si verifica di solito (si dovrebbe dire con maggior frequenza) su piante vecchie di venti anni o più, può essere provocata da cause fisiologiche;
3. il cosiddetto *mal della California* è un sintomo fogliare dell’esca (inesatto), ma può forse avere altre origini tra cui dei fatti di carenza (un dubbio sempre presente, ma che ci sembra di poter escludere);
4. sembra che possa manifestarsi, sulle piante ammalate, anche una specie di falso arricciamento (tutt’al più accartocciamento) e in altri casi una clorosi fogliare diffusa (poco probabile; doveva trattarsi di qualche altra affezione);
5. i tralci e i grappoli disseccano senza mostrare sintomi caratteristici di qualsiasi genere (vero nel corso dell’apoplezia, inesatto in altri casi);
6. se si asporta la scorza si osserva bene una decolorazione bruna, sotto forma di una stri-

- scia larga 1-2 cm che parte da un tralcio vizzo e va verso il basso, sino alle grosse radici (riscontrata anche di recente);
7. nella forma lenta l'alterazione sembra procedere dal basso verso l'alto; nell'apoplezia procede in senso inverso;
  8. la prima malattia (cioè l'esca) è a evoluzione lenta, e si rivela per due o più anni (non è proprio così) negli stessi piedi; la seconda è rapida come se la pianta fosse stata sradicata (in questo caso Ciferri sembra considerare l'esistenza di due malattie: esca e apoplezia);
  9. tanto la carie del tronco che il relativo mal dello spacco sono talvolta preceduti da un diffuso rossore fogliare, imputabile però anche ad altre cause (rossori sono stati osservati ma è difficile dire se rientrano oppure no nella variabilità dei sintomi sulle foglie);
  10. in Italia è probabilissimo che dei casi di mal dell'esca (si noti che Ciferri chiama la malattia ora esca ora mal dell'esca) siano stati interpretati come casi di *mal nero* (strano, perché la sintomatologia delle due malattie è molto diversa);
  11. la malattia sembra particolarmente frequente nelle Puglie (dove si praticava l'irrigazione dei vigneti);
  12. le infezioni partono generalmente da ferite della vite o dal punto d'innesto;
  13. generalmente la malattia si manifesta a chiazze e su piedi isolati;
  14. la malattia si rivela di preferenza sulla vite europea, rispetto ai vitigni americani;
  15. la penetrazione dei parassiti è facilitata dalla presenza di ferite: da qui forse il fatto che piante soggette a frequenti e forti potature, come la vite ma anche il salice e il gelso, sono molte soggette all'esca (sembra, qui, che l'esca sia considerata una sorta di malattia generica, consistente esclusivamente nella carie del legno);
  16. generico (vero) è l'accertamento che il periodo più caldo dell'anno è quello in cui si manifesta più spesso l'apoplezia
  17. i funghi dell'esca sono certo vari: *Stereum hirsutum* (= *S. necator*), *S. rugosum*, *S. spadiceum* ecc., nonché *Fomes igniarius* o *Polyporus igniarius* o, più esattamente, *Phellinus igniarius*;
  18. le fruttificazioni non sono frequenti da osservare sui ceppi di vite;
  19. *Phellinus* forma sulla vite come dei cuscinetti bruni;
  20. *Phellinus* si utilizza, in una certa fase del suo sviluppo, come esca; da ciò il nome volgare della malattia:
  21. *P. igniarius* è stato segnalato su molte piante forestali e anche su olivo, melo ecc.

Nel *Manuale di Patologia vegetale*, il più completo nella nostra storia della Patologia vegetale, pubblicato nel 1964 a cura di G. Goidanich l'esca è descritta molto brevemente e solo nella sua forma apoplettica e vengono, in sostanza, riportate informazioni che risalgono agli studi di Viala. Solo nel *Manuale di Patologia vegetale* di più recente pubblicazione (a cura di Matta, Luisoni e Surico, 1996) c'è una trattazione più moderna e articolata dell'esca.

Per lungo tempo ci si è dunque limitati in Italia a riferire, in pratica, le informazioni che arrivavano dal Paese d'oltralpe o a qualche segnalazione nella rassegna fitopatologica annuali. Ad esempio la notizia dell'articolo di Marsais del 1923 viene riportata nel n. 7-12 (dicembre 1923) del *Bollettino* mensile di informazioni e notizie della Regia Stazione di Patologia vegetale e Regio Osservatorio fitopatologico per la provincia di Roma e gli Abruzzi (Roma, via Santa Susanna, 13), redatto a cura del vicedirettore prof. G.B. Traverso.

L. Montermartini nella rassegna crittogamica per gli anni 1921, 1922 e 1923 (Atti dell'Istituto di Botanica dell'Università di Pavia) riferisce che nei mesi di luglio e agosto del 1923, viti di 8-10 anni a Casteggio (Pavia) “manifestano sintomi di deperimento, accompagnati da discolorazione delle foglie. Nel midollo e nei vasi dei tralci più vecchi viene notata la presenza di abbondante micelio; inoltre, il legno rivela la presenza di aree necrotiche sotto forma di minute macchie nere talvolta distribuite in un fascia circolare nel legno primaverile di una delle cerchie annuali ed estensione nei raggi midollari”. L'alterazione viene inizialmente attribuita al mal nero; successivamente, valutati i sintomi complessivi delle piante ammalate, si ritiene che il micelio osservato possa appartenere a *F. igniarius* o *S. hirsutum* associati all'apoplezia (a mio avviso, potrebbe invece trattarsi di un caso di deperimento assimilabile alla Malattia di Petri).

Il *Bollettino* del 1927 della Regia Stazione di Patologia vegetale, allora diretta da Lionello Petri, segnala nei vigneti del territorio di Taranto, in Puglia, numerosi casi di apoplezia dovuti al *mal dell'esca* [*in corsivo nel testo*], alterazione parassitaria (*Polyporus igniarius*) del legno. Lo sviluppo del fungo sembra sia stato favorito dalla reazione acida del terreno. Viene anche segnalato che a cura della Regia Delegazione antifillosserica locale sono state intraprese esperienze di trattamento con sali di arsenico secondo il metodo escogitato da Viala.

Un unico lavoro, non di ricerca ma di indagine, è quello di Luigi Manzoni e Dino B. Rui, presentato nel 1933 sulla *Rivista di Patologia Vegetale*, allora diretta da Luigi Montermartini. I due autori riferiscono dei casi di apoplezia rilevati in vigneti vecchi e giovani nelle province di Padova (Cittadella) e di Vicenza (Breganze) e dai dati che presentano si può avere un'idea della situazione in quegli anni. In particolare viene citato un vigneto in località Casaretta (Cittadella) di circa 600 viti selvatiche (Rip. x Rip. 3309) piantate nel 1929 e innestate sul posto su Clinton nel 1931. La malattia si sviluppa già nel 1932 e, a causa dell'elevata percentuale di viti morte o morenti, il vigneto viene spiantato nel 1933. Stessa sorte tocca ad altri due vigneti in località Laghi e Gazo: uno di 1000 viti Barbera innestate sul posto nel 1930 su *Vitis rupestris* du Lot e l'altro innestato nel 1928 e colpito già nel 1929 (probabilmente, se pur vi erano coinvolti i funghi dell'esca, i fenomeni osservati sarebbero forse da attribuire a casi di deperimento da *Phaeoacremonium aleophilum* e *Phaeoconiella chlamydospora*). Casi classici di apoplezia vengono invece osservati in vecchi vigneti a Breganze. Qui le viti hanno ceppi di 20 cm e più di diametro e il legno vecchio marcito. Manzoni e Rui ci ricordano anche: “che nella località era antica usanza fendere longitudinalmente i vecchi ceppi aventi il legno interno guasto, proprio come si pratica in Grecia e nell'Asia minore”. Ma ciò che preoccupa i due autori sono soprattutto i casi, a loro dire meno noti e descritti, di apoplezia nei giovani vigneti “dove la malattia non dovrebbe essere, e di solito non è, comune”. Quando i due autori esaminano le viti morte rilevano che “l'infezione parte dal punto d'innesto o forse ancor più frequentemente dalle grosse ferite fatte per togliere i polloni o anche i grossi tralci sviluppatisi sotto l'innesto dal ceppo americano”. Un ultimo punto che merita essere ricordato, perché molto ben interpretato, così come i precedenti punti, è la convinzione in Manzoni e Rui che “il propagarsi nella regione in modo eccezionale della malattia, anche su viti giovani, possa essere dovuto alla presenza, in vicinanza dei nuovi impianti, delle viti vecchie e tutte ammalate, anche se ancora in produzione, alle quali si è prima accennato”.

Oltre a queste segnalazioni, qui riportate a titolo di esempio, ce ne sono state alcune altre dello stesso tenore ma, come detto prima, sulle riviste scientifiche non sono mai comparsi lavori sperimentali di autori italiani sul mal dell'esca.

### 1.3.11 Conclusioni

Sappiamo che microrganismi diversi possono causare lo stesso sintomo e che lo stesso microrganismo può causare, perfino, talvolta, sulla stessa pianta, sintomi diversi. Questo è particolarmente vero nel caso della vite e lo dimostra il fatto che solo tecniche accurate e conoscenze avanzate ci permettono, ma non sempre, perfino oggi, diagnosi precise delle malattie più complesse (talune virosi, giallumi, varie forme di deperimenti, la stessa esca e altre malattie del legno). Appare quindi del tutto normale che negli anni storici degli studi sull'esca, che sono poi anche gli anni della costruzione delle basi scientifiche della Patologia vegetale, allorquando tutte le malattie avevano bisogno di essere diagnosticate, ci sia stata un po' di confusione nella corretta assegnazione di taluni sintomi sulle foglie a questa o quella malattia della vite (così come di altre malattie su altre piante). È così accaduto che la stessa malattia ha ricevuto nomi diversi o che malattie diverse tra loro abbiano ricevuto lo stesso nome. La confusione è dipesa probabilmente anche dal fatto che la stessa pianta poteva risultare infettata da più microrganismi (e ciò è vero anche oggi). I casi più ovvi di confusione e probabilmente più ricorrenti, a ben leggere alcuni degli articoli degli anni venti, hanno verosimilmente riguardato l'accartocciamento, l'eutipiosi e la stessa esca, spesso confuse una con l'altra. E ciò ha complicato la diagnosi di ciascuna delle tre malattie.

Si è detto e si sa che il termine esca è stato utilizzato per molti secoli per indicare, fra l'altro, il legno cariato di molti alberi, incluso, verosimilmente, quello della vite, quando lo si usava per accendere il fuoco. Sappiamo anche che le piante di vite potevano seccare improvvisamente soprattutto nel corso dei mesi più caldi del periodo vegetativo. E sappiamo, infine, che qualcuno, in un qualche momento, ha pensato che i due fenomeni, carie del legno e morte subitanea, potessero essere collegati fra loro. In questi termini si esprime anche Marsais in un articolo del 1923 in cui riporta una lezione di Viala all'Institut National Agronomique di Versailles: "quando si esaminano esteriormente le viti, nessun sintomo ci permette, durante i primi anni, di sopporre la malattia; solo se si apre longitudinalmente il tronco si trovano, anni dopo, masse di legno cariato che caratterizzano la malattia. È così successo che viti voluminose morte improvvisamente e destinate a legna da ardere sono state aperte facendo scorgere il legno cariato". La relazione causa-effetto è stata così scoperta per via assolutamente deduttiva, se non occasionale, anche se Ravaz, illuminato da Pavlou, ha seguito una sua propria via.

È stato comunque Ravaz in una pubblicazione del 1898 a sospettare, probabilmente per primo (o secondo, dopo de Rolland), il coinvolgimento di un fungo nella carie del legno (carie che Ravaz, all'epoca, non ancora collegava all'apoplessia). Negli anni successivi Ravaz approfondì le sue osservazioni e giunse infine a proporre fra il 1906 e il 1909, sulla base delle risultanze da lui ottenute, di riservare il termine apoplessia a quella forma di "folletage", fra le diverse possibili, di cui poteva ritenersi responsabile un fungo: *Polyporus igniarius* (*ignis*) è una vecchia parola indoeuropea utilizzata in latino, prima di *focus*, per indicare il fuoco)

e di mantenere il termine *folletage* per le morti dovute a cause fisiologiche (prima di Ravaz, de Rolland, nel 1873, aveva invece individuato la presenza di *Stereum hirsutum* sui ceppi di viti apoplettiche).

In molti hanno fatto poi menzione, nel corso dei secoli, della presenza sulle foglie di macchie gialle o rosse o viola, di necrosi, di accartocciamento del lembo fogliare e così via, ma nessuno sembra abbia mai dato, fino ai tempi di Viala, una chiara descrizione delle foglie che oggi chiamiamo "tigrate", o che abbia associato questo tipo di sintomo alla carie del legno. Piuttosto, potremmo cogliere, qua e là, un riferimento ai sintomi fogliari dell'esca allorquando, incidentalmente, questo o quell'autore ha parlato di arrossamento delle foglie, sintomo che, però, sappiamo essere comune a molte malattie della vite.

In effetti, persino autori che nell'Ottocento o nei primi anni del Novecento hanno tentato di descrivere tutte le malattie allora note sulle piante (Filippo Re, 1817) o sulla sola vite nella regione mediterranea (Viala, 1893; Brizi, 1895) o in California (Pierce, 1892) non hanno mai descritto i sintomi fogliari dell'esca, da soli o in associazione all'apoplessia. Si comincia a parlare di sintomi fogliari dell'esca e di forma lieve della malattia, che, successivamente, diventerà forma cronica, in un articolo di Marsais del 1923 (in realtà Marsais, che non è un fitopatologo, anticipa nel suo articolo una lezione di Viala) e poi in uno di Viala del 1926. Viala pubblica anche nel suo articolo un disegno delle classiche foglie tigrate (fig. 5).

Da Viala in poi l'esca, intesa nella sua forma cronica o lieve (esemplificata dai tipici sintomi cloro-necrotici sulle foglie) e in quella acuta (apoplessia), è stata considerata un'unica malattia pur in assenza di anche un solo tentativo riuscito di riproduzione artificiale sia dei sintomi fogliari sia dell'apoplessia dopo inoculazione di *Fomes igniarius* (o *S. hirsutum/necator*). Ciò che si è riuscito a dimostrare è stata soltanto la capacità del fungo di trasformare il legno della vite in esca per accendere il fuoco (carie). Ne è seguita la supposizione, solo supposizione, che lo stesso fungo, potesse causare anche i sintomi fogliari. Oggi, circa 80 anni dopo la pubblicazione dell'articolo di Viala del 1926, viene messo in discussione il fatto che un unico fungo (prima *Fomes igniarius*, oggi *Fomitiporia mediterranea*) possa essere responsabile di tutti i sintomi che vengono associati all'esca.

Per quanto riguarda poi il nome *esca/iska* possiamo dire per certo che *esca/iska* è stato chiamato, in tempi remoti, il legno cariato usato per accendere o mantenere vivo il fuoco e *esca/iska* è stato chiamato dai viticoltori il fenomeno di morte



Fig. 6 - In questa rappresentazione dell'Uva Bizzarria dei primi anni dell'Ottocento appare un'ipotetica foglia "tigrata"

improvvisa (apoplessia) delle piante quando si sono accorti, come ne aveva scritto Viala, che queste piante avevano il legno cariato.

Due domande a questo punto è lecito porsi. Come mai nella descrizione dell'esca non vi è traccia, per lungo tempo, di alcuna chiara descrizione dei sintomi fogliari, da soli o associati all'apoplessia? E come mai non vi è traccia, almeno pare, di una descrizione di tali sintomi neanche in riferimento a qualche altra malattia della vite? Neanche Pierce venuto in Francia e in Italia alla ricerca dell'esistenza di una malattia della vite simile a quella che poi prenderà il suo nome (e i sintomi della malattia di Pierce ricordano quelli dell'esca - *fig. 1, cap. III.1*) fa menzione nei suoi rapporti dei sintomi fogliari dell'esca.

Le risposte più ovvie ai due interrogativi sono almeno quattro: 1. tali sintomi erano così poco frequenti da passare inosservati (poco probabile); 2. erano tali da non suscitare l'interesse di alcuno (anche questo molto poco probabile); 3. essi sono una manifestazione recente dell'esca (ancora poco probabile); 4. essi sono la manifestazione, relativamente recente, di una malattia diversa dall'esca. Riguardo al punto 3, si può riferire di un indizio interessante: Giorgio Gallesio (1772-1839) inserì nella sua celebre opera *Pomona italiana, ossia trattato degli alberi fruttiferi* un disegno dell'Uva Bizzarria (forma chimerica con acini di diverso colore), fatto dal sig. Digerini di Pietrasanta in Toscana. Digerini copia un grappolo con tralcio fornito dal sig. Antonio Giorgeri della città di Massa. Una delle due foglie che compaiono nel disegno somiglia a una foglia "tigrata" (*fig. 6*).

Il riferimento, anche se un po' debole, potrebbe escludere la terza ipotesi. Così, se fosse valida la quarta ipotesi, si dovrebbe ammettere che la nuova malattia sia comparsa in Europa verso la fine dell'Ottocento-inizio Novecento, forse con le viti americane portate nel vecchio continente per combattere la fillossera. Un'ipotesi, quest'ultima, un po' stravagante ma che merita, tutto sommato, una qualche considerazione. Al riguardo un'ultima annotazione: nel 1890 (18 ottobre), B.T. Galloway, capo della Division of Vegetable Physiology and Pathology, and Woods dell'USDA-United States Department of Agriculture, ricevette diverse

segnalazioni di una nuova malattia della vite in varie parti dello Stato di New York (ma in particolare intorno a Lockport, Niagara County), invia sul posto un suo assistente, D.G. Fairchild. Dopo 7 giorni Fairchild consegna a Galloway il suo rapporto (*Journal of Mycology*, 1891, Vol. 6, nr. 3: 95-96) in cui è contenuta una descrizione della malattia. Fra l'altro: macchie piccole, irregolari di colore scuro appaiono fra le nervature delle foglie. Queste macchie si allargano rapidamente, acquistano un colore da più scuro a viola opaco a rosso bruno e confluiscono una nell'altra fino a occupare tutto lo spazio fra le nervature, le quali rimangono verdi o gialle. Il contrasto fra le nervature verdi o giallastre e il colore violaceo-brunastro degli spazi internervali conferisce alle foglie "a peculiar streaked appearance", un caratteristico aspetto striato. È la descrizione delle cosiddette foglie tigrate dell'esca, 35 anni prima della descrizione fatta da Viala, di cui si propone qui (*fig. 7*) una visione vicina a quella fatta da Fairchild.

### Bibliografia (dal 1873 al 1985, in ordine cronologico)

- ROLLAND G. (DE) (1873) - *Considérations physiologiques sur l'apoplexie de la vigne*. Bull. Soc. Agric. France, 5: 539-545.
- GALLOWAY B.T., FAIRCHILD D.G. (1891) - *Diseases of the grape in the western New York*. The Journal of Mycology, 6: 95-99.
- PIERCE NEWTON B. (1892) - *The California vine diseases*. Washington 1892, pp. 215.
- RAVAZ L (1898) - *Sur le folletage*. Rev. de Vitic., 10: 184-186.
- RAVAZ L. (1901) - *Le folletage*. Progrès Agr. et Vitic., 35: 633.
- PAVLOU C.H. (1906) - *Lettre a Ravaz*. Progrès Agr. et Vitic., 46: 690.
- RAVAZ L. (1907) - *Observation sur quelques maladies de la vigne*. Bull. Office rens. Agric., Paris 420, 837 et 1908.
- RAVAZ L. (1909) - *Sur l'apoplexie de la vigne*. Progrès Agr. et Vitic., 52: 574.
- VINET E. (1909) - *L'apoplexie de la vigne en Anjou*. Rev. de Vitic., 32: 676-681.
- VINET E. (1910) - *Sur l'apoplexie de la vigne en Anjou*. Bull. Soc. Ind. Agr. Angers, 7.
- PETRI L. (1912) - *Osservazioni sopra le alterazioni del legno della vite in seguito a ferite*. Le Stazioni Sperimentali Agrarie Italiane, 45: 501-547.
- RAVAZ L. (1919) - *Encore l'apoplexie de la vigne*. Prog. Agr. et Vitic., 78: 601-603.
- FAYARD (1920) - *L'apoplexie, coup d'éclair*. Rev. de Vitic., 53: 14-16.
- KIEN E. (1920) - *Note sur un case pathologique observé sur la vigne en Tunisie*. Rev. de Vitic., 52: 289-290.
- LAFON R. (1921) - *Modification à apporter à la taille de la vigne dans les Charentes, Taille Guyot-Poussard mixte et double, l'apoplexie, traitement preventif et curatif*.
- MONTEMARTINI L. (1921) - *Rassegna crittogamica oper l'anno 1921*. Atti Ist. Bot. Univ. di Pavia, Ser. 3, I, pp. IX-LXIII.
- RAVAZ L. (1921) - *Greffage des vignes apoplexies*. Prog. Agr. et Vitic., 76: 347.
- RAVAZ L. (1921) - *Sur le folletage ou apoplexie*. Prog. Agr. et Vitic., 76: 463 e 515.
- RIVES L. (1921) - *Sur le parasitisme du Stereum hirsutum et son rôle dans l'apoplexie de la vigne*. Prog. Agr. et Vitic., 4: 600-601.



Fig. 7 - Foglia di vite con aree internervali violacee-brunastre

- SCHIMITZ H. (1921) – *Studies in wood decay-II enzyme action in Polyporus volvatus and Fomes ignarius Gill.* Journ. of gen. Physiol., III: 795-800.
- BARTHELEMY L. (1922) – *Taille de la vigne et Apoplexie.* Prog. Agr. et Vitic., 78: 180-181.
- GARD M. (1922) – *L'apoplexie de la vigne et les formes résupinées du Fomes ignarius (L. ex Fr.).* Revue de viticulture, 56: 201-204.
- LAFON R. (1922) – *L'apoplexie et la Taille de la vigne.* Rès. Rev. de Vitic., 56: 37.
- VIALA P. (1922) – *L'apoplexie.* Boll. Soc. Pat. Végét. de France IX P.V. des Seances de janvier-mars.
- BIOLETTI F.T. (1923) – *Black measles, water berries, and related vine troubles.* Calif. Agr. Exp. Stat. Bull., 358: 509-524.
- GARD M. (1923) – *L'apoplexie de la vigne et le moyens de la combattre et d'y remédier.* Rev. de Vitic., 1509: 399-401.
- MARSAIS P. (1923) – *Maladie de l'esca.* Rev. de Vitic., 59: 8-14.
- MOREAU L., VINET E. (1923) – *Contribution a l'étude de l'apoplexie de la vigne et de son traitement.* Compts Rendus Acad. d'Agriculture de France, 1: 32-36.
- MOREAU L., VINET E. (1923) – *Contribution a l'étude de la maladie de l'esca (apoplexie de la vigne).* Compts Rendus Acad. d'Agriculture de France, 38: 951-953.
- MOREAU L., VINET E. (1923) – *L'apoplexie de la vigne.* Centre Exp. Viticole de l'Office Agricole Régional de l'Ouest.
- GARCIA LOPEZ A. (1924) – *La apoplejia de la Vid o enfermedad del Esca.* Bol. Agr. Tecn. y Econ., 187: 634-651 et 188: 721-739.
- GARD M. (1924) – *L'apoplexie de la vigne.* La Vie agric. et rurale, 22: 343-344.
- KIEN E. (1924) – *Actualités: a propos du traitement de l'apoplexie.* Rev. de Vitic., 61: 239.
- FAES H., TONDUZ P. (1925) – *Station fédérale d'essais viticoles à Lausanne et Domaine de Pully. Rapport annual 1924.* Annuaire agric. de la Suisse 1925, pp. 657-678.
- BACHALA A. (1926) – *Le folletage et l'apoplexie de la Vigne.* Prog. Agr. et Vitic., 85: 225.
- BONNET L.O. (1926) – *A promising remedy for black measles of de vine.* Calif. Agr. Exp. Stat. Circ., 303: 1-10.
- GARD M. (1926) – *Le traitement de l'apoplexie de la vigne.* Rev. de Vitic., 64: 84-85.
- RIVES L. (1926) – *Contribution a l'étude de l'esca.* Progr. Agr. et Vitic., 85: 323-328, 347-353 e 395-401.
- ROUSSEAU I. (1926) – *Sur l'apoplexie de la vigne.* Progr. Agr. et Vitic., 85: 117-118.
- VIALA P. (1926) – *Recherches sur les maladies de la vigne.* Ann. des Epiphyties, fasc.1-2: 1-108.
- LUTZ L. (1930) – *Sur les ferments solubles secretes par les Champignons Hyménomycètes. La degradation de matière ligneuse.* Cr. Ac. Sci., 190: 1455.
- ARNAUD G., ARNAUD M. (1931) – *Esca.* In: LE CHEVALIER (ed.), *Traité de pathologie végétale*, Vol. I: 428-444.
- ZWEIGELT F. (1933) – *Roncet - Court-noué - gommose bacillaire - mal nero - esca.* Das Weinland, 5 (12): 409-411.
- MANZONI L., RUI D.B. (1934) – *Rassegna dei principali casi fitopatologici osservati a Conegliano nel 1933.* Rivista di Patologia vegetale, 24: 182-189.
- MOREAU E. (1935) – *Traitement à l'arsénite de soude.* Prog. Agr. et Vitic., 103: 469.
- BIRON M. (1937) – *Pulvérisations arsenicales contre le rabougrissement.* Rev. de Vitic., 87: 458-461.
- MOREAU L., VINET E. (1938) – *Traitement de l'esca.* Rev. de Vitic., 89: 332.
- BRANAS J. (1944) – *L'Apoplexie.* Prog. Agr. et Vitic., 122: 75-77.
- BELLOD, MARTIN (1947) – *La Yesca de la vid ed la region de Levante su influence en la longevidad de las cepas y experiencias para su tratamiento.* Bol. de Path. Vég. y Entom. Agricole, 15: 223-252.
- LARUE P. (1947) – *Une apoplexie en Australie.* Prog. Agr. et Vitic., 127: 326-327.
- BOUCHOT, JACOBBE (1948) – *Action sur la germination de l'arsenicauux.* Comptes rendus Acad. d'Agr.: 895.
- NELSON K.E., HEWITT W.M.B., BREAK R.A. (1949) – *Arsenite spray injury to grape canes through leaf scars.* Phytopathology, 39: 71-76.
- VIENNOT-BOURGIN G. (1949) – *Phellinus ignarus (L.) Pat. – Fux Amdouvier, apoplexie, esca.* In: *Les Champignons parasites des plantes cultivées*, Masson et Cie éditeurs, Paris, pp. 1237-1241.
- DEMETRIADES S. (1950) – *Défense sanitaire et protection des vignobles.* VI Congrès O.I.V. Athènes 1950; Bull. O.I.V., 1952, n. 244: 13.
- MARSAIS P. (1950) – *La défense sanitaire et la protection des vignobles.* VI Congrès O.I.V. Athènes 1950; Bull. O.I.V., 1952, n. 244: 13.
- HEWITT W.M.B. (1952) – *Some reponse of grape vines to sodium arsenite spray applied for black measles.* Phytopathology, 42: 158-161.
- LAGAUDE V. (1953) – *L'esca et la marbrure des feuilles de vigne.* Phytoma, Sept. II.
- VIDAL J.L. (1953) – *Apoplexie.* La viticulture nouvelle, 58: 9.
- BERVILLE P. (1954) – *Apoplexie.* Phytoma, F. 25; Vigneron Champenois, 1954: 218.
- CIFERRI R. (1955) – *Il mal dell'esca e l'apoplessia della vite.* In IDEM, *Manuale di Patologia vegetale*, Tomo II, pp. 982-988, Società Editrice Dante Alighieri, Firenze.
- BENLLOCH M. (1956) – *L'esca.* Rapport national espagnol au VIII Congrès O.I.V., Santiago du Chili, pp. 680-681; Bull. O.I.V., 1959, p. 342.
- BRANQUINHO DE OLIVEIRA A. (1956) – *L'Esca.* Rapport Général, VIII Congrès O.I.V., Santiago du Chili, 338-342; Bull. O.I.V., 1956, 309.
- GAURDINEAU M. (1956) – *L'esca.* Rapport national Francais au VIII Congrès O.I.V. Santiago du Chili; Bull. O.I.V., 1959, n. 342: 31.
- SIBILLA C. (1956) – *L'esca.* VIII Congrès O.I.V., Santiago du Chili; Bull. O.I.V., 1959, n. 342: 58-60.
- VASCO DE GARCIA CABOL (1956) – *L'esca au Portugal.* VIII Congrès O.I.V., Santiago du Chili; Bull. O.I.V., 1959, n. 343: 13-14.
- HEWITT W.M.B. (1957) – *Some manifestations of black measles of grapevines.* Phytopathology, 57, 16 (abstract).
- GEOFFRION R. (1958) – *L'apoplexie dans la vallée de la Loire.* Phytoma, Aout: 26-28.
- NOBLES M.K. (1958) – *Cultural characters as a guide to the taxonomy and phylogeny of the Polyporaceae.* Canadian Journal of Botany, 36: 883-1139.
- BRANAS J. (1959) – *La vie des tiges.* Progres Agr. et Vitic., 152: 225.
- CHIARAPPA L. (1959a) – *Wood decay of the grapevine and its relationship with black measles disease.* Phytopathology, 49: 510-519.
- CHIARAPPA L. (1959b) – *Extracellular oxidative enzymes of wood-inhabiting fungi associated with the heart rot of living grapevines.* Phytopathology, 49: 578-582.
- GALET P. (1959) – *L'esca.* Le journal de la France agricole 737: 6.
- GAURDINEAU M. (1959) – *L'esca.* IX Congrès O.I.V., Alger, 1959; Bull. O.I.V., 1961, n. 366: 28-29.
- BRANAS J. (1960) – *Sur l'Apoplexie de la vigne.* Prog. Agr. et Vitic., 154: 287-294.
- GRANITI A. (1960) – *Il mal dell'esca della vite in Puglia.* Italia Agr., 5: 543-550.
- VIENNOT-BOURGIN G. (1960) – *L'esca ou la Pourriture sèche.* Le Vigneron Champenois, 207-211; Bull. O.I.V., 1960: 353-143.
- BRANAS J. (1961) – *Sur l'Apoplexie et ses dangers.* Prog. Agr. et Vitic., 155: 46.
- BALDACCIS E., BELLIS G., FOGLIARI G. (1962) – *Osservazioni sulla sintomatologia della carie del legno di vite (mal dell'esca) da Phellinus (Fomes) ignarius (L. ex Fr.) Patouillard.* Riv. Patol. veg., Serie III, 2: 165-184.
- GALET P. (1962) – *L'apoplexie (Diagnostic d'automne).* Le Foyer Rural, 2 novembre.

- RUI D., BATTEL C. (1962) – *Messa a punto di un nuovo mezzo di lotta contro il “mal dell’esca” della vite*. Notiz. Mal. Piante (Pavia), 62-63: 9-15.
- GALET P. (1963) – *L’apoplexie de la vigne*. Le Foyer Rural, 824.
- LAFON J. ET AL. (1963) – *L’apoplexie*. Le vrai Cognac, n. 174; Bull. O.I.V., 1963: 385-388.
- LAFON J., COUILLAUD P., GAY-BELLILE F., HUDE P. (1967) – *L’esca*. Le paysan et vignes et raisins, juillet 1967.
- GALET P. (1969) – *Comment reconnaître l’Esca*. Agri, sept.: 242.
- KRIEDEMANN P.E. (1969) – *Sugar uptake by the grape berry: a note on the absorption pathway*. Planta, 85: 111-117.
- GRASSO S. (1969) – *Il «mal dell’esca» della vite (Phellinus igniarius Patouillard) in Sicilia*. Tecnica Agric. (Catania), 21: 204-212.
- GEOFFRION R. (1971) – *L’esca dans le vignoble de l’Ouest*. Phytoma, février: 21.
- MARAIS P.G. (1974) – *“Tandpyn” a wasting disease of grape vines*. Farming in South Africa, n. F2.
- GALET P. (1977) – *Les maladies et le parasites de la vigne*. *Apoplexie*, Tome I: 409-430, Le Paysan du Midi, Montpellier.
- ANONYMOUS (1985) – *Sunstroke of the vine*. Bull. University of California, Berkeley, CA-USA, pp. 450-451.

## I.4 Verso una nuova definizione del concetto di *Esca*

G. Surico\*, L. Mugnai, G. Marchi

I primi studi sul mal dell’esca sono stati svolti tutti in Francia e la malattia inizialmente studiata era chiamata, come si legge nel *cap. I.3, apoplessia* o *folletage*: le piante improvvisamente seccavano, senza aver mai manifestato segni premonitori e, generalmente, non rivegetavano la stagione successiva. Solo dal 1926 in poi si è cominciato, ufficialmente, a parlare anche di sintomi fogliari del mal dell’esca.

Il primo a venire a conoscenza, nel 1905-1906, del fatto che nella zona di Smirne (Turchia), al tempo abitata ancora da greci, c’era una malattia con la stessa sintomatologia del *folletage*, chiamata *iska* dai vignaioli del posto, è stato verosimilmente Ravaz, in Francia. Successivamente o quasi contemporaneamente, Viala, grazie alle informazioni raccolte da un suo amico parigino, monsieur Lemarchand, proprietario di una azienda agricola nei pressi di Squinzano, provincia di Lecce, viene informato che in quei luoghi si dava il nome *esca* alle viti colpite dal *folletage*. Viala propone quindi di chiamare il *folletage* (o apoplessia) con il termine italiano *esca* (1926). Nello stesso articolo, Viala elenca, come propri del mal dell’esca, diversi tipi di sintomi fogliari, incluso quelli “tigrati” (☞ *fig. 5, cap. I.3*); molti di questi sintomi saranno poi dimenticati (ad esempio, quelli della cosiddetta *résorption* – nervature ravvicinate, foglia diafana, quasi trasparente) o si riveleranno come sintomi di malattie diverse dall’esca: ad esempio, eutipiosi, accartocciamento fogliare, arricciamento ecc. Dunque, via via che taluni tipi di sintomi assegnati da Viala all’esca venivano riconosciuti come propri di altre malattie si giunse al punto che a caratterizzare l’esca rimasero soltanto le foglie tigrate, considerate, allora, una forma lieve della malattia, ma poi divenuti sintomi cronici per distinguerli da quelli acuti, l’apoplessia.

Si è arrivati quindi alla definizione del quadro sintomatico dell’esca (essenzialmente: carie del legno, apoplessia e cloro-necrosi delle foglie) per sottrazione successiva e non in virtù di una specifica sperimentazione.

Dopo la seconda ondata di studi sull’esca, questa più vicina a noi nel tempo (dalla fine degli anni ottanta al 2000 circa) è stato meglio definito sia il quadro dei sintomi interni della malattia sia la sua eziologia, e ci si è convinti che l’esca fosse in realtà una malattia diversa da come era stata interpretata dai primi ricercatori che se ne erano occupati. In effetti, in occasione del I Convegno internazionale dedicato al mal dell’esca della vite (Siena, 1999) sono state avanzate, a coronamento di una decina d’anni di studi sulla malattia, alcune ipotesi su ciò che l’esca poteva o doveva considerarsi (Graniti *et al.*, 2000) e cioè:

\* Università di Firenze email: giuseppe.surico@unifi.it

- a) una malattia complessa, nel senso che diversi fattori interagenti e diversi microrganismi potevano concorrere a determinare la sindrome complessiva del mal dell'esca;
- b) un complesso di 5 diverse sindromi:
1. "striature brune del legno", osservabili soprattutto nel portainnesto di barbatelle;
  2. "malattia di Petri" (ex Black goo, Slow dieback, *Phaeoacremonium* grapevine decline ecc.), a carico di giovani piante (2-7 anni);
  3. "esca giovane" (una tracheomicosi o malattia vascolare);
  4. "carie bianca",
  5. "esca propria" (associazione nella stessa pianta di esca giovane e carie bianca).

La comunità scientifica ha accettato questa sorta di frazionamento dell'esca in 5 sindromi che, tutte insieme, sono andate a costituire il cosiddetto *complesso esca* (in realtà un complesso di malattie per la maggior parte complesse di per sé).

Le prime tre malattie del "complesso esca" hanno la stessa causa biologica (infezioni di *P. chlamydospora* e/o di *Phaeoacremonium aleophilum* – di seguito abbreviate *Pch* e *Pal* – o, più occasionalmente, altra specie di *Phaeoacremonium*) e si distinguono fra di loro per l'età del soggetto interessato (barbatelle o giovani piante), per qualche sintomo nel legno e per i sintomi a carico delle foglie, almeno per quanto riguarda, per quest'ultimo aspetto, la malattia di Petri e l'esca giovane: nel caso della malattia di Petri, clorosi diffusa delle foglie; nel secondo caso, foglie tigrate. Siamo dunque di fronte a tre malattie, ciascuna delle quali è di per sé una malattia complessa (nel senso che è causata da più microrganismi che agiscono individualmente, oppure contemporaneamente o in successione), e la complessità è rafforzata dalla probabile influenza anche dell'ambiente e dello stato fisiologico della pianta.

La quarta malattia (carie bianca) ha un suo agente causale, *Fomitiporia mediterranea* (*Fmed*), un suo sintomo interno (carie del legno) e nessun sintomo esterno individuato.

La quinta malattia (esca propria), è semplicemente la sovrapposizione di due malattie (esca giovane e carie bianca) e, quindi, per la pianta, la somma di due gruppi di sintomi.

A parte le incertezze che ancora sussistono riguardo all'effettivo coinvolgimento di questo o quel fungo, da soli, insieme e/o con il contributo di fattori fisiologici della pianta o ambientali, non del tutto appropriato appare l'uso, in particolare, di esca giovane e di esca propria e quello di complesso esca, almeno quando include anche la carie. Al tempo, quando sono stati proposti questi termini si è voluto soprattutto distinguere il caso (esca giovane) di piante di vite infettate solamente dai funghi tracheomicotici *Pch* e *Pal* che mostravano foglie tigrate dal caso (esca propria) di piante di vite infettate, oltre che da *Pch* e da *Pal*, anche da *Fmed*.

La distinzione tra *esca giovane* ed *esca propria* ha voluto dunque essenzialmente rappresentare ciò che poteva essere osservato nei vigneti, in particolare del bacino mediterraneo, ma, in pratica, con essa è stato assegnato lo stesso nome, o quasi, a due malattie diverse per eziologia e per sintomatologia: da un lato una tracheomicosi (esca giovane) e dall'altra una carie del legno (carie bianca). Inoltre, ignorando la tradizione, è stata chiamata carie bianca ciò che per secoli è stato chiamato esca. Viceversa, è stato dato il nome esca a una malattia, la tracheomicosi, prima mai considerata. Infine, occorre precisare che è stato deciso di adottare il termine esca giovane essenzialmente per tre motivi (Graniti *et al.*, 2000):

1. le infezioni di *Pch* e *Pal* normalmente (ma non sempre) precedono quelle di *Fmed* (la malattia delle venature brune delle barbatelle ne è un esempio);

2. l'ipotesi di Larignon e Dubos che *Pch* e *Pal* potessero agire da funghi pionieri rispetto all'azione di *Fmed* non era stata ancora abbandonata; e, soprattutto,
3. Lionello Petri, il primo a diagnosticare la presenza di *Pch* e *Pal* in viti giovani, ritenne che questi due funghi predisponessero le viti alla carie bianca. Con altre parole, il termine esca giovane voleva significare che questa forma dell'esca poteva lentamente evolversi nella forma completa di esca, quella in cui coesistono entrambe le malattie (l'esca giovane e la carie bianca) e, quindi, tutte e tre le specie fungine: *Pch*, *Pal* e *Fmed* (dunque, una sorta di esca giovane contrapposta a un'esca vecchia o matura).

Di tutte queste ragioni forse solo la prima (precocità dell'infezione di *Pch* e *Pal* rispetto a *Fmed*) mantiene oggi un fondo di verità. Le altre due sono state abbandonate: è stato dimostrato che ciascuno dei tre funghi può agire da patogeno primario (capace, cioè, di iniziare da solo una malattia); l'esca giovane non si evolve in esca propria bensì a una malattia se ne sovrappone un'altra.

Dopo quanto detto appare evidente l'incongruità della terminologia oggi in uso per indicare le diverse sindromi qui considerate.

Per porre in qualche modo rimedio a questa incongruità si potrebbe proporre di continuare, naturalmente, a mantenere distinta la carie bianca dalle malattie causate da *Pal* e *Pch*; di chiamare la carie bianca con il nome originario di esca; di dare alla malattia caratterizzata dalle note foglie tigrate un proprio nome; di mantenere il termine esca propria (pur considerando che la sovrapposizione di due o più malattie nella stessa pianta, fatto non insolito in patologia vegetale, non dà normalmente seguito alla adozione di un nome specifico) solo allo scopo di rappresentare l'idea della sovrapposizione nella stessa pianta, molto frequente nei vigneti, della carie e dell'esca giovane. Si avrebbero allora le seguenti denominazioni:

- malattia delle venature brune (soprattutto a carico delle barbatelle)
- malattia di Petri
- esca (ex carie bianca)
- malattia delle foglie striate (ex esca giovane)
- esca propria (esca+malattia delle foglie striate).

In questo schema le prime tre malattie costituiscono, per quanto se ne sa oggi, un complesso unico (perché causate dagli stessi agenti fungini) di tre malattie complesse (o polimicrobiche, allorquando *Pch* e *Pal* coesistono nella stessa pianta) o, addirittura, multifattoriali nella loro origine, perché anche l'ambiente o lo stato fisiologico della pianta sembrano avere un'influenza sulla loro comparsa. L'alternativa sarebbe di continuare a mantenere le vecchie denominazioni riservando, però, quanto meno il termine di *complesso esca* (oppure, in alternativa, *Phaeotracheomicosi-Phaeotracheomonellosi*) alle malattie accumulate dalla stessa eziologia: malattia delle venature brune, malattia di Petri ed esca. Si avrebbe dunque:

- malattia delle venature brune
- esca (ex esca giovane)
- esca propria (carie bianca + esca).
- malattia di Petri
- carie bianca

Gli schemi sono attualmente al vaglio della comunità scientifica. Nel frattempo, quando non altrimenti specificato, si farà riferimento alla terminologia precedente, adottata dal 2001 con l'avvertenza che allorquando si parla di *mal dell'esca* ci si riferisce non, come nel passato, alla carie bensì a ciò che è noto oggi come *esca giovane*, oppure all'*esca propria*.

## II. Il mal dell'esca: agenti causali e note epidemiologiche





## II.1 Il mal dell'esca e la carie bianca del legno: agenti causali, sintomatologia e casi studio di esca giovane

L. Mugnai\*, M. Guiggiani, F. Bazzo, G. Marchi, G. Surico

### Premessa

In linea di massima l'epidemiologia (dal greco ἐπι = sul, attorno; δῆμος = popolo λόγος = discussione, studio) si occupa di:

- determinare l'origine di una malattia,
- acquisire informazioni sulla sua ecologia,
- programmare e attivare piani di monitoraggio del suo andamento nel tempo,
- valutarne gli effetti economici.

Elemento essenziale dell'epidemiologia di una malattia, che, in pratica, è lo studio della sua dinamica in una popolazione di piante, è il ciclo di sviluppo della malattia stessa.

Il ciclo di sviluppo di una malattia si può definire come l'insieme dei processi che ne caratterizzano il regolare e normale sviluppo – dall'infezione alla comparsa dei sintomi, allo svernamento del patogeno e alla reinfezione l'anno successivo – ed è il risultato del funzionamento simultaneo del ciclo vitale del patogeno e di quello della pianta ospite. In generale, dunque, lo studio di una malattia comporta l'acquisizione di una quantità di informazioni che riguardano il patogeno (in particolare, modalità di svernamento, produzione dell'inoculo e sua diffusione, patogenesi); la pianta (in particolare, tipo di coltura e pratiche colturali nell'accezione più ampia) e l'interazione fra questi due soggetti e l'ambiente (in particolare, suolo, umidità e temperatura dell'aria).

In questa sezione del volume, saranno discussi da vari autori, dopo alcune informazioni sugli agenti causali delle malattie del complesso esca, la sintomatologia di tali malattie e alcuni casi studio di esca giovane, aspetti relativi alle fonti d'inoculo dei funghi dell'esca e della carie bianca, alla diffusione di tali inoculi, alle vie di infezione nella pianta, alla recettività delle ferite della potatura, alla distribuzione delle piante ammalate nel vigneto, all'incremento della malattia con il tempo, ai fattori ambientali che sembrano influire sullo sviluppo della/e malattia/e.

### II.1.1 Introduzione

Come si è visto nel *cap. I.3*, l'esca per diversi anni è stata sinonimo della carie bianca del legno, come sintomo interno, e dell'apoplezia come sintomo esterno. Durante gli anni di più intensa ricerca sull'esca, in Francia, più o meno dalla fine dell'Ottocento al 1930, si è giunti a definire alcuni aspetti epidemiologici della malattia; è stato individuato in *Phellinus igniarius* l'agente principale della malattia (più occasionalmente *Stereum hirsutum*); è stato trovato nell'arsenito di sodio un mezzo più o meno efficace di lotta. In quello stesso periodo di tempo (1912), Lionello Petri, in Italia, studiava la formazione di striature brune nel legno di giovani viti e giungeva ad affermare che esse erano di origine patologica e che dovevano essere imputate all'azione di tre nuovi funghi due dei quali vennero da Petri assegnati al genere *Cephalosporium* e uno al genere *Acremonium*.

Diversi anni più tardi (1959), negli Stati Uniti, anche Luigi Chiarappa, ricercatore italiano emigrato all'estero, segnala nei tessuti cariati la presenza di una specie di *Cephalosporium* (poi classificata come *Phialophora parasitica*) associata alla malattia. In Francia (Larignon e Dubos, 1987; Larignon, 1991) si suggerisce che l'esca sia causata da una successione di microrganismi, con *P. igniarius* responsabile della carie del legno, preceduto però dall'azione preparatoria di una specie di *Cephalosporium* e di *Eutypa lata*. Nel 1999 Ferreira associa *Phialophora parasitica* a casi di deperimento di giovani viti.

Nel 1996 Mugnai *et al.* danno un contributo definitivo alla descrizione, in caso di esca, dei sintomi interni del legno (si prendono in considerazione, oltre alla carie, le striature brune del legno e aree di legno bruno rossastro colonizzato da funghi) e dei funghi che vi sono associati.

Nello stesso periodo, Crous *et al.* (1996) riesaminano la posizione tassonomica dei diversi funghi isolati da piante di vite e propongono un nuovo genere: *Phaeoacremonium*, che include isolati da vite di *Cephalosporium*, *Acremonium* e *Phialophora parasitica*. Il ceppo di *Cephalosporium* isolato in California da Chiarappa prende il nome di *P. chlamydosporum*; uno di quelli isolati in Toscana da Mugnai diviene la specie tipo di *P. chlamydosporum*. Si deduce dalla descrizione data dallo stesso Petri, che due dei funghi da lui isolati possano identificarsi con *P. chlamydosporum* e *P. aleophilum*. La specie *P. parasitica* isolata da Ferreira viene ricondotta a *P. chlamydosporum*. Studi molecolari accertano una sostanziale diversità genetica fra *P. chlamydosporum* e *P. aleophilum*; vie-

\* Università di Firenze email: laura.mugnai@unifi.it

ne così costituito il nuovo genere *Phaeoconiella* a cui viene assegnato il fungo *P. chlamydosporum* con il nome di *Phaeoconiella chlamydospora* (Crous e Gams, 2000).

Quanto all'agente della carie, questo è stato dapprima riclassificato come *Fomitiporia punctata* (= *Phellinus punctatus*) (Mugnai *et al.*, 1999); in seguito i ceppi isolati da vite sono andati a confluire in una nuova specie, *Fomitiporia mediterranea* (Fischer, 2002).

### II.1.2 Caratteristiche delle specie fungine associate al complesso esca e alla carie bianca

#### Funghi tracheomicotici

All'esca e malattie correlate (venature brune delle barbatelle e malattia di Petri) sono state associate essenzialmente due specie fungine: *Phaeoconiella chlamydospora* (*Pch*) e *Phaeoacremonium aleophilum* (*Pal*). Questi due funghi sono risultati in grado di colonizzare il tessuto conduttore di piante di vite (Mugnai *et al.*, 1997b; Sparapano *et al.*, 2000b, Eskalen *et al.*, 2007) e di causare, verosimilmente (ma al riguardo la documentazione sperimentale è ancora molto scarsa), i noti sintomi fogliari di esca probabilmente attraverso una serie di azioni concomitanti: produzione di fitotossine (Sparapano *et al.*, 1998a, 1998b; Evidente *et al.*, 2000; Tabacchi *et al.*, 2000), produzioni di enzimi pectinolitici (Marchi *et al.*, 2001); occlusione dei vasi (Pascoe e Cottral, 2000; Troccoli *et al.*, 2001).

Il genere *Phaeoacremonium* è un genere fungino recentemente descritto, intermedio fra *Phialophora* e *Acremonium* (Crous *et al.*, 1996), a cui sono state inizialmente assegnate 7 specie: *P. aleophilum*, *P. angustius*, *P. chlamydosporum*, *P. inflatipes*, *P. mortoniae*, *P. rubrigenum* e *P. viticola* e la specie tipo *Phaeoacremonium parasiticum*. Con l'ampliarsi dei rilievi e dei campionamenti sono state individuate altre specie, fra cui *P. alvesii*, *P. amstelodamense*, *P. argentinense*, *P. australiense*, *P. austroafricanum*, *P. griseorubrum*, *P. krajdennii*, *P. novae-zealandiae*, *P. iraniamum*, *P. scolyti*, *P. sphinctrophorum*, *P. subulatum*, *P. tardicrescens*, *P. theobromatis* e *P. venezuelense*. Delle 22 specie di *Phaeoacremonium* attualmente descritte, 3 sono agenti di micosi per l'uomo; 6 infettano l'uomo e le piante; 16 sono state rinvenute in piante di vite. All'elenco di 16 specie di *Phaeoacremonium* associate alla vite se ne sono recentemente aggiunte altre 4: *P. croatiense*, *P. hungaricum*, *P. sicilianum* e *P. tuscanum* (Essakhi *et al.*, 2008; cap. V.2 in questo volume) (tab. 1).

*Phaeoacremonium chlamydosporum*, è stato trasferito, come si è detto, dal genere *Phaeoacremonium* al nuovo genere *Phaeoconiella* con l'epiteto specifico *chlamydospora* (Crous e Gams, 2000). Questo nuovo genere comprende a tutt'oggi solo altre 2 specie, *Phaeoconiella zymoides* e *Phaeoconiella pinifoliorum*, entrambe specie saprofiti su substrati vegetali (Lee *et al.*, 2006).

*Pch* è stata sempre rinvenuta nelle viti affette da esca, in Italia e negli altri paesi dove è presente la malattia; *Pal*, invece, viene isolata con minore frequenza e con minore percentuale di colonizzazione e, inoltre, può essere associata o, più spesso, sostituita da altra specie di *Phaeoacremonium* (in particolare, da *P. angustius*, *P. parasiticum*, *P. rubrigenum*, *P. mortoniae* e *P. viticola*) (Eskalen *et al.*, 2005d; Mostert *et al.*, 2006b; Martin e Cobos, 2007). Inoltre, mentre *P. chlamydospora* è stata isolata, almeno finora, solo da vite, talune specie di *Phaeoacremonium* sembrano causare imbrunimenti del legno anche in altre specie di piante.

Tab. 1 - Specie di *Phaeoacremonium*, ospiti e luoghi di rinvenimento

Specie di <i>Phaeoacremonium</i>	Ospite	Paese
<i>P. aleophilum</i>	<i>Vitis vinifera</i> ; <i>Actinidia chinensis</i> , <i>Olea europaea</i> , <i>Prunus pennsylvanica</i> , <i>Prunus</i> sp., <i>Salix</i> sp.	Argentina, Australia, Austria, Canada, Cile, Iran, Italia, Francia, Sud Africa, Spagna, Turchia, USA, ex Jugoslavia
<i>P. alvesii</i>	<i>Vitis vinifera</i> , <i>Dodoneae viscosa</i> , uomo	Australia, Brasile, Italia, USA
<i>P. amstelodamense</i>	uomo	Olanda
<i>P. angustius</i>	<i>Vitis vinifera</i>	Portogallo, USA
<i>P. argentinense</i>	terreno	Argentina
<i>P. austroafricanum</i>	<i>Vitis vinifera</i>	Sud Africa
<i>P. australiense</i>	<i>Vitis vinifera</i>	Australia
<i>P. croatiense</i>	<i>Vitis vinifera</i>	Croazia
<i>P. griseorubrum</i>	<i>Vitis vinifera</i> , uomo	Giappone, Italia, USA
<i>P. hungaricum</i>	<i>Vitis vinifera</i>	Ungheria
<i>P. inflatipes</i>	<i>Vitis vinifera</i> , <i>Hypoxylon truncatum</i> , <i>Nectandra</i> sp., <i>Quercus virginiana</i>	Cile, Costa Rica, USA
<i>P. iraniamum</i>	<i>Vitis vinifera</i> , <i>Vitis sylvestris</i> , <i>Actinidia chinensis</i>	Iran, Italia
<i>P. krajdennii</i>	<i>Vitis vinifera</i> , uomo	Canada, India, Giappone, Norvegia, Sud Africa, USA, Zaire
<i>P. mortoniae</i>	<i>Vitis vinifera</i> , <i>Fraxinus excelsior</i> , <i>F. latifolia</i> , <i>F. pennsylvanica</i>	Croazia, Svezia, Ungheria, USA
<i>P. parasiticum</i>	<i>Vitis vinifera</i> , <i>Actinidia chinensis</i> , <i>Aquilaria agallocha</i> , <i>Cupressus</i> sp., <i>Nectandra</i> sp., <i>Phoenix dactylifera</i> , <i>Prunus armeniaca</i> , <i>Quercus virginiana</i> , uomo	Argentina, Australia, Brasile, Canada, Cile, Costa Rica, Finlandia, Iran, Iraq, Italia, Sud Africa, Tunisia, USA
<i>P. rubrigenum</i>	<i>Vitis vinifera</i> , uomo	USA, Italia
<i>P. scolyti</i>	<i>Vitis vinifera</i> , larve di <i>Scolytus intricatus</i>	Francia, Italia, Sud Africa
<i>P. novae-zealandiae</i>	<i>Cupressus macrocarpa</i> , <i>Desmoschoenus spiralis</i> , <i>Pinus radiata</i>	Nuova Zelanda
<i>P. sicilianum</i>	<i>Vitis vinifera</i>	Italia
<i>P. sphinctrophorum</i>	uomo	Canada, USA
<i>P. subulatum</i>	<i>Vitis vinifera</i>	Sud Africa
<i>P. tardicrescens</i>	uomo	USA
<i>P. theobromatis</i>	<i>Teobroma gileri</i>	Ecuador
<i>P. tuscanum</i>	<i>Vitis vinifera</i>	Italia
<i>P. viticola</i>	<i>Vitis vinifera</i> , <i>Sorbus intermedia</i>	Canada, Francia, Germania, Iran, Italia, Sud Africa, USA, Venezuela
<i>P. venezuelense</i>	<i>Vitis vinifera</i> , uomo	Canada, Sud Africa, Venezuela

Fonte: Mostert *et al.*, 2006b; Essakhi *et al.*, 2008.

In particolare, *P. alcophilum* è stata isolata anche da actinidia, olivo, salice e specie del genere *Prunus*; *P. inflatipes* da specie di *Nectandra* e *Quercus*; *P. mertoniae* da specie di frassino; *P. angustius* da olivo; *P. parasiticum* da actinidia e specie di cipresso, *Nectandra*, *Phoenix*, *Prunus*, *Quercus*; *P. viticola* da *Sorbus intermedia* (Mostert *et al.*, 2006b).

Di *Pch* non si conosce la forma perfetta. Invece, la forma perfetta di *Pal*, *Togninia minima*, è stata prodotta in coltura e individuata anche in campo (Mostert *et al.*, 2003; Rooney-Latham *et al.*, 2005a, 2005b).

*Pch* e *Pal* colonizzano di preferenza i tessuti xilematici. In prove di inoculazione artificiale hanno provocato l'imbrunimento dei tessuti xilematici e talvolta (Sparapano *et al.*, 2001b) causato la comparsa di sintomi fogliari dell'esca e di forme di deperimento in giovani piante sottoposte a stress idrico. Inoculazioni artificiali con *Pch* e *Pal* hanno talvolta riprodotto anche i sintomi del "black measles" sugli acini di uva (Sparapano *et al.*, 2001b; Thind e Gubler, 2009).

#### Basidiomiceti agenti di carie del legno

Il genere *Fomitiporia* comprende varie specie, di interesse soprattutto forestale, agenti di carie del legno. Con la vite però sembra che la nuova specie, *F. mediterranea* (*Fmed*), abbia un rapporto preferenziale. Nell'ambiente mediterraneo è la più diffusa, anzi l'unica specie, almeno finora, del genere *Fomitiporia* segnalata, oltre che su vite, su numerose altre specie di piante di interesse agrario (ad esempio *Olea europaea*, *Actinidia chinensis*, *Citrus* spp.), di interesse forestale (*Quercus ilex*, *Cornus mas*, *Robinia pseudoacacia*, *Corylus avellana*) e di uso ornamentale (*Lagerstroemia indica*, *Ligustrum vulgare*, *Acer negundo*, *Laurus nobilis* ecc.) (Pilotti *et al.*, 2005; Fischer, 2006; Elena *et al.*, 2006).

Nel resto d'Europa, in particolare nel Nord Europa, la sua presenza sembra invece limitata esclusivamente alla vite. Tuttavia, sia sulla vite sia, ancor più facilmente, sugli altri ospiti, il fungo è in grado di formare le sue fruttificazioni. Nei nostri vigneti non è sempre facilissimo individuare le caratteristiche 'croste' color ruggine o cannella (☞ *fig. 4, cap. I.3*): è più facile trovarne in vigneti vecchi, in particolare su piante morte, lasciate in piedi o 'a marcire' in cataste ai margini del vigneto. E da qui, dai pori che ogni anno si rinnovano sulla superficie di queste caratteristiche fruttificazioni, partono tutte le nuove infezioni. Studi specifici fatti in Italia hanno mostrato come ogni singola pianta infetta di un vigneto sia frutto di una nuova infezione, un caso a sé stante (Cortesi *et al.*, 2000a, 2000b). Le spore, trasportate dal vento, si originano dalle fruttificazioni che si formano sulla vite e, nel nostro Paese, forse anche sulle piante o alberi forestali dei boschi vicini (queste piante, quindi, potrebbero fungere da fonti di inoculo del fungo qualora fosse accertato che gli isolati da queste ultime piante siano patogeni anche su vite). Si tratta di corpi fruttiferi pluri-annuali che sembrano non essere propriamente attivi in periodi più sfavorevoli (inverno o piena estate) assumendo un colore grigio chiaro, con fessurazioni sul tessuto fertile, salvo poi riprendere attivamente la sporulazione quando le temperature e l'umidità sono più favorevoli.

Il nome dato all'agente della carie bianca, *Fomitiporia mediterranea* (Fischer, 2002), lascia dunque intuire il suo attuale areale di diffusione, il bacino Mediterraneo. In altre aree geografiche la carie, quando presente, è invece generata ancora da *Fmed* o da specie fungine diverse (*Fomitiporia polymorfa* in Pennsylvania e in California; *Inocutis jamaicensis*, in Argentina, nel caso dell'Hoja de Malvon, o *Fomitiporella vitis* in Cile per il Chlorotic leaf roll; *Fomitiporia australiensis* in Australia; altre specie di basidiomiceti in Nuova Zelanda) (Fischer, 2006).

*Fmed* forma corpi fruttiferi resupinati, legnosi, spessi fino a 15 mm, di colore marrone-cannella, con 6-8 pori per millimetro e assenza di lamelle, localizzati generalmente sulla parte più alta del tronco. Le basidiospore sono di due dimensioni: 6-7x5-6 µm e 5-5,5x4-5 µm (ma probabilmente le spore più piccole sono solo spore immature). Il micelio è cotonoso o lanoso con ife aeree di colore giallastro o brunastro. Alcuni ceppi (Tipo S, "staining type") formano rade ife aeree, conferiscono al substrato su cui si accrescono (di solito agar malto con estratto di lievito) un colore rosso scuro-bruno e in coltura crescono più lentamente. La temperatura ottimale di crescita è intorno a 30°C. La riproduzione è omotallica (Fischer, 2002).

### II.1.3 Sintomatologia della carie bianca e delle sindromi del complesso esca

#### Carie bianca

Quando il tronco di piante di vite, meno frequentemente i grossi tralci, raramente il portinnesto, sono invase da *Fmed* (*fig. 1*) si ha lo sviluppo della carie bianca (*fig. 2*). Il marciume del legno causato da questo fungo è così chiamato (carie bianca) poiché il legno è trasformato in una massa spugnosa, friabile di colore bianco-giallastro. In sezione trasversale l'area cariata è spesso delimitata da una linea scura più o meno spessa che separa i tessuti alterati da quelli sani. La carie frequentemente parte da una ferita di potatura e si estende nel legno, verso l'alto e verso il basso e internamente, fino a interessare larghi settori del cilindro centrale. In alcuni casi la carie raggiunge anche la superficie esterna causando la formazione di fratture lungo il tronco ("mal dello spacco"). Normalmente essa è preceduta o accompagnata dagli altri tipi di alterazioni già descritti: striature scure longitudinali (macchie scure in sezione trasversale), isolate o riunite in gruppi intorno a una cerchia annuale di legno o in prossimità del midollo, e aree di colore rossastro o bruno variamente localizzate nel cilindro centrale o al margine dei tessuti necrotizzati o cariati.

Il legno una volta cariato perde ogni sua funzionalità; tuttavia è sufficiente che



Fig. 1 - Corpo fruttifero di *Fomitiporia mediterranea*



Fig. 2 - Tessuto legnoso quasi completamente trasformato in carie bianca in seguito all'attività degradatrice di *F. mediterranea*

le ultime due-tre cerchie legnose mantengano intatta la loro efficienza nel trasporto di acqua e soluti perché la pianta continui a vegetare regolarmente (Pratt, 1974; Mullins *et al.*, 1992). Questo spiega perché piante con vaste aree cariate nel tronco continuano a vegetare e produrre, almeno fino a quando non interviene anche la tracheomicosi o un colpo apoplettico.

I sintomi esterni della carie non sono al momento descrivibili perché non sono ancora state rinvenute piante di vite di una certa età con solo carie nel tronco e/o in altri organi della pianta. Sono state invece rinvenute piante giovani di vite con piccole aree cariate nel legno del tronco o al livello dell'innesto e assenza di sintomi sulle foglie. D'altro canto inoculazioni artificiali di *Fmed* hanno riprodotto la carie senza che le piante inoculate, tranne forse in un caso (Sparapano *et al.*, 2001b), abbiano mai manifestato sintomi fogliari di esca. Infine, in alcuni Paesi, ad esempio l'Australia, non sono stati mai descritti sintomi fogliari di esca in piante in cui era presente la carie bianca nel tronco (Edwards *et al.*, 2001b).

#### *Malattia delle venature brune delle barbatelle*

Questa malattia non manifesta esternamente alcun sintomo particolare. Invece, se viene praticata una sezione trasversale o longitudinale a livello del portinnesto si possono notare diverse alterazioni. Quella più evidente, in sezione longitudinale, è rappresentata dalla presenza di striature isolate o raggruppate a formare una o più fasce bruno-nerastre che partono talvolta dal punto d'innesto e si allungano verso l'alto e verso il basso fino a raggiungere, spesso, l'estremità inferiore; più frequentemente, tali striature partono dal basso e si allungano verso l'alto. La sezione trasversale della barbatella mostra la presenza di punteggiature nere nella forma di un anello pressoché continuo intorno al midollo centrale oppure sparse sulla superficie di taglio (*fig. 3a*). Dai vasi corrispondenti ai puntini neri fuoriesce spesso un essudato gommoso di colore quasi nero (Mugnai *et al.*, 1999) (*fig. 3*).

#### *Malattia di Petri (o "black goo")*

Questa malattia è stata segnalata per la prima volta in Italia, nel 1912, da Lionello Petri. La malattia è stata poi dimenticata. In epoca moderna (prima metà degli anni novanta) si è ritornati a occuparsene in seguito all'allarme lanciato negli Stati Uniti da Lucie Morton, "vineyard consultant" in Virginia e in altri stati nordamericani. In particolare, la dott.ssa Morton, con un messaggio via internet, chiese lumi alla comunità scientifica internazionale su un misterioso deperimento, al quale diede il nome di "black goo", che colpiva piante di vite appena impiantate o impiantate da pochi anni. Ad oggi la malattia è stata segnalata su giovani viti in vari Paesi europei, in Sud Africa, in California, in Pennsylvania, in Argentina, in Australia e in Nuova Zelanda.

Come si è detto, alla malattia è stato dato inizialmente il nome di "black goo" perché il sintomo più caratteristico era costituito dalla fuoriuscita di un materiale gommoso scuro, quasi catramoso, dai vasi legnosi tagliati trasversalmente (*fig. 3b*). La malattia può colpire viti molto giovani, già a partire dal primo anno di età, e si manifesta normalmente con uno sviluppo stentato di tutta la pianta o di alcune sue parti. Altri sintomi segnalati sono un blocco completo dello sviluppo, clorosi moderata del fogliame, perdita di produzione, graduale declino del vigore e della produttività. In qualche caso l'esito finale della malattia è la morte della pianta. In altri casi la pianta continua a vegetare e la malattia, verosimilmente, si

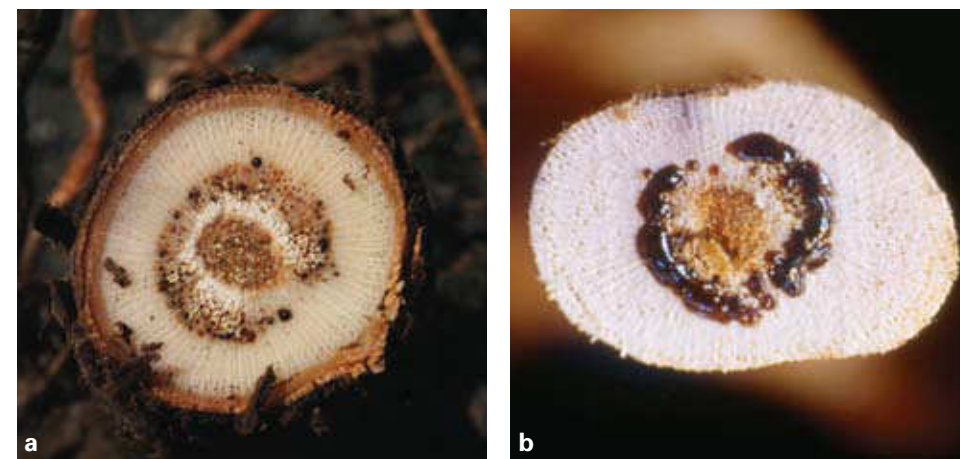


Fig. 3 - Fuoriuscita di essudato gommoso dai vasi tagliati trasversalmente in una giovane pianta infetta da *Phaeoconiella chlamydospora*

evolve in anni successivi nell'esca e/o, dopo l'eventuale insediamento di *Fmed*, in esca propria. Per quanto riguarda i sintomi interni si possono osservare: un midollo centrale scuro, la presenza di un anello nero attorno al midollo, oppure di macchie nere diffuse o disposte a mezzaluna nel legno del tronco (incluso il portinnesto) e dei tralci, la fuoriuscita dai vasi sezionati trasversalmente di goccioline di un liquido gommoso scuro le quali, seccandosi, lasciano una crosticina catramosa sulla superficie di taglio.

La malattia di Petri può insorgere in campo o costituire l'evoluzione della malattia delle venature brune delle barbatelle.

#### *Esca giovane (o malattia delle foglie striate)*

La malattia interessa le piante di vite, da 2-3 anni in poi, le quali presentano, esternamente, i tipici sintomi fogliari "tigrati" e, internamente, le già descritte striature colonizzate da *Pch* e, talvolta, anche da *Pal* o altra specie di *Phaeoacremonium*. È possibile che l'esca rappresenti l'evoluzione in vigneto della malattia delle venature brune delle barbatelle o di quella della malattia di Petri quando questa non ha esiti esiziali per le giovani piante di vite. L'esca può comunque insorgere anche in campo nel caso di infezioni su materiale di vivaio sano.

Le classiche foglie tigrate presentano sulla lamina strisce di tessuto necrotico del colore del laterizio (mattoncino), delimitate da una sottile banda di tessuto decolorato, da giallo chiaro a quasi bianco (*fig. 4*). Queste strisce partono dal bordo della lamina o sono incluse in questa sotto forma di macchie di varia grandezza e forma. Segue una fascia di tessuto ancora verde che include le nervature. In altri casi, tra tessuto necrotico e banda decolorata compare una spessa linea di colore variabile dal vinaccia al viola. In altri casi ancora, la banda quasi bianca è invece di color vinaccia.

Normalmente, la "tigratura" comincia con una macchia clorotica, la quale si estende e si unisce ad altre macchie clorotiche. All'interno dell'area clorotica si accumulano quindi



Fig. 4 - Una classica foglia tigrata, con la caratteristica alternanza, nel tessuto internervale, di strisce di tessuto necrotico color mattone e di una sottile banda di tessuto decolorato, da giallo chiaro a quasi bianco

pigmenti antocianici; segue la necrosi in posizione centrale, la quale estendendosi riduce il tessuto decolorato a una sottile banda. La banda decolorata, o viola, o vinaccia più o meno scuro delle foglie tigrate è dunque un residuo di una precedente alterazione.

Sono poi possibili numerose altre variazioni. Possiamo osservare, come primo sintomo, aree disidratate, di colore verde chiaro; oppure macchie di colore rosso o viola. Le aree così alterate successivamente necrotizzano in parte facendo assumere alla foglia un aspetto spesso diverso dalla nota "tigratura". Le foglie sintomatiche possono rimanere a lungo sulla pianta o cadere con tutto il picciolo.

Sugli acini, specialmente di uve da tavola, compaiono talvolta delle piccole aree di colore marrone scuro o violetto più o meno intenso. Le macchie sono di solito più abbondanti all'estremità distale dell'acino, ma possono anche essere distribuite irregolarmente su tutta la superficie dell'acino o disposte in modo da formare bande longitudinali. In questi ultimi casi



Fig. 5 - Necrosi bruno-rossa nella parte centrale del tronco principalmente associata alla presenza di *Phaeoaniella chlamydospora* e caratteristica delle piante affette da mal dell'esca

possono comparire fratture superficiali che aprono la via ad agenti di marciumi secondari. In California i sintomi sugli acini (in particolare sulla cv. di uva da tavola Thompson seedless) sono molto comuni e per questo il mal dell'esca ha in origine preso il nome di "black measles".

Internamente, in sezione trasversale, oltre alle punteggiature scure già descritte per la malattia delle venature brune delle barbatelle e della malattia di Petri, si possono individuare zone con imbrunimenti o necrosi brune o bruno chiare in genere non molto sviluppate, in posizione centrale (caratteristica la presenza di necrosi di colore bruno-rosso intorno al midollo tipicamente associata a *Pch*) o settoriale, nel tronco principale e/o nelle branche, in genere collegate a ferite (per lo più di potatura) (fig. 5). Scortecciando il tronco e/o le branche è frequente notare bande longitudinali brunastre o giallastre a livello del cambio

### Esca propria

Questa sindrome si rileva allorché si sovrappongono nella stessa pianta gli effetti della presenza di tutti e tre i principali funghi che si ritiene siano associati all'esca: *Pch*, *Pal* e *Fmed*. I sintomi esterni dell'esca propria sono dunque semplicemente quelli dell'esca giovane; quelli interni, essenzialmente, venature brune e carie bianca. L'esca propria è quasi la regola in piante di una certa età, ma non è affatto rara anche in piante abbastanza giovani.

Nell'esca propria, così come nelle forme precedentemente descritte, possono essere presenti nel legno anche altri tipi di necrosi causate dalla colonizzazione del legno da parte di altri funghi o patogeni lignicoli, come ad esempio varie specie nella famiglia delle Botryosphaeriaceae, *Eutypa lata*, *Phomopsis viticola* ecc. Naturalmente, la diversa frequenza di colonizzazione o la contemporanea presenza di più patogeni, è legata alla presenza di diverse fonti di inoculo nelle singole zone.

### Apoplessia

Le viti colpite dalla malattia possono mostrare, già a partire dal mese di giugno, improvvisi avvizzimenti (in precedenza descritti come forma acuta del mal dell'esca e, ancora prima, come unica esemplificazione dell'esca) di tutta o di parte della chioma (apoplessia) (fig. 6). Talvolta queste piante riprendono a vegetare nella stessa stagione o in quella successiva; più spesso, l'apoplessia è sinonimo di morte della pianta. Non di rado, tuttavia, le piante di vite vanno incontro a una sorta di apoplessia ritardata (apoplessia nascosta?). Accade, in questo caso, che piante ammalate di esca e sintomatiche o asintomatiche nell'anno, non rivegetano la primavera successiva (muoiono, in pratica, durante l'inverno).

Le cause dell'apoplessia non sono note. Era stato osservato che, in piena estate, piogge intense seguite da vento caldo potevano favorire l'insorgere dell'apoplessia. In effetti, a seguito di una forte pioggia la pianta apre gli stomi per smaltire l'umidità in eccesso; quando poi sopravviene, subito dopo, un vento caldo la pianta, che dovrebbe più o meno rapidamente chiudere i suoi stomi per adattarsi alla nuova situazione, forse "sente" ancora la presenza di acqua nel terreno e non invia il segnale necessario (via acido abscissico) per chiudere gli stomi e contenere così la perdita di acqua per traspirazione. Ne consegue l'avvizzimento rapido della pianta. Tutto ciò potrebbe apparire plausibile e verificarsi effettivamente in natura; tuttavia, è stato accertato che i colpi apoplettici insorgono frequentemente anche in giornate lontane da eventi piovosi (Surico *et al.*, 2000a) e che il fenomeno interessa soprat-



Fig. 6 - Colpo apoplettico su una vite fino a pochi giorni prima in piena produzione

### II.1.4 Casi di tigrature fogliari e di carie bianca in giovani piante

Nel progetto interregionale è stato dato spazio, fra l'altro, alla raccolta di dati riguardanti l'effettivo verificarsi in campo di casi di esca e le vie di infezione in piante giovani di vite. Allo scopo sono stati utilizzati, fra l'altro, due vigneti: uno a San Casciano in Val di Pesa (FI) (cv. Cabernet Sauvignon su 110R; anno d'impianto 2000) e l'altro a Sovicille (SI), in un'azienda agraria a conduzione biologica (cv. Sangiovese, anno d'impianto 2000).

I rilievi sono stati effettuati nel 2005 e, in parte, anche nel 2006.

#### Azienda agraria in provincia di Firenze

Da questo vigneto sono state prelevate ed esaminate poi nel dettaglio due giovani piante di vite (pianta 1 e 2, nelle *tabb. 3-4 e figure*), e una di controllo (pianta 3), nell'inverno successivo al primo anno di manifestazione dei sintomi fogliari di esca (5° dopo l'impianto). Le piante 1 e 2 avevano manifestato nel 2005 sintomi inequivocabili di esca; la pianta 2 era in seguito andata incontro ad apoplessia.

Dopo una prima analisi della superficie esterna, le 3 piante sono state tagliate trasversalmente in maniera tale da suddividere il campione in 5 regioni: 1. *regione basale del soggetto* (apparato radicale); 2. *regione terminale del soggetto* (parte restante del portinnesto); 3. *punto d'innesto*; 4. *regione basale dell'oggetto* (parte del tronco della cultivar) e, 5. *regione terminale dell'oggetto* (cordone speronato)

(*fig. 7*). Di ogni regione è stata misurata la lunghezza e la distanza relativa dal punto di innesto (punto 0, di riferimento). Ogni porzione di pianta è stata quindi sezionata ulteriormente (in totale, la pianta 1 è stata ridotta in 90 porzioni

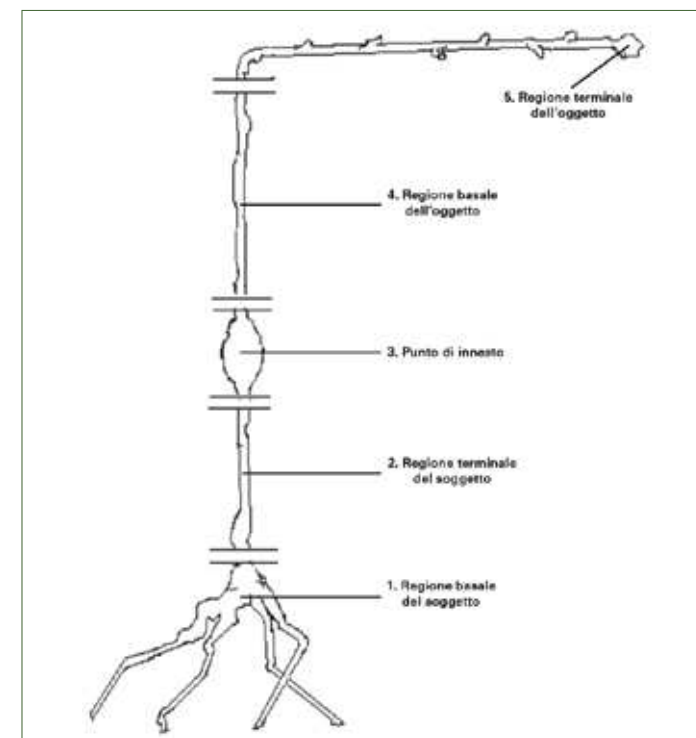


Fig. 7 - Schema delle porzioni di viti esaminate nel dettaglio

Tab. 2 - Alcuni dati sul numero di colpi apoplettici (in %) in vigneti in Toscana, nel 2006\*

Vigneto	Località	Cultivar	Età	Colpi apoplettici (%)
CAL3	Calenzano (PO)	Cabernet Sauvignon	4	0,0
MON19	San Casciano V.P. (FI)	Cabernet Sauvignon	11	0,4
CAL2	Calenzano (PO)	Cabernet Sauvignon e Syrah	15	0,0
CBS14	Castelnuovo B.ga (SI)	Cabernet Sauvignon	18	1,0
LAT1	Laterina (AR)	Cabernet Sauvignon	20	4,8
CAL1	Calenzano (PO)	Sangiovese e Merlot	35	3,8
CAR1	Carmignano (PO)	Sangiovese	> 35	6,8

\* Si mette in evidenza in questo caso, la maggior percentuale di colpi apoplettici in vigneti più vecchi.

tutto piante vecchie (*tab. 2*), nelle quali la carie si è ormai estesa a vaste aree di legno. È quindi presumibile, visto anche che le foglie tigrate si possono osservare anche su piante di soli due anni e in assenza di carie, che l'apoplessia sia soprattutto da associare alla carie bianca, o comunque a una situazione patologica più complessa quale quella rappresentata dall'esca propria, e che sia, quindi, determinata soprattutto, se non esclusivamente, da disfunzione dell'apparato conduttore della pianta eventualmente associato anche a un accumulo nelle foglie di tossine (polisaccaridi extracellulari, scitalone, isosclerone, polipeptidi).

di legno; la pianta 2 in 95 e la pianta 3 – controllo – in 72 porzioni) e ciascun pezzo esaminato attentamente allo scopo di determinare:

1. numero di ferite per porzione;
2. numero di ferite non colonizzate da funghi (distinguendo fra: G, ferita da grandine; P, ferita da potatura);
3. numero di ferite (come sopra) con segni di infezione da funghi;
4. principali alterazioni e loro estensione nel legno: striature nere (STN), striature brune (STB) e necrosi brune da *Pch* (NB); carie bianca da *Fmed* (CB); presenza di altre alterazioni o segni di agenti patogeni (es., *Armillaria mellea*, specie di Botryosphaeriaceae) (AA).

**Pianta 1 - Firenze**

Le porzioni prelevate dalla pianta 1 (figg. 8-10) hanno mostrato sintomi attribuibili a infezioni da parte di *Pch* e *Fmed* a partire dal punto d'innesto, in prossimità di una depressione longitudinale corrispondente a una ferita lungo la parte esterna del legno. Questi sintomi si estendevano al portainnesto fino quasi a raggiungere l'apparato radicale. In totale, su nesso e portainnesto, sono state contate 97 ferite (42 da grandine; 55 da potatura) delle quali solo 9 colonizzate da funghi. Internamente sono state osservate STN, STB e NB, riferibili a infezioni da *Pch*, e CB dovuta all'azione di *Fmed*.



Fig. 8 - Pianta 1-FI. Evidenti sintomi fogliari di esca in una pianta al quinto anno dall'impianto

**Tab. 3 - Alterazioni presenti nella pianta 1 - Firenze**

Pianta 1 - Firenze	Lunghezza del segmento analizzato (cm)	Distanza dal punto d'innesto (cm)	n. totale delle ferite	n. di ferite non colonizzate da funghi		n. di ferite con segni di infezione da funghi		Principali alterazioni e loro estensione nel legno
				grandine (?)	potatura	grandine (?)	potatura	
Regione basale del soggetto	7	-30 -23	—	—	—	—	—	STN**, STB**, CB**
Regione terminale del soggetto	20	-23 -3	—	—	—	—	—	STN**, STB**, CB**
Punto di innesto	6	0	7	4	1	—	2	STN*, CB*, STB**, CB**
Regione basale dell'oggetto	54	+3 +57	44	17	25	—	2	NB*
Regione terminale dell'oggetto	46	+57 +104	46	21	19	1	5	STN*, NB*

LEGGENDA: STN = striature nere; STB = striature brune; NB = necrosi brune; CB = carie bianca. Estensione dell'alterazione: \* = 2-5 mm; \*\* = oltre 5 mm.

Fig. 9 - Pianta 1-FI. Punto di innesto con evidente carie bianca che si sviluppa a partire da ferita

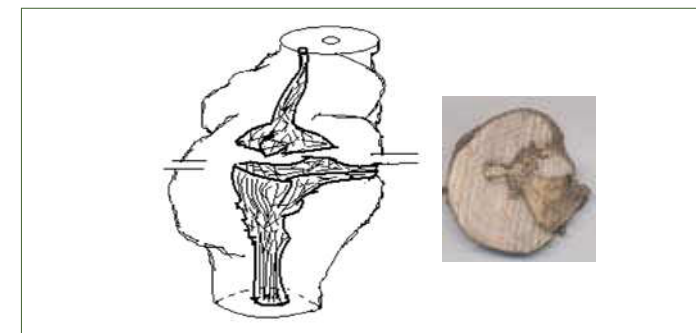
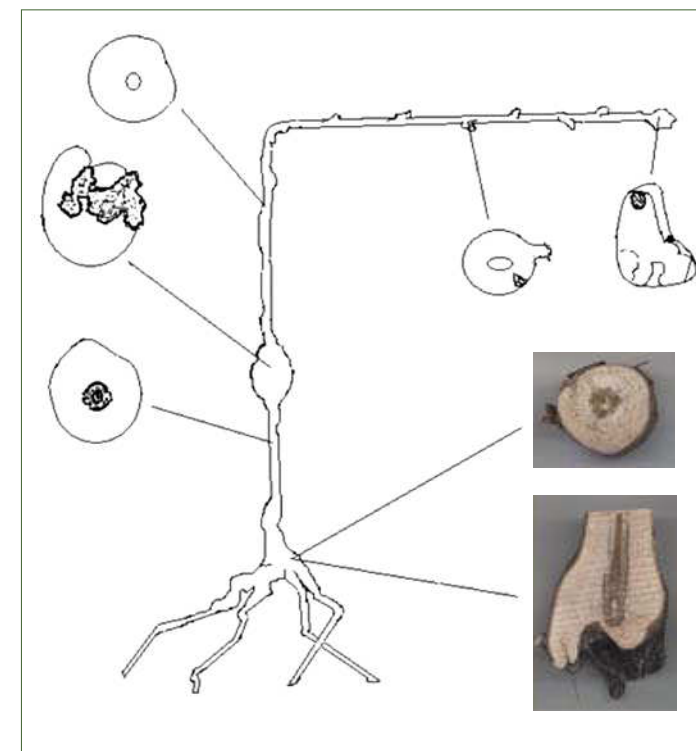


Fig. 10 - Pianta 1-FI, rappresentazione schematica: strie nere e necrosi intorno al midollo nel portainnesto; carie bianca nel punto di innesto e nel midollo del portainnesto; zone necrotiche in corrispondenza di ferite sulla branca principale



La presenza della ferita nel punto di innesto unitamente al tipo e orientamento delle alterazioni dei tessuti legnosi ha permesso di ricavare le seguenti indicazioni:

- *Fmed* è entrato nel legno da una ferita, successivamente alla messa a dimora, e ha colonizzato il midollo per tutta la lunghezza del portainnesto;
- *Pch* è anch'esso penetrato da una ferita e ha formato striature nere intorno alla carie, estendendosi poi, sia pure in modo discontinuo, in direzione del portainnesto. Infatti, a una distanza di 6 cm dal punto d'innesto, *Pch* ha formato punteggiature nere intorno al midollo. Invece, più in basso, a 8 cm dall'apparato radicale, era presente, intorno al midollo cariato, del tessuto imbrunito, di colore rossiccio e consistenza secca. Ciò ha lasciato supporre una presenza di *Pch* nelle cerchie legnose del portainnesto già al momento della messa a dimora. Necrosi e brune e striature nere sono state osservate anche nell'oggetto.

**Pianta 2 - Firenze**

Anche la pianta 2, che presentava evidenti avvizzimenti (fig. 11), ha mostrato sintomi attribuibili a infezioni da parte di *Pch* e *Fmed*. In particolare, segni di una infezione da *Pch* sono stati rinvenuti nel portinnesto, nella cerchia più interna intorno al midollo. La carie, piccola, è stata vista solo nel punto d'innesto, a partire da una ferita di spollonatura. Per quanto riguarda la parte aerea, sono state osservate solo due ferite sulla branca principale con presenza di aree necrotiche e striature nere attribuibili a *Pch*. Tutte le altre ferite presentavano necrosi dovute alla compartimentalizzazione da parte della pianta dei tessuti feriti. Infine, nelle regioni basale e terminale del soggetto sono state rilevate infezioni da *Armillaria mellea* (AA, nella tab. 4), che si estendevano dall'apparato radicale fino a 10 cm sotto il punto d'innesto. In totale sono state contate 71 ferite (37 presumibilmente da grandine; 34 da potatura), delle quali solo 9 colonizzate da funghi.



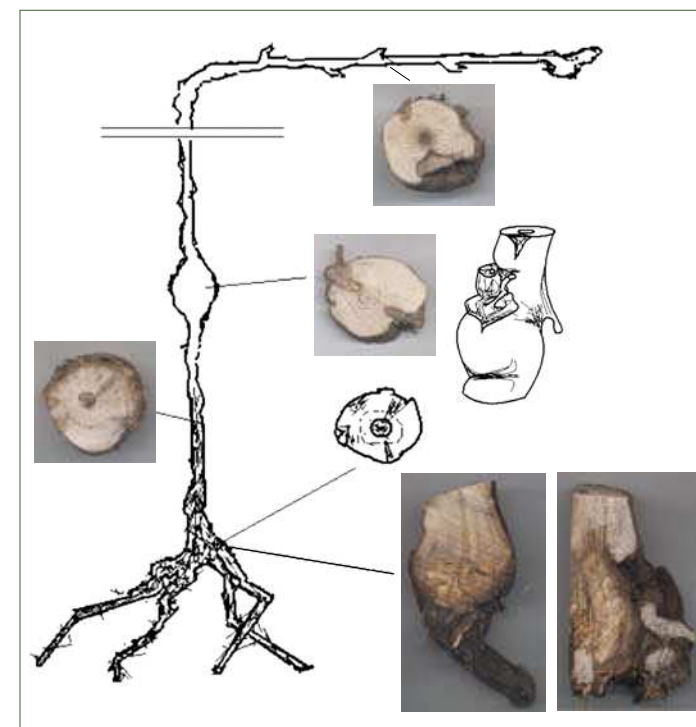
Fig. 11 - Pianta 2-FI con colpo apoplettico parziale al quinto anno dall'impianto

**Tab. 4 - Alterazioni presenti nella pianta 2 - Firenze**

Pianta 2 - Firenze	Lunghezza del segmento analizzato (cm)	Distanza dal punto d'innesto (cm)	n. totale delle ferite	n. di ferite non colonizzate da funghi		n. di ferite con segni di infezione da funghi		Principali alterazioni e loro estensione nel legno
				grandine (?)	potatura	grandine (?)	potatura	
Regione basale del soggetto	10	-40 -30	0	—	—	—	—	AA**
Regione terminale del soggetto	25	-30 -5	2	—	—	—	2	AA**, STB**, NB*
Punto di innesto	10	0	8	1	5	—	2	STN*, STN**, CB**
Regione basale dell'oggetto	57	+5 +62	31	19	9	1	2	STN*, NB*, NB**
Regione terminale dell'oggetto	45	+62 +107	30	16	12	0	2	STN*

LEGGENDA: STN = striature nere; STB = striature brune; NB = necrosi brune; CB = carie bianca; AA = carie da *Armillaria mellea*.  
Estensione dell'alterazione: \* = 2-5 mm; \*\* = oltre 5 mm.

Fig. 12 - Pianta 2-FI, rappresentazione schematica: nell'apparato radicale e alla base del portinnesto marciume da *Armillaria mellea*; a livello del punto di innesto una carie poco estesa causata da *Fomitiporia mediterranea*, e intorno al midollo, nel portinnesto, e nella branca principale a livello di una ferita di potatura infezioni da *Phaeomoniella chlamydospora* (strie nere)



**Pianta 3 - Firenze**

L'analisi degli spezzoni di legno della pianta di controllo ha permesso di accertare l'assenza di qualunque tipo di infezione nelle zone dell'apparato radicale, del portinnesto e dell'oggetto. Invece, nel punto d'innesto, in prossimità di una delle cinque ferite analizzate, i tessuti interni hanno mostrato la presenza di una piccola carie attribuibile a *Fmed* (fig. 13).

In conclusione, nelle tre piante analizzate, scelte come esemplificative di tutti i casi osservati, sono state rilevate infezioni sia di *Fmed* sia di *Pch* e, in un caso, anche di *A. mellea*. La presenza di *Fmed* e *Pch* nelle piante 1 e 2 è sembrata risalire a due diverse fonti di infezione:

1. infezioni da *Pch* del portinnesto già prima dell'impianto;
2. infezioni da *Fmed* localizzate, invece che su grossi tagli di potatura come normalmente si rileva nei vigneti adulti, a livello di ferite create con il taglio dei polloni di un anno.

Questa via di penetrazione del patogeno è alquanto anomala e inattesa, considerando che in quella fase vegetativa, la capacità della pianta di cicatrizzare rapidamente le ferite dovrebbe essere elevata.

Si può ipotizzare che il fenomeno sia legato alla sfortunata coincidenza dei tagli di spollonatura con una successiva abbondante sporulazione del patogeno in genere associata al verificarsi di piogge (Fischer, comunicazione personale).

L'associazione fra pioggia e abbondante sporulazione è stata verificata infatti sia per



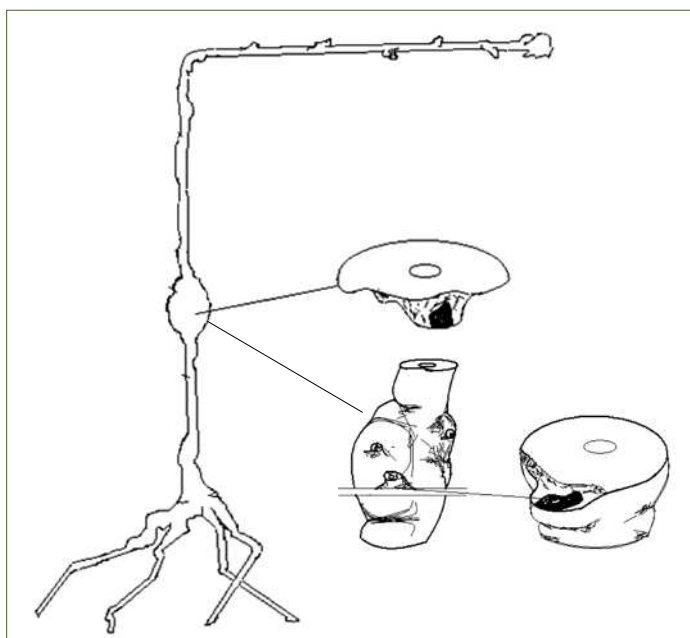


Fig. 13 - Pianta 3-FI, rappresentazione schematica della pianta priva di sintomi fogliari. A livello del punto di innesto (a destra) si rileva una carie poco estesa causata da Fomitiporia mediterranea

*Fmed* che per *Pch* e *Pal*, e il verificarsi di piogge subito dopo il taglio costituisce sempre un fattore di rischio elevato, soprattutto per tagli che, normalmente, pochi si preoccupano di proteggere con appositi mastici.

La posizione anomala dei tessuti cariati rende, in questi casi, inapplicabile l'adozione di una delle più efficaci forme di recupero di piante con sintomi di mal dell'esca: il riallevamen-

to di un pollone dalla base del tronco per sostituire la pianta infetta. In questo caso infatti non si eliminerebbe, con il taglio, tutta la zona di legno alterato.

Sviluppo di carie a livello del punto di innesto è stato rilevato anche nella pianta priva di sintomi fogliari (pianta 3). In questa pianta, tuttavia, diversamente dalle altre due, non erano presenti infezioni da parte dei funghi tracheomicotici. D'altro canto, la presenza di striature nere e di legno bruno rosso era estremamente limitata anche nella pianta 1, dove l'infezione più rilevante era certamente a livello del portainnesto. Questa infezione, è derivata, sulla base della disposizione del legno alterato, dal materiale di propagazione. Piccole zone colonizzate da *Pch* e/o *Pal* erano presenti anche nella cultivar in seguito a infezioni da tagli di potatura

La pianta 1 ha dunque manifestato sintomi fogliari di esca in presenza di modeste quantità di legno colonizzato da *Pch* e *Fmed*, che comunque è apparso sufficiente a innescare, probabilmente tramite l'azione delle tossine prodotte dai funghi patogeni, lo sviluppo dei sintomi fogliari.

Importanti indicazioni sono state fornite anche dalla pianta 2 con sintomi di avvizzimento verosimilmente da attribuire alle infezioni da *Armillaria mellea*. Si potrebbe affermare, anche sulla base di altre affermazioni, che quando si osservano, come in questo caso, piante giovani apoplettiche, la causa è da far risalire il più delle volte all'instaurarsi di fenomeni di marciumi radicali piuttosto che di esca. In una pianta così giovane, infatti, difficilmente la quantità di legno alterato può essere tale da determinare fenomeni gravi di apoplezia.

**Azienda agraria in provincia di Siena**

In questo vigneto è stata rilevata un'incidenza di esca manifesta (fig. 14) dell'1,4% nel 2005 (quinto anno dopo l'impianto) e dell'1,15% nel 2006, nonché un'incidenza cumulata nel 2006 del 2,3% (percentuale delle piante che hanno manifestato sintomi di esca almeno in uno degli anni dei rilievi). Solo 5 piante sono risultate sintomatiche sia nel 2005, sia nel 2006.



Fig. 14 - Evidenti sintomi di esca in una pianta del vigneto di 5 anni della provincia di Siena oggetto dei rilievi

**Tab. 5 - Alterazioni presenti nella pianta di controllo (pianta 3 - Firenze)**

Pianta 3 - Firenze	Lunghezza del segmento analizzato (cm)	Distanza dal punto d'innesto (cm)	n. totale delle ferite	n. di ferite non colonizzate da funghi		n. di ferite con segni di infezione da funghi		Principali alterazioni e loro estensione nel legno
				grandine (?)	potatura	grandine (?)	potatura	
Regione basale del soggetto	8	-27,5 -19,5	—	—	—	—	—	—
Regione terminale del soggetto	15	-19,5 -4,5	3	—	3	—	—	—
Punto di innesto	9,5	0	5	—	4	—	1	CB*
Regione basale dell'oggetto	50	+4,5 +54,5	25	9	16	—	—	—
Regione terminale dell'oggetto	43	+54,5 +97,5	18	10	8	—	—	—

LEGENDA: CB = carie bianca. Estensione dell'alterazione: \* = 2-5 mm.

Le piante prelevate nel 2006 sono state 6 (4 in aprile e 2 in luglio). Anche in questo caso ciascuna pianta è stata esaminata nel dettaglio, dal portinnesto ai cordoni fruttiferi, e anche in questo caso sono stati rilevati: il numero di ferite totali; il numero di ferite cicatrizzate; il numero di ferite contaminate dai funghi dell'esca; il tipo e l'estensione delle alterazioni nel legno. Delle 6 piante esaminate tutte hanno mostrato alterazioni interne riferibili ad attacchi di *Pcb* e/o *Pal* e solo in 2 piante sono stati rinvenuti anche modesti segni di carie bianca.

**Pianta 1 - Siena**

Nella pianta 1, alla base del portinnesto, è stata osservata la presenza di striature nere intorno al midollo e la fuoriuscita dai vasi alterati, sezionati trasversalmente, di abbondanti gomme nere lucide. Inoltre, il midollo risultava di colore bruno-nero e consistenza morbida a partire già da 24 cm al disotto del punto d'innesto e fino alla zona d'innesto. Nel punto d'innesto il midollo presentava la stessa alterazione con la prima cerchia di legno intorno a esso quasi completamente imbrunita. In tale zona sono state osservate due ferite dalle quali prendeva corpo un'ampia necrosi bruna che si estendeva fino al midollo. È apparso evidente che dalle due ferite è partita un'infezione fungina la quale è venuta in contatto con un'alterazione preesistente. Ciò ha fatto ipotizzare che già la barbatella innestata fosse affetta dalla malattia delle venature brune.

Nella cultivar, dall'innesto e fino a circa 20 cm verso l'alto, erano ancora presenti, ma via via degradanti, abbondanti alterazioni bruno nere della prima cerchia di vasi intorno al midollo e del midollo stesso. Striature brune e nere sono state osservate anche in corrispondenza della ferita n. 10 a 79 cm sopra il punto d'innesto, cioè nella curva della forma di allevamento.

Nella pianta 1 sono state dunque rilevate varie infezioni da *Pcb*: un'infezione precoce (verosimilmente in vivaio) al piede della pianta; un'infezione al punto d'innesto, probabilmente da ferite di spollonatura, che si è estesa verso il basso e verso l'alto (quella verso il basso si è congiunta con l'infezione dal piede); e un'infezione nella parte alta del fusto da probabile ferita da potatura.

Non è stata rilevata in questa pianta la presenza di carie da *Fmed*.



Fig. 15 - Pianta 2-SI: ferita colonizzata da *Pcb*, le striature nere originate dalla ferita si estendono lungo il fusto

**Pianta 2 - Siena**

In questa pianta sono state osservate ampie striature nere le quali originavano da una ferita presente 15 cm sotto il punto d'innesto e si spingevano verso il basso per almeno 15 cm fin quasi all'inserzione delle radici (fig. 15).

Dal punto d'innesto e per 7,5 cm verso il basso la prima cerchia intorno al midollo e il midollo stesso sono risultati completamente alterati e imbruniti. Inoltre, erano presenti striature nere che si estendevano per 5 cm al disotto del punto d'innesto.

Nella cultivar, una ferita situata 28 cm sopra l'innesto è apparsa l'origine di striature nere che si estendevano per quasi 18 cm verso il basso e per più di 12 cm verso l'alto dove, riunendosi, hanno assunto un aspetto a mezza luna completamente nera. Il perimetro del midollo è apparso molto scuro fino a 40 cm sopra l'innesto.



Fig. 16 - Pianta 2-SI: necrosi brune e punteggiature nere nell'oggetto

Tab. 6 - Complesso delle alterazioni del legno osservate nella pianta 2 - Siena							
Pianta 2 - Siena	Porzione (cm)	n. ferite totali	n. ferite cicatrizzate	n. ferite contaminate	Estensione dell'alterazione <sup>1</sup>		Alterazioni del legno
					cm	n.	
Portinnesto	da -25 a -7,5	1	0	1	< 0,5	0	—
					0,5 - 3	0	—
					> 3	1	NB, STN
Punto d'innesto	da -6,5 a 0	2	0	2	< 0,5	1	STN
					0,5 - 3	0	—
					> 3	1	NB, STN
Cultivar: fusto verticale	da 10 a 82	7	3	4	< 0,5	1	NB, STN, STB
					0,5 - 3	1	NB, STN, STB
					> 3	2	NB*, STN*
Cultivar: cordone orizzontale	da 84,5 a 155	32	27	4	< 0,5	3	NB**, STN*, STB
					0,5 - 3	0	—
					> 3	1	NB, STN, STB

<sup>1</sup> Numero di ferite che presentano alterazioni del legno attribuibili a colonizzazione fungina in ciascuna categoria (< 0,5; 0,5-3; > 3 cm). STN = striature nere; STB = striature brune; NB = necrosi brune.

Nella parte più alta del fusto erano presenti altre 2 ferite: da entrambe si sono originate infezioni che hanno formato necrosi brune e striature nere estese per 3-5 cm.

Nella pianta 2 le alterazioni più significative, attribuibili a *Pcb* sono state dunque rinvenute nel portinnesto e nel fusto (fig. 16). In tutti i casi si è trattato verosimilmente di alterazioni prodotte da infezioni in campo. Anche nella pianta 2 non è stata riscontrata carie del legno.

**Pianta 3 - Siena**

Nella terza pianta analizzata è stato osservato, in corrispondenza del piede, un imbrunimento della zona circostante il midollo. L'alterazione si riduce velocemente fino a svanire salendo verso il punto d'innesto, all'altezza del quale sono state osservate l'alterazione del midollo e la presenza di una ferita da cui hanno avuto origine striature brune e nere che si sono sviluppate per quasi 5 cm in direzione delle radici.

Nel fusto erano presenti, alla stessa altezza, 2 ferite, la n. 7 e la n. 8, dalle quali si sono sviluppate due zone necrotiche che hanno raggiunto il midollo. Questo si presentava alterato, con la zona perimetrale densamente imbrunita. Dalle stesse ferite hanno avuto origine striature brune che si sono estese verso il basso per 7,5 cm.

Nel cordone speronato della pianta 3 sono state rilevate molte ferite delle quali ben 6 sono risultate il sito d'ingresso di funghi che si sono diffusi nel legno sano per oltre 3 cm. In particolare, dalla ferita 17, localizzata all'altezza del primo sperone, originavano striature nere lunghe 15 cm e un'ampia necrosi bruna visibile nella fig. 17. Dalla ferita 25, all'altezza del terzo sperone, partono altre striature nere per 15 cm. Infine, dalla ferita 30 si diffondono striature brune e nere per 13 cm.

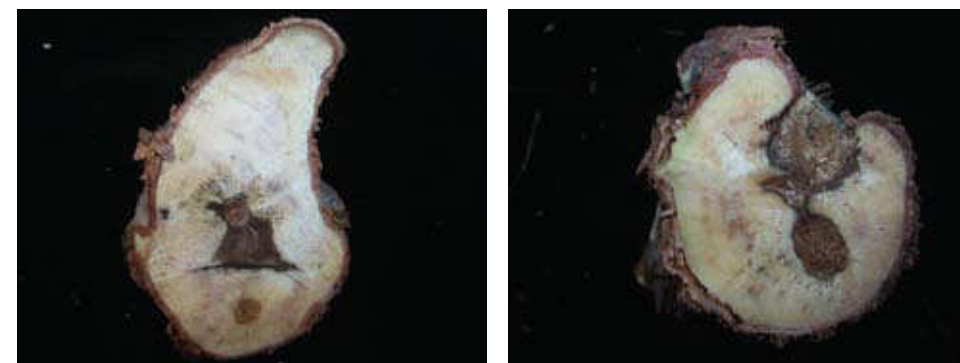


Fig. 17 - Pianta 3-SI: necrosi bruna formatasi dalla ferita 17 (a sinistra) e dalla ferita 25 (a destra)

**Pianta 4 - Siena**

In questa pianta di vite non sono state osservate alterazioni nella radice. Nel punto d'innesto, invece, è stata osservata la presenza di legno bruno rosso e di zone molto scure intorno al midollo, alterato a sua volta. Da 3 ferite nel punto d'innesto si sono sviluppate necrosi brune, quasi nere, che hanno abbondantemente invaso il legno e dalle quali si dipartivano nel legno sano delle striature nere (fig. 18).

Nella cultivar sono state osservate solo poche striature nere che sono risultate provenire dalle infezioni presenti nel punto d'innesto. Le striature si estendevano, comunque solo per 4-5 cm dal punto d'innesto verso l'alto.

Tab. 7 - Alterazioni del legno osservate in corrispondenza delle ferite di potatura della pianta 3 - Siena							
Pianta 3 - Siena	Porzione (cm)	n. ferite totali	n. ferite cicatrizzate	n. ferite contaminate	Estensione dell'alterazione <sup>1</sup>		Alterazioni del legno
					cm	n.	
Portinnesto	da -24 a -12	1	1	0	< 0,5	0	—
					0,5 - 3	0	—
					> 3	0	—
Punto d'innesto	da -7 a 2,5	5	1	4	< 0,5	2	NB*
					0,5 - 3	1	NB, STN
					> 3	1	NB, STN
Cultivar: fusto verticale	da 7 a 73,5	4	1	3	< 0,5	0	—
					0,5 - 3	1	NB
					> 3	2	NB*, STN*
Cultivar: cordone orizzontale	da 80 a 153	31	14	17	< 0,5	5	NB****, STN***
					0,5 - 3	6	NB****, STN*, CB, CR
					> 3	6	NB****, STN****, STB***, BR

Tab. 8 - Alterazioni del legno osservate in corrispondenza delle ferite di potatura della pianta 4 - Siena							
Pianta 4 - Siena	Porzione (cm)	n. ferite totali	n. ferite cicatrizzate	n. ferite contaminate	Estensione dell'alterazione <sup>1</sup>		Alterazioni del legno
					cm	n.	
Portinnesto	da -15 a -4	0	1	0	< 0,5	0	—
					0,5 - 3	0	—
					> 3	0	—
Punto d'innesto	da -4 a 3	5	0	5	< 0,5	1	NB
					0,5 - 3	1	NB
					> 3	3	NB**, BR**, STN**
Cultivar: fusto verticale	da 4 a 80	6	3	3	< 0,5	1	NB, STN
					0,5 - 3	2	NB*, STN*
					> 3	0	—
Cultivar: cordone orizzontale	da 86,5 a 150	23	16	7	< 0,5	2	NB*, STN*
					0,5 - 3	3	NB*, STN*
					> 3	2	NB*, STN*

<sup>1</sup> Numero di ferite che presentano alterazione del legno attribuibili a colonizzazione fungina in ciascuna categoria (< 0,5, 0,5-3; > 3 cm). STN = striature nere; STB = striature brune; NB = necrosi brune; CB = carie bianca; BR = legno bruno-rosso.

<sup>1</sup> Numero di ferite che presentano alterazione del legno attribuibili a colonizzazione fungina in ciascuna categoria (< 0,5, 0,5-3; > 3 cm). STN = striature nere; STB = striature brune; NB = necrosi brune; CB = carie bianca; BR = legno bruno-rosso.



Fig. 18 - Pianta 4-SI: punto d'innesto



Fig. 19 - Pianta 5-SI: infezioni da Pch e Fmed nell'oggetto (a sinistra) e nel soggetto (a destra)

Nel cordone speronato sono state osservate 7 ferite con segni di colonizzazione fungina. Tuttavia, solo una di queste ferite era sede di una profonda alterazione, dalla quale si originavano striature brune e nere che proseguivano verso il basso per circa 15 cm.

**Pianta 5 - Siena**

Questa pianta ha presentato alterazioni tali, riconducibili a infezioni miste di *Cylindrocarpon destructans*, *Eutypa lata*, *Phaeoaniella chlamydospora*, *Fomitiporia mediterranea* e *Phaeoacremonium aleophilum* (fig. 19), che non hanno consentito di ricavare utili indicazioni circa le infezioni che avrebbero potuto dare origine ai sintomi fogliari di esca.

**Pianta 6 - Siena**

Nella zona sotto il punto d'innesto è stata riscontrata la presenza di una ferita che ha dato origine a una necrosi bruna dalla quale si sono sviluppate delle striature brune e nere che si sono diffuse verso il basso per oltre 10 cm. Inoltre, al di sotto della ferita è stata osservata la presenza di gomme nere tutto intorno al midollo (fig. 20).

A livello del punto d'innesto è stata notata la presenza di midollo alterato con la prima



Fig. 20 - Pianta 6-SI: ferite 2 e 4 nel punto d'innesto

cerchia di legno intorno a esso completamente imbrunita. In questa zona erano presenti anche 3 ferite due delle quali con ampie necrosi e segni di contaminazione fungina.

Lungo il fusto sono state riscontrate numerose ferite, 9 delle quali con segni di contaminazione fungina e alterazioni del legno che si estendevano in qualche caso per oltre 6,5 cm.

Numerose ferite da potatura erano presenti anche sul cordone speronato e abbondante era la presenza di punteggiature e striature brune, specialmente nell'ultimo tratto del cordone. Anche in questa pianta non è stata osservata la presenza di carie bianca.

**Tab. 9 - Alterazioni del legno osservate in corrispondenza delle ferite di potatura della pianta 6 - Siena**

Pianta 6 - Siena	Porzione (cm)	n. ferite totali	n. ferite cicatrizzate	n. ferite contaminate	Estensione dell'alterazione <sup>1</sup>		Alterazioni del legno
					cm	n.	
Portinnesto	da -26 a -5	1	0	1	< 0,5	0	—
					0,5 - 3	0	—
					> 3	1	NB, STN, STB
Punto d'innesto	da -5 a 1	3	1	2	< 0,5	0	—
					0,5 - 3	2	NB*, STN*, STB
					> 3	0	—
Cultivar: fusto verticale	da 1 a 80	12	3	9	< 0,5	1	STN
					0,5 - 3	1	NB
					> 3	7	NB****, STN*****, STB*, BR
Cultivar: cordone orizzontale	da 80 a 150	30	11	19	< 0,5	5	NB, STN***
					0,5 - 3	7	NB**, STN*****, STB*
					> 3	7	NB*, STN****, STB****, BR

<sup>1</sup> Numero di ferite che presentano alterazione del legno attribuibili a colonizzazione fungina in ciascuna categoria (< 0,5, 0,5-3; > 3 cm). STN = striature nere; STB = striature brune; NB = necrosi brune; CB = carie bianca; BR = legno bruno-rosso.

I risultati degli isolamenti di funghi, effettuati sul materiale esaminato, ha evidenziato la presenza di *Pch*, in particolare nelle striature nere (percentuale di isolamento del 10,4%). Non è stata invece riscontrata la presenza di *Pal* il quale, insieme a *Pch*, si è visto causare, in altre situazioni, alterazioni del legno molto simili a quelle qui descritte.

Dalle necrosi brune, di consistenza dura, sono stati invece isolati, com'era da attendersi, principalmente specie di Botryosphaeriaceae e occasionalmente *Eutypa lata*.

### II.1.5 Conclusioni

Nel complesso i dati raccolti nei due vigneti oggetto delle prove hanno mostrato l'esistenza nel legno e nel midollo del materiale di vite esaminato di alterazioni colonizzate dal fungo tracheomicotico *Pch* e, talvolta, anche da *Fmed*. Tuttavia, a fronte delle numerose ferite rilevate solo una piccola percentuale di esse è apparsa colonizzata da funghi patogeni. Ciò significa, evidentemente, che l'infezione delle ferite, anche non protette con mastici, non è un evento inevitabile.

La presenza di *Fmed* e *Pch* nelle piante esaminate è sembrata risalire a più fonti di infezione: 1. infezioni da *Pch* del portinnesto già prima dell'impianto; infezioni da *Pch* da ferite di potatura e/o spollonatura; 2. infezioni da *Fmed* (per lo più nella zona dell'innesto), invece che su grossi tagli di potatura come normalmente si rileva nei vigneti adulti, a livello di ferite create con il taglio dei polloni di un anno. Dai punti di ingresso *Pch* si è sviluppato verso il basso e verso l'alto, lungo i vasi, mentre *Fmed* è rimasto localizzato, estendendosi lentamente, nella zona di infezione.

Di interesse sono apparsi altri due fatti: l'assenza di carie bianca in piante con sintomi fogliari di esca; la comparsa di sintomi fogliari in piante con una modesta alterazione dei tessuti. Il primo fatto suggerisce l'estraneità di *Fmed* alla formazione dei sintomi fogliari; il secondo, conferma l'assenza di correlazione, verificata su piante adulte, tra intensità dei sintomi interni e intensità dei sintomi sulla chioma. Questo fatto pone tuttavia un interrogativo: è possibile che una così piccola quantità di tessuti alterati possa essere sufficiente per provocare i sintomi sulle foglie? La risposta, comunque da verificare, è per il momento da ricercarsi nella capacità di *Pch* di produrre fitotossine che, via corrente linfatica, vanno ad accumularsi nelle foglie fino a una concentrazione tale da causare poi le note tigrature.

I dati qui esposti hanno dunque confermato l'esistenza dell'esca giovane e, quindi, indirettamente, il ruolo, eventuale, di *Pch* (e *Pal*) nella formazione dei sintomi fogliari.

## II.2 Origine e sviluppo nel tempo delle infezioni di *Phaeomoniella chlamydospora* e *Phaeoacremonium aleophilum*: dal vivaio al campo

G. Marchi\*, L. Mugnai, G. Surico

### II.2.1 Introduzione

La necessità di chiarire l'eziologia del deperimento di giovani piante di vite (malattia di Petri o "black goo") ha spostato l'attenzione dei ricercatori sul materiale di propagazione della vite e sui funghi tracheomicotici dell'esca, e poi anche sulle piante madri. Le prime indagini sono state svolte in Toscana dove è stato accertato che barbatelle pronte per essere messe a dimora potevano presentare striature brune longitudinali, talvolta estese per quasi tutta la lunghezza della barbatella oppure concentrate al piede della barbatella o nella zona dell'innesto, colonizzate da *Phaeomoniella chlamydospora* (*Pch*) e *Phaeoacremonium aleophilum* (*Pal*) (Bertelli *et al.*, 1998). Il dato è stato poi confermato da vari laboratori (*tab. 1*) (☞ anche *cap. II.5*).

Successivamente è stato osservato che diverse operazioni in vivaio erano a rischio di infezione da parte dei due funghi prima menzionati (Ridgway *et al.*, 2002; Retief *et al.*, 2006; Edwards *et al.*, 2007a; Pollastro *et al.*, 2009). Infine, è stato anche accertato che *Pch* e *Pal* potevano essere presenti già nei tralci delle piante madri, fatto non sorprendente visto che i due funghi di cui si tratta colonizzano i vasi della pianta e possono, quindi, essere trasportati verso l'alto dalla corrente linfatica (*tab. 2*).

Questi e altri ritrovamenti hanno permesso di disegnare un possibile schema che riassume l'inizio e l'evoluzione delle sindromi associate al mal dell'esca (*fig. 1*).

**Tab. 1 - Percentuale di isolamento di *Pch* da barbatelle o portinnesto**

Matrice vegetale	Percentuale di isolamento	Paese	Riferimento
Barbatelle	0-80%	Italia	Bertelli <i>et al.</i> , 1998 Surico <i>et al.</i> , 1998
Portinnesto	7,5-38,4%	Portogallo	Rego <i>et al.</i> , 2000
Barbatelle	limitata da 20 a 60%	Italia	Zanzotto <i>et al.</i> , 2001
Barbatelle	12%	Italia	Sidoti <i>et al.</i> , 2001
Barbatelle e portinnesto	0-37%	California	Stamp, 2001
Talee autoradicate	30%	Australia	Laukart <i>et al.</i> , 2001

\* Università di Firenze email: guido.marchi@unifi.it

Tab. 2 - Presenza di <i>Pch</i> e/o <i>Pal</i> nei tralci di piante madri			
Matrice vegetale	Percentuale di isolamento	Paese	Riferimento
Tralcio di 1 anno	0,15-0,38% <i>Pch</i> 0,44-2,5% <i>Pal</i>	Francia	Larignon e Dubos, 2000
Tralcio di 1 anno	0-6% <i>Pal</i> 2-19% <i>Pch</i>	Australia	Edwards <i>et al.</i> , 2004a
Moncone	2,5-9,7%	Sud Africa	Fourie e Halleen, 2004

### II.2.2 Trasferimento dell'infezione dal vivaio al campo

I tralci delle piante madri possono dunque ospitare i funghi tracheomicotici dell'esca, *Pch* e *Pal* (fig. 1, punto 2), oltre, naturalmente, ad altri funghi e batteri. Da questo materiale, a meno di interventi risananti (un qualche effetto si può ottenere mediante trattamento con acqua calda), non potranno che derivare barbatelle infette (fig. 1, punto 8) e portanti quella che è stata chiamata "malattia delle venature brune" (punto 7) (per la descrizione, *cap. II.1*). Le barbatelle così ammalate daranno necessariamente origine, una volta in campo, a piante infette le quali potranno manifestare più tardi i sintomi della cosiddetta malattia di Petri (punto 15), e più tardi ancora, o in alternativa, quelli fogliari dell'esca giovane (punto 11). Si è detto potranno perché in realtà, finora, si è potuto dimostrare una certa correlazione fra barbatella infetta e malattia di Petri, ma non fra barbatella infetta ed esca giovane nonostante ripetuti esperimenti al riguardo. Le ragioni alla base di questo insuccesso sono forse da ricercare nella multifattorialità del sistema il quale appare condizionato, oltre che da fattori ambientali, dalla probabile natura endofitica di *Pch* e *Pal* e dalle capacità reattive delle piante di vite. Le cose potrebbero stare più o meno così: nei tessuti legnosi della barbatella *Pch* e *Pal* mantengono, per loro stessa natura, uno stato di vita endofitica, vale a dire spiccatamente saprofitaria, oppure sono costretti in uno stato ipobiotico perché parzialmente sopraffatti dalla reazione di difesa dei tessuti della pianta prossimi a quelli direttamente colonizzati. Più tardi (e il tempo non si sa ancora quantificarlo: 1, 2, o più anni) e in virtù di fenomeni ancora ignoti, *Pch* e *Pal* escono dallo stato endofitico-ipobiotico ed entrano in uno patogenico, attivo. Da questo momento in poi si svilupperanno le azioni che porteranno, infine, alla comparsa dei sintomi fogliari. Le ipotesi appena esposte sono non solo ragionevoli da un punto di vista fitopatologico ma anche sostenute da qualche riscontro sperimentale. Ad esempio, alcuni elementi (produzione di metaboliti con bassa attività fitotossica; ridotti livelli di produzione di enzimi pectinolitici; corredo enzimatico non molto versatile; lento accrescimento su substrati artificiali; lenta progressione nell'ospite) sembrano portare a una qualificazione di *Pch* e *Pal* come deboli parassiti o come patogeni poco aggressivi (organismi che vivono come saprofiti e che solo in particolari condizioni conducono vita parassitaria); inoltre, la pianta effettivamente reagisce alla presenza dei due funghi con reazioni difensive (Troccoli *et al.*, 2001; Amalfitano *et al.*, 2000, 2004 e *cap. IV.8 in questo volume*) eventualmente capaci di rallentarli se non di bloccarli, almeno temporaneamente e, forse, in qualche

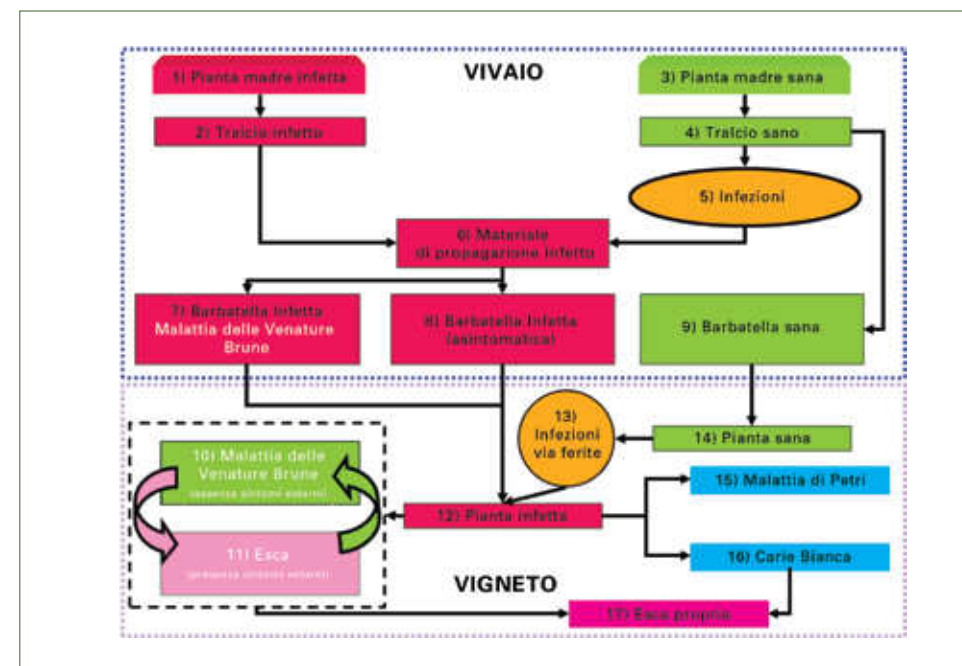


Fig. 1 - Schema illustrativo dello sviluppo in vivaio e in campo, delle sindromi associate al mal dell'esca

caso, addirittura definitivamente. Infine, non si deve neanche trascurare il fatto che i sintomi fogliari sono erratici, compaiono in un anno e scompaiono in altri ed è molto probabile che siano più lenti a comparire nelle piante giovani. Un esempio al riguardo: da un vigneto di Sangiovese di 3 anni sono state spiantate (febbraio 2006) e trasferite in grossi vasi 19 piante che avevano mostrato per la prima volta sintomi fogliari di esca nel 2005. Delle 19 piante solo una ha rimaniestato chiari sintomi di esca nei tre anni successivi: 2006, 2007 e 2008. Se, dunque, la pianta in campo dovesse rimanere asintomatica la diremo semplicemente ancora affetta dalla malattia delle venature brune (punto 10), la stessa riscontrata nelle barbatelle. Se, invece, dovesse manifestare sintomi di deperimento si parlerà di malattia di Petri (punto 15). Infine, se la pianta mostrerà sintomi fogliari tigrati, parleremo di esca giovane (o semplicemente esca o malattia delle foglie striate) (punto 11). Naturalmente, in una o l'altra di queste fasi potrà insediarsi nella pianta anche *Fomitiporia mediterranea*. A una o l'altra delle affezioni prima menzionate si aggiungerà allora la carie bianca del legno (punto 16) e diremo che la pianta è affetta dall'esca propria.

Agli stessi risultati si potrà giungere anche nel caso in cui i tralci prelevati dalle piante madri fossero sani. Infatti, qualora si verificasse questa favorevole circostanza, che dovrebbe essere la regola, potremmo comunque avere infezioni in vivaio (punto 5) o, in mancanza di esse, infezioni in campo (punto 13). A quest'ultimo riguardo è stato accertato (*cap. II.1*) che ogni ferita sulla pianta, quindi già i primi tagli effettuati per allevare la vite o per eliminare i primi

polloni, rappresenta una via di penetrazione dei funghi dell'esca. Una volta penetrati nella pianta, questi funghi daranno inizio al ciclo infettivo che si concluderà, prima o poi, con la comparsa di sintomi interni e sintomi esterni. Quando questi sintomi si saranno sufficientemente aggravati o dopo che la pianta avrà manifestato i sintomi fogliari dell'esca per un certo numero di anni (magari consecutivamente fino a spossare la pianta) potranno comparire i colpi apoplettici che, nella maggioranza dei casi, segnano la fine della pianta e, quando numerosi anno dopo anno, dello stesso vigneto.

### II.2.3 Conclusioni

L'evoluzione nel tempo delle varie affezioni che ricadono sotto il nome, ormai generico, di mal dell'esca, così come rappresentato nello schema della *fig. 1*, si basa su diversi riscontri sperimentali e su un certo numero di ciò che potremmo chiamare "indizi sperimentali". Ed è su indizi sperimentali e ragionevoli ipotesi che si basa per ora il passaggio al momento più critico: quello dalla barbatella infetta alla pianta ammalata in campo. Tutto il resto è largamente dimostrato.

Gli sforzi della ricerca vanno dunque concentrati sul passaggio dal vivaio al campo partendo comunque da una certezza o quasi: *Phaeoconiella chlamydospora* e *Phaeoacremonium aleophilum* sono due funghi patogeni riconosciuti responsabili della tracheomicosi della vite, che altro non è se non l'esca. Se questi funghi colonizzano una barbatella, questa deve considerarsi ammalata fino a prova contraria. Va però anche detto che da qualche parte (Eskalen *et al.*, 2007) si suggerisce di accettare il fatto che una barbatella possa essere infetta perché quando anche arrivasse sana in vigneto le occasioni di infezioni sono al momento tali e tante che quella che parte dal vivaio appare ininfluenza ai fini del successo sanitario della pianta. Posizione in contrasto con i principi basilari della medicina di qualunque organismo vivente.

## II.3 Il materiale di moltiplicazione della vite e il possibile ruolo nella trasmissione dei funghi associati al mal dell'esca

S. Pollastro\*, W. Habib, A. Pichierri, M.A. Mannoni, D. Bellotto, G. Lucchetta, G. Dal Cortivo, S. Serra, M. Borgo, F. Faretra

### II.3.1 Introduzione

In Italia, la superficie investita a vigneto è di 766,2 mila ettari, con una produzione di uva che ammonta a circa 7,5-7,8 milioni di tonnellate; nell'annata 2007 sono stati prodotti 6.140.387 tonnellate di uva da vino e 1.449.729 tonnellate di uva da tavola (ISTAT, 2007).

L'impianto del vigneto costituisce un punto critico del processo produttivo, non solo per ciò che attiene agli aspetti legati alla scelta e all'utilizzo delle varietà di vite, ma anche per le possibili influenze negative sulla qualità determinate dai numerosi microrganismi ed entità patogene trasmissibili proprio con il materiale di propagazione. Gli aspetti genetici e fitosanitari hanno rilevante importanza per il miglioramento qualitativo del materiale di propagazione viticolo.

Il vivaismo viticolo si è sviluppato in Italia intorno alla metà dell'Ottocento a seguito della devastante introduzione della fillossera dall'America, pericoloso parassita che distrusse gran parte dei vigneti europei, ponendo l'intero comparto viticolo in serie difficoltà economiche.

L'invasione fillosserica ha determinato il ricorso all'impiego di viti americane, usate come portinnesti, comportando interventi di innesto tra piede americano e vitigni europei e rivoluzionando così la storica tecnica viticola. La tecnica dell'innesto era, infatti, utilizzata solo per rendere produttivi ceppi sterili o quasi sterili o per "ringiovanire" vecchie viti, ma non era considerata una tecnica di propagazione. La vite europea (*Vitis vinifera* L.) era coltivata franca di piede ed era ottenuta per propagazione o per talea. Inizialmente, le viti americane appartenevano a specie "pure" (oppure "viti da seme selezionate"), quali *Vitis riparia* L., *Vitis rupestris* L., *Vitis berlandieri* L. ecc., e vennero sottoposte a prove di coltivazione. Il loro impiego rivelò ben presto come certe attitudini non consentissero di considerare risolto il problema della ricostruzione viticola, poiché l'innesto non sempre era compatibile con le diverse condizioni pedoclimatiche. Per soddisfare la necessità di ampliare la disponibilità di portinnesti per renderne possibile la coltivazione nei differenti ambienti, si fece ricorso all'ibridazione artificiale fra viti "pure" e vitigni nord-americani da utilizzare direttamente come portinnesti o piante parentali nel lavoro di ibridazione. Sono stati così prodotti vari ibridi di portinnesti, incrociando tra loro *V. berlandieri* × *V. riparia*, *V. berlandieri* × *V. rupestris* ecc. Nacquero, quindi, i primi vivai viticoli per la moltiplicazione di viti americane e di loro ibridi e per la produzione di talee e barbatelle da usare come portinnesti per vitigni europei o come ibridi produttori diretti. I nuovi ottenimenti, oltre a essere maggiormente resistenti alle principali ampelopatie, hanno mostrato di indurre vigore vegetativo alle piante bimembri.

\* Università di Bari email: stefania.pollastro@agr.uniba.it

In Italia, l'attività vivaistica si è diffusa su tutto il territorio nazionale e, con il passare degli anni, ha acquisito una consolidata importanza economica. A partire dagli anni cinquanta, il settore vivaistico ha visto un consistente ampliamento sia in termini di superfici investite a piantonai di piante madri portinnesto (PMP) e a impianti di vitigni europei per la produzione di marze (PMM) sia in termini di numero aziende. L'attività vivaistica si è tradotta anche in un'importante evoluzione e trasformazione delle tecniche di produzione di materiale di moltiplicazione della vite che sono state progressivamente migliorate con vantaggi dal punto di vista quali-quantitativo dei prodotti ottenuti.

In particolare per l'uva da vino, un esempio concreto è l'utilizzo all'impianto di barbatelle innestate a tavolino che ha soppiantato l'utilizzo di barbatelle franche da innestare a spacco o a gemma in campo. Dal 1971 al 2007, la produzione di barbatelle franche è fortemente diminuita e oggi i circa 21 milioni di piante commercializzate equivalgono al 25% di quelle prodotte trent'anni fa; al contrario, nello stesso periodo è raddoppiata la produzione di materiale innestato (98 milioni di pezzi, dati ISPERSVIT, 2007).

### II.3.2 Evoluzione delle norme per la produzione e commercializzazione del materiale di propagazione della vite

L'immissione in commercio del materiale di moltiplicazione viticolo è soggetta al rispetto della normativa europea e nazionale vigente, che è volta a garantirne la rispondenza genetica e sanitaria.

Delle diverse norme che si sono susseguite nella regolamentazione della commercializzazione dei materiali di moltiplicazione vegetativa della vite, la prima in termini temporali, nonché la più nota, è la Direttiva 68/193/CEE del Consiglio, recepita in Italia dal DPR 24 dicembre 1969 n. 1164 "Norme sulle produzioni e sul commercio dei materiali di moltiplicazione vegetativa della vite". Tale norma e le successive modifiche sono state il riferimento in materia di commercializzazione del materiale vivaistico sino al 14 febbraio 2002, quando è stata emanata la Direttiva 2002/11/CE del Consiglio che contestualmente modificava la Direttiva 68/193/CEE e abrogava la Direttiva 74/649/CEE. Con il DM 8 febbraio 2005 (G.U. n. 82 del 9 aprile 2005) "Norme di commercializzazione dei materiali di moltiplicazione vegetativa della vite" la Direttiva CE è stata recepita in Italia e ora costituisce la norma principale in materia di certificazione e di commercializzazione della vite. Nel Decreto sono, fra l'altro, definiti all'art. 2 "i materiali di moltiplicazione": *a*) piante di vite: barbatelle franche (frazioni di sarmenti o di tralci erbacei di vite, radicati e non innestati, destinati a essere piantati franchi o a essere impiegati come portinnesto) e le barbatelle innestate (frazioni di sarmenti o di tralci erbacei di vite, uniti mediante innesto la cui parte sotterranea è radicata); *b*) parti di piante di vite: sarmenti (tralci di un anno); tralci erbacei (tralci non lignificati); talee di portinnesto (frazioni di sarmenti o di tralci erbacei di vite, destinate a formare la parte sotterranea nella preparazione delle barbatelle innestate); nesti (frazioni di sarmenti o di tralci erbacei di vite, destinati a formare la parte aerea nella preparazione delle barbatelle innestate o per gli innesti sul posto); talee da vivaio (frazioni di sarmenti o di tralci erbacei di vite, destinati alla produzione di barbatelle franche); *c*) vigneti di viti-madri: colture di viti destinate alla produzione

di talee di portinnesto, di talee di vivaio o di nesti; *d*) vivai di viti: colture di viti destinate alla produzione di barbatelle franche o innestate. Inoltre, con materiali di moltiplicazione iniziali si indicano i materiali prodotti sotto la responsabilità del costituente secondo metodi di norma ammessi per il mantenimento dell'identità della varietà e, se del caso, del clone, nonché a fini di prevenzione di malattie; destinati alla produzione di materiali di moltiplicazione di base o di materiali di moltiplicazione certificati; conformi alle condizioni degli allegati I e II per i materiali di moltiplicazione di base; e per i quali, all'atto di un esame ufficiale, sia stata constatata la rispondenza alle condizioni summenzionate. Materiali di moltiplicazione di base sono i materiali prodotti sotto la responsabilità del costituente secondo metodi di norma ammessi per il mantenimento dell'identità della varietà e, se del caso, del clone, nonché a fini di prevenzione di malattie, e provenienti direttamente da materiali di moltiplicazione iniziali per via vegetativa; destinati alla produzione di materiali di moltiplicazione certificati; conformi alle condizioni degli allegati I e II per i materiali di moltiplicazione di base e per i quali, all'atto di un esame ufficiale, sia stata constatata la rispondenza alle condizioni summenzionate. Materiali di moltiplicazione certificati sono i materiali che provengono direttamente da materiali di moltiplicazione di base o da materiali di moltiplicazione iniziali; sono destinati alla produzione *a*) di piante o di parti di piante che servono alla produzione di uve, *b*) ovvero alla produzione di uve; conformi alle condizioni degli allegati I e II per materiali di moltiplicazione certificati; e per i quali, all'atto di un esame ufficiale, sia stata constatata la rispondenza alle condizioni summenzionate. Materiali di moltiplicazione standard sono quelli che presentano l'identità e la purezza della varietà e sono destinati alla produzione *a*) di piante o di parti di piante che servono alla produzione di uve, *b*) ovvero alla produzione di uve; conformi alle condizioni degli allegati I e II per i materiali di moltiplicazione standard; e per i quali, all'atto di un esame ufficiale, sia stata constatata la rispondenza alle condizioni summenzionate.

Con il succitato decreto sono anche stati istituiti il Servizio Nazionale di Certificazione della Vite (art. 3) che rappresenta l'organismo responsabile a livello nazionale dei materiali di moltiplicazione della vite, e il Registro Nazionale delle varietà di viti (art. 10) il cui materiale di moltiplicazione è ammesso al controllo ufficiale e alla certificazione, nonché stabilisce le norme relative al controllo dei materiali di moltiplicazione di categoria certificato e standard (art. 12).

Il DM del 7 luglio 2006 (G.U. n. 211 dell'11 dicembre 2006), pubblicato a recepimento della direttiva n. 2005/43/CE della Commissione del 23 giugno 2005, modifica gli allegati dell'originaria direttiva n. 68/193/CEE del Consiglio. Oltre alle norme di carattere generale su identità e purezza della varietà, all'art. 3 è precisato che "il suolo o, se del caso, il substrato di coltura non devono essere contaminati da organismi nocivi o loro vettori, in particolare nematodi, che trasmettono alcuni agenti di malattie virali e che le viti-madri e i vivai sono piantati in condizioni atte ad evitare ogni rischio di contaminazione da organismi nocivi". È, inoltre, fatto obbligo di mantenere la presenza di organismi nocivi nel limite più ridotto possibile (art. 4) e in particolare le viti devono essere esenti da: *a*) agenti causali del complesso della degenerazione infettiva della vite [virus dell'arricciamento della vite (GFLV) e virus del mosaico dell'Arabis (ArMV)]; *b*) agenti causali del complesso dell'accartocciamento fogliare della vite [virus 1 associato all'accartocciamento fogliare della vite (GLRaV-1) e virus 3 associato all'accartocciamento fogliare della vite (GLRaV-3)]; *c*) agente causale del



complesso del legno riccio: virus A della vite (GVA); *d*) agente causale della maculatura infettiva della vite: virus della maculatura infettiva della vite (GFkV) (soltanto per i portinnesti) secondo quanto definito all'art. 5.

L'allegato II del succitato decreto definisce, invece, le condizioni relative ai materiali di moltiplicazione e in particolare stabilisce che questi devono avere una purezza tecnica minima del 96%. Impurità tecniche sono: *a*) i materiali di moltiplicazione disseccati totalmente o in parte, anche dopo immersione in acqua; *b*) i materiali di moltiplicazione avariati, contorti o con lesioni, danneggiati dalla grandine o dal gelo, schiacciati o rotti; *c*) i materiali che non hanno raggiunto un adeguato stato di maturità del legno. Inoltre, la presenza di organismi nocivi che riducono il valore di utilizzazione dei materiali di moltiplicazione deve mantenersi nel limite più ridotto possibile e i materiali di moltiplicazione che presentano segni o sintomi evidenti attribuibili a organismi nocivi per i quali non vi sono trattamenti efficaci devono essere eliminati.

Le talee di portinnesto e i nesti possono essere commercializzati quando le dimensioni sono da 6,5 a 12 mm di diam all'estremità più piccola e 15 mm massimo all'estremità più grossa, salvo che si tratti di marze (nesti) per innesto a dimora. Per le talee da vivaio il diametro minimo all'estremità più piccola non può essere inferiore a 3,5 mm.

Per le barbatelle franche il diametro al centro del meritallo, sotto la cacciata superiore e secondo l'asse più lungo, deve essere almeno uguale a 5 mm, mentre la lunghezza dal punto inferiore di inserzione delle radici alla giuntura della cacciata superiore deve essere almeno di 30 cm per le barbatelle franche destinate a essere innestate, a eccezione di quelle destinate alla Sicilia, per le quali la lunghezza può essere di 20 cm, così come per le altre barbatelle franche. Nel caso di barbatelle innestate, la lunghezza deve essere di almeno 20 cm e ogni pianta deve presentare una saldatura adeguata, regolare e solida. Ogni pianta, poi, deve avere almeno tre radici bene sviluppate e opportunamente ripartite, a eccezione di 420A che può avere anche due sole radici ben sviluppate, purché opposte.

Tutto il processo di controllo viene applicato nel rispetto delle normative europee e nazionali; esso è destinato a verificare e a monitorare l'intera filiera di produzione vivaistica per consentire il rilascio della certificazione di qualità, prescritta sia per il materiale destinato al vivaio sia per quello destinato alla formazione dei nuovi vigneti.

### II.3.3 Processo di produzione del materiale di propagazione della vite

Il processo di produzione del materiale di moltiplicazione delle vite è piuttosto articolato e complesso, presentando peraltro diversi adattamenti in relazione all'areale considerato. Alcune fasi del processo possono, tuttavia, essere ben identificate e sono di seguito brevemente descritte.

#### *Costituzione e gestione dei vigneti di viti madri (piononai di piante madri)*

I piononai di piante madri (PM) servono alla coltivazione di viti selvatiche (PMP) o di varietà europee (PMM), rispettivamente destinate alla produzione di talee di portinnesto o di marze da innesto. Gli impianti vengono distinti in varie categorie in funzione della destinazione dei materiali da essi ricavati: piononai di categoria Base, viene prodotto a

partire dal materiale di moltiplicazione iniziale, depositato presso il costitutore del clone, mediante coltura in apposite strutture protette, da cui si ottengono materiali di moltiplicazione (cartellino bianco) destinati alla costituzione di piononai di categoria Certificato, presso imprese vivaistiche in condizioni di pieno campo. Da questi impianti vengono raccolti i materiali da innesto destinati alla produzione di barbatelle commerciali (cartellino azzurro) per la costituzione dei nuovi vigneti produttivi. Per varietà europee prive di cloni o con poco materiale clonale, esiste ancora la possibilità di disporre di materiale di categoria Standard (cartellino giallo), prodotto con marze raccolte da piononai di PMM, comunque denunciati ai fini della certificazione di qualità. Come sopra indicato, i materiali di moltiplicazione e propagazione viticola devono rispondere ai requisiti richiesti dai DM 8 febbraio 2005 e 7 luglio 2006, che riguardano sostanzialmente la rispondenza genetica della varietà e l'esenzione delle principali e più dannose malattie da virus.

I vigneti di PM sono generalmente gestiti applicando le pratiche agronomiche e le norme fitosanitarie correnti nell'areale.

#### *Preparazione e conservazione di talee portinnesto da vivaio e da innestare a tavolo*

Durante il periodo di riposo vegetativo (dicembre-gennaio), i sarmenti sono tagliati al punto di contatto con la ceppaia delle piante madri portinnesto e portati nei locali per la preparazione delle talee. Le talee sono quindi selezionate in base al calibro e destinate alla produzione di barbatelle franche (calibro 4-8 mm) o di barbatelle innestate (calibro > 8 mm) e dimensionate in lunghezza, le prime hanno in genere una lunghezza compresa fra 30 e 50 cm, per le seconde, invece, la lunghezza è di circa 40 cm. Le talee da vivaio, destinate cioè alla produzione di barbatelle franche, sono meccanicamente private delle gemme ("sgemmatura") a eccezione di quella basale e apicale; prima di essere conservate sono, in genere, "paraffinate" mediante immersione dell'apice per circa 20 cm in paraffina pre-riscaldata a 75°C; la solidificazione è accelerata mediante immersione per pochi secondi in acqua fredda. Gli spezzoni vengono, quindi, riuniti in mazzi, coperti con teli di polietilene dello spessore di 0,8 mm e tenuti in cella frigorifera a 4±2°C sino all'impianto in barbatellaio. Le talee da portinnesto, invece, conservano solo la gemma basale e, dopo il confezionamento in mazzi, sono direttamente conservate negli stessi ambienti refrigerati senza la preventiva operazione di paraffinatura.

#### *Preparazione e conservazione delle marze*

I nesti sono ottenuti da tralci prelevati da campi di piante madri. I legni raccolti durante l'inverno, prima di essere lavorati, vengono tenuti in locali freddi e umidi. Al tempo opportuno viene effettuata la "spezzonatura" per ricavare le marze provviste di una gemma e una porzione del sottostante meritallo; queste vengono immerse in una sospensione fungicida (in genere thiofanate methyl) per circa 2 ore e, quindi, conservate in buste di cellophan in cella frigorifera a 4°C.

#### *Preparazione di innesti-talee*

Prima di eseguire l'innesto, talee da portinnesti e marze sono poste in vasche e immerse completamente in acqua o in una sospensione di fungicida per 12-24 ore al fine di favorire l'idrata-

zione dei tessuti. Gli innesti sono effettuati a tavolo, utilizzando macchine innestatrici con taglio a doppio incastro o a omega; l'unione dei due bionti dà, quindi, origine agli innesti-talea; questi sono immersi in paraffina a 75°C, a partire dal nastro fino a circa 10 cm al di sotto del punto di innesto, allo scopo di tenere aderenti i due bionti, favorire la differenziazione del callo di cicatrizzazione e proteggere i tessuti da avversità biotiche e abiotiche. In genere, in questa fase è impiegata paraffina addizionata di basse concentrazioni di fungicidi ad ampio spettro.

#### **Forzatura del callo di saldatura**

Per la formazione e la successiva fusione del callo di saldatura, gli innesti-talea vengono posti in ambiente controllato a circa 30°C con alta umidità relativa. Esistono varie tecniche di forzatura, che si sono evolute nel corso degli ultimi 10 anni. La tecnica più diffusa consiste nello stratificare, in appositi cassoni di forzatura, gli innesti-talea con segatura di abete rosso di primo uso, inumidita con una sospensione di fungicida ad ampio spettro d'azione (es. thiofanate methyl). Gli innesti-talea sono disposti verticalmente in cassoni, ricoperti con uno strato di segatura. Tecniche innovative prevedono invece l'inserimento degli innesti-talea in contenitori di plastica con immersione della porzione basale (circa 10 cm) in acqua (opportunitamente trattata per evitare mucillagini e muffe) fino a circa 8-10 cm dalla porzione apicale e coperte con un telaio su cui sono stratificati 3-4 cm di segatura. Il materiale è quindi mantenuto per circa 20 giorni in serre riscaldate artificialmente, alla temperatura iniziale di 40°C (due giorni) che viene ridotta di 1°C al giorno fino a raggiungere 20°C, con 80-90% di umidità relativa. L'acqua è sostituita ogni 2-3 giorni e, dopo circa 10 giorni, al momento della schiusura delle gemme, vengono rimossi i telai ed è eseguita la cimatura dei germogli.

#### **Inverdimento del callo di saldatura e selezione degli innesti talea**

Gli innesti-talea sono mantenuti per circa 15 giorni in serra non riscaldata e arieggiata; anche in questa fase il cambio dell'acqua è assicurato ogni 2-3 giorni. Al termine di tale fase si esegue la selezione del materiale vegetale, gli innesti-talea con callo di saldatura non ben differenziato sono eliminati, mentre gli altri sono cimati a lasciare 2-3 cm di germoglio, nuovamente paraffinati e, quindi, mantenuti ancora 1-2 giorni in acqua prima di essere messi a dimora in barbatellaio.

#### **Impianto e gestione del barbatellaio**

Gli innesti-talea sono messi a dimora in barbatellaio per la radicazione; attualmente l'impianto è eseguito a file binate o a singola fila, a una profondità di circa 20 cm con sesto d'impianto 7-8 cm sulla fila, 30 cm tra le file binate e 15-20 cm fra le file, raramente le stesse sono disposte orizzontalmente e sovrapposte, pratica molto in uso fino a circa un decennio fa. Durante la stagione primaverile/estiva si provvede alle operazioni colturali di irrigazione, concimazione e cimature per agevolare l'attività di radicazione degli innesti-talea e la lignificazione dei nuovi tralci. Nel corso della stagione vegetativa vengono effettuati interventi fungicidi e insetticidi per il contenimento delle malattie fungine e degli insetti dannosi e/o vettori di malattie da virus o fitoplasmi. A fine stagione vegetativa, personale adeguatamente formato effettua il controllo in barbatellaio per eliminare le viti che manifestano sintomi di malattie indesiderate.

#### **Espianto del barbatellaio e conservazione delle barbatelle**

All'approssimarsi del periodo freddo (metà di novembre per gli ambienti settentrionali e tra dicembre e gennaio in quelli meridionali), circa sei mesi dopo l'impianto in barbatellaio, le barbatelle sono estirpate, selezionate in base al calibro e al numero di radici sviluppate. Le operazioni di cernita delle barbatelle si completano con una nuova paraffinatura e con il confezionamento in cartoni con film plastico e torba in fasci da 50 per le barbatelle franche e da 25 per le barbatelle innestate e conservate in cella frigorifera fino alla consegna.

### **II.3.4 Imbrunimenti delle barbatelle: possibili cause**

Nell'ultimo ventennio, si è assistito a una rapida diffusione del mal dell'esca e della malattia di Petri in vigneti giovani, perfino di 1-3 anni. La presenza di imbrunimenti del legno che dipartono dal punto d'innesto, ha indotto a supporre che un ruolo importante nell'insorgenza della malattia possa averlo il materiale di propagazione (Graniti, 1960; Cavanni *et al.*, 1987). Questo, infatti, può essere già infetto quando viene prelevato dalle piante madri o essere infettato durante le fasi di preparazione (Bertelli *et al.*, 1998; Scheck *et al.*, 1998a, 1998b; Pascoe e Cottral, 2000; Whiteman *et al.*, 2004) e l'uso di materiale raccolto da piante madri di portinnesti infette può portare a giovani viti infette (Whiteman *et al.*, 2007).

Diversi studi sono stati mirati a verificare la composizione della micoflora fungina in barbatelle e barbatelle innestate mostranti imbrunimenti del legno al momento della commercializzazione.

*Phaeoconiella chlamydospora* (W. Gams, P. Crous, M. J. Wingf. e L. Mugnai) P. Crous & W. Gams, *Phaeoacremonium aleophilum* W. Gams, P. Crous, M.J. Wingf. e L. Mugnai, *Cylindrocarpon* spp., *Diplodia seriata* De Not. e specie di Botryosphaeriaceae sono stati rinvenuti nel materiale di propagazione prodotto in vivaia di diverse aree viticole del mondo. *P. chlamydospora* e *P. aleophilum* sono le principali specie associate al deperimento e/o alla morte delle giovani viti, seguite da specie di Botryosphaeriaceae, *Cylindrocarpon* spp. e *D. seriata*.

*Phaeoconiella chlamydospora* e diverse specie di *Phaeoacremonium* sembrano in grado di produrre infezioni latenti in vivaio (Edwards *et al.*, 2001b, 2004a; Zanzotto *et al.*, 2001; Surico, 1998, 2001; Fourie e Halleen, 2004a; Abbatecola *et al.*, 2006; Pollastro *et al.*, 2007), ma la maggiore frequenza di rinvenimento di *P. chlamydospora* rispetto a *Phaeoacremonium* spp. ha portato a ritenere il primo uno dei patogeni fungini più importanti associati alla malattia di Petri (Ridgway *et al.*, 2002; Edwards e Pascoe, 2004; Fourie e Halleen, 2004a; Gaforio *et al.*, 2005; Giménez-Jaime *et al.*, 2006; Retief *et al.*, 2006; Whiteman *et al.*, 2007).

Diversi ricercatori hanno enfatizzato il ruolo del materiale di propagazione e in particolare delle barbatelle, come una delle principali cause della diffusione di questi patogeni fungini.

*Cylindrocarpon destructans* e *P. chlamydospora* sono stati i funghi prevalentemente isolati da materiale di propagazione in Portogallo (Rego *et al.*, 2000). *P. chlamydospora* e *Phaeoacremonium* spp. sono state le specie prevalentemente isolate da barbatelle e barbatelle innestate in Italia (Zanzotto *et al.*, 2001; Abbatecola *et al.*, 2006; Pollastro *et al.*, 2007). Ridgway *et al.* (2002) hanno confermato la presenza di *P. chlamydospora* in vivaia in Nuova Zelanda;

mentre studi condotti in Sud Africa hanno dimostrato che diversi patogeni del legno, così come *P. chlamydospora*, *Phaeoacremonium* spp. e *Cylindrocarpon* spp. sono spesso presenti in barbatelle pronte per la commercializzazione (Halleen *et al.*, 2003; Fourie e Halleen, 2004). *P. chlamydospora* e *P. aleophilum* sono stati isolati più frequentemente di *Cylindrocarpon* spp., *D. seriata* e specie di Botryosphaeriaceae, comunque presenti, da portainnesti e barbatelle innestate in vivai spagnoli (Giménez-Jaime *et al.*, 2006). Funghi del genere *Cylindrocarpon*, *P. chlamydospora* e specie di Botryosphaeriaceae sono stati, nell'ordine, quelli più diffusi in barbatelle e barbatelle innestate prodotte in Libano (Habib, Pollastro, Choeri, Faretra, dati non pubblicati). *P. chlamydospora* è stata anche rinvenuta in barbatelle innestate prodotte in vivai algerini (Bensadok, 2004; Pollastro e Faretra, dati non pubblicati).

Nel corso delle attività di progetto è stata valutata la presenza dei funghi del legno, con particolare riferimento a *P. chlamydospora*, in materiale di propagazione viticolo prodotto in differenti zone (Puglia, Sardegna, Veneto).

Diversi sono i miceti rinvenuti e non di rado le differenze nella frequenza di rinvenimento sono più da considerare in funzione dell'annata piuttosto che in relazione ad altri aspetti quale, per esempio, l'origine del materiale (Faretra, Borgo e Serra, dati non pubblicati).

*Phaeomoniella chlamydospora* è stata rinvenuta con maggiore frequenza in materiale di propagazione prodotto in Puglia e meno in Sardegna o Veneto; la frequenza di rinvenimento è stata estremamente variabile andando, nella stessa Puglia, da 0 a valori anche superiori all'80%. Di contro, *P. aleophilum* è risultato più frequentemente associato agli imbrunimenti di barbatelle prodotte in Veneto, con una frequenza di rinvenimento che, in taluni casi, ha superato il 60%. Funghi della famiglia delle Botryosphaeriaceae sono stati rilevati con maggiore frequenza in prossimità del punto di innesto, lasciando intravedere un ruolo importante del nastro nella diffusione di tali microrganismi. In corrispondenza del punto di inserzione delle radici, invece, non di rado sono stati isolati funghi del genere *Cylindrocarpon*, con frequenze variabili e che, in taluni casi, sono state superiori al 50%. *Phomopsis viticola* (Sacc.) Sacc., fungo ben noto per la sua capacità di infettare i tralci, è stato rinvenuto nel materiale di propagazione anche quando questo era stato originato da viti che non avevano mostrato in campo sintomi di escoriosi. In nessun caso è stata, invece, rilevata *F. mediterranea* neanche quando le barbatelle erano state ottenute da talee e marze prelevate da viti con estesi processi di carie del legno e con numerosi basidiocarpi del fungo.

### II.3.5 Possibili vie di infezione in vivaio per i funghi del legno

Infezioni sembrano verificarsi in tutte le fasi del processo di propagazione della vite, anche perché le ferite prodotte in tutte le fasi del processo vivaistico sono numerose e costituiscono una via di penetrazione per i funghi del legno (Fourie e Halleen, 2002, 2004; Edwards *et al.*, 2004a).

Piante madri infette e il materiale di propagazione sono considerate fonti di inoculo primarie (Whiteman *et al.*, 2004), come dimostra il rinvenimento di tali miceti in piante madri portainnesto apparentemente sane (Fourie e Halleen, 2004) e marze (Bertelli *et al.*, 1998; Larignon, 1999a; Fourie e Halleen, 2002; Halleen *et al.*, 2003).

*Phaeomoniella chlamydospora* e diverse specie di *Phaeoacremonium*, più di altri miceti, sembrano in grado di produrre infezioni latenti in vivaio e si suppone anche che siano i principali responsabili della malattia di Petri (Edwards *et al.*, 2001b, 2004a; Zanzotto *et al.*, 2001; Surico, 2001b; Fourie e Halleen, 2004). La maggiore frequenza di rinvenimento in marze e talee di *P. chlamydospora* rispetto a *Phaeoacremonium* spp. ha indotto, poi, molti ricercatori ad attribuire al primo un ruolo importante nell'eziologia della malattia di Petri (Ridgway *et al.*, 2002; Edwards e Pascoe, 2004; Fourie e Halleen, 2004; Gaforio *et al.*, 2005; Retief *et al.*, 2006; Whiteman *et al.*, 2007).

Un'intensa attività di ricerca è stata pertanto condotta nel tentativo di individuare i momenti di maggior rischio di infezione di *P. chlamydospora* in vivaio.

Propaguli di *P. chlamydospora* sono stati rinvenuti in tutta la lunghezza di talee di portainnesto (Feliciano e Gubler, 2001; Edwards *et al.*, 2004a) e possono essere trasportati sino ai tralci dalla corrente xilematica in piante madri portainnesto infette (Edwards *et al.*, 2004a).

È stato anche ipotizzato che le barbatelle possano essere infettate in barbatellaio poiché il terreno può essere infestato da clamidospore di *P. chlamydospora* (Bertelli *et al.*, 1998; Feliciano e Gubler, 2001) che consentono al fungo di sopravvivere a lungo (Ferreira *et al.*, 1999; Mugnai *et al.*, 1999). La presenza del micete in terreni di barbatellaio è stata accertata mediante PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (Damm e Fourie, 2005) o *nested*-PCR (Bensadok, 2004; Pollastro e Faretra, dati non pubblicati). Il terreno, pertanto, sembrerebbe una possibile fonte di inoculo di *P. chlamydospora*.

Durante il processo di produzione vivaistico è possibile che *P. chlamydospora* possa infettare la vite in diversi momenti. Una delle prime fasi è quella in cui le talee e i nesti sono conservati e idratati (per 12-24 ore), prima della conservazione in cella frigorifera (Van der Westhuizen, 1981) o nel terreno. Dopo la conservazione, talee e nesti subiscono un processo di reidratazione sia prima che dopo l'innesto, spesso per immersione in una sospensione fungicida. In seguito, gli innesti-talea sono mantenuti in condizioni idonee ad assicurare l'induzione del callo di forzatura. In alcuni Paesi, è diffusamente impiegata la segatura idratata o meno in sospensione di fungicidi ad ampio spettro (Van der Westhuizen, 1981), mentre più comunemente, gli innesti-talea sono mantenuti in acqua come descritto in precedenza.

*Phaeomoniella chlamydospora* è stata rilevata nell'acqua di idratazione, dove c'è una ripetuta esposizione del materiale vegetale (dati non pubblicati).

Dati ottenuti in vivai neozelandesi indicano la presenza del micete in tutte le fasi anche se la frequenza di rinvenimento è stata bassa per le macchine innestatrici e il substrato di differenziazione del callo (Whiteman *et al.*, 2004).

Valutazioni condotte in Sud Africa hanno permesso di accertare la presenza di *P. chlamydospora* in campioni di terreno prelevati in campi di piante madri portainnesto, in talee raccolte da piante madri, talee e nesti al momento dell'innesto, campioni di acqua prelevati durante la prima idratazione e prima della conservazione in camera fredda, campioni di acqua prelevati durante la fase di forzatura, substrati di forzatura del callo, mentre non è rinvenuta in campioni di acqua di fonte e nel terreno del barbatellaio prima dell'impianto (Retief *et al.*, 2006).

Una differente "susceptibilità" dei genotipi di vite a *P. chlamydospora* è stata osservata in Sud Africa: 101-14 Mgt e 99 Richter sono stati in generale più frequentemente infetti di

Ramsey e 110 Richter (Retief *et al.*, 2006). Prove di inoculazione artificiale con *P. chlamydospora* e *P. aleoophilum*, condotte in California, hanno dimostrato che 'Thompson Seedless' è più suscettibile rispetto a 'Grenache' e 'Cabernet Sauvignon' (Feliciano *et al.*, 2004). Risultati simili sono stati ottenuti anche in Nuova Zelanda (Whiteman *et al.*, 2004).

In generale, è stato osservato che la frequenza di rinvenimento di *P. chlamydospora* nel materiale viticolo aumenta con il progredire delle diverse fasi del processo vivaistico, raggiungendo il massimo nelle barbatelle franche o innestate pronte per la commercializzazione (Fourie e Halleen, 2004; Pollastro *et al.*, 2007).

Non è, inoltre, improbabile che il fungo sia presente nel materiale di propagazione in una forma latente o endofitica (Bertelli *et al.*, 1998). Osservazioni condotte in Francia suggeriscono che il micete è di occasionale rinvenimento (< 0,2%) in talee e nesti ottenuti da viti non sintomatiche (Fourie e Halleen, 2002).

Nel corso del progetto è stata condotta un'intensa attività di ricerca mirata a individuare in vivaio i possibili punti critici per l'infezione del materiale di propagazione a opera di *P. chlamydospora*.

Una ricerca condotta in Sardegna, nel biennio 2005-2007, ha permesso di accertare la presenza di *P. chlamydospora* in materiale di propagazione (talee, innesti-talea e barbatelle) prelevato durante varie fasi del processo di produzione.

Le valutazioni sullo sviluppo vegetativo delle barbatelle hanno permesso di accertare differenze attribuibili alle condizioni di allevamento o alla varietà, ma non al loro stato fitosanitario. È stato osservato che le barbatelle derivanti da viti portinnesto affette da mal dell'esca presentano uno sviluppo vegetativo ridotto rispetto a quelle della stessa varietà ottenute da viti giovani non sintomatiche; resta però da chiarire se ciò può essere causato dalla compromissione dell'apparato fogliare causato dal mal dell'esca e dalla conseguente influenza negativa sulla maturazione del legno delle piante madri.

*Phaeoconiella chlamydospora* non è stato mai rinvenuta in piante non germogliate o avvizzite, mentre in quelle con germoglio vitale, nonostante la presenza di striature necrotiche spesso estese per tutta la lunghezza delle barbatelle, la presenza di *P. chlamydospora* è stata sempre modesta nei tre anni di indagine. Inoltre, è stato accertato che il materiale proveniente da piante madri può risultare infetto, anche se con frequenze non elevate, variabili da un anno all'altro e indipendenti dall'età o dalla sanità del vigneto.

In base ai risultati ottenuti è possibile affermare che la contaminazione del materiale vivaistico può derivare sia dalla presenza di *P. chlamydospora* nelle piante madri sia dal processo di produzione delle barbatelle innestate, ma è difficile stabilire in che misura questi fattori possano incidere sul risultato finale. Allo stesso modo è difficile stabilire se l'età e lo stato sanitario delle piante madri possano influire sulla presenza del micete nei tralci utilizzati per la propagazione (Serra *et al.*, dati non pubblicati).

Anche in Puglia, sono state eseguite indagini mirate a identificare possibili punti critici per l'infezione da *P. chlamydospora* nel processo di produzione del materiale di propagazione, in quanto in precedenti indagini il fungo è risultato quello più strettamente associato agli imbrunimenti delle barbatelle. La *nested*-PCR è stata impiegata per rilevare la presenza del fungo in campioni di: "pianto" di piante madri, talee, nesti, innesti-talea prima e dopo la forzatura del callo, barbatelle innestate all'espianco, campioni di acqua di idratazione nelle diverse fasi,

macchine innestatrici, terreno di barbatellai all'espianco, tamponi microbiologici delle superfici dei locali utilizzati per la lavorazione del materiale di propagazione. In generale, è stato osservato un incremento della frequenza di *P. chlamydospora* durante il progresso del processo di produzione. Il micete, infatti, è stato rinvenuto solo occasionalmente in talee e nesti, anche quando questi erano stati ottenuti da viti mostranti evidenti sintomi di mal dell'esca in campo, o in innesti-talea prima della forzatura dell'induzione del callo di saldatura. Il micete è stato rilevato con frequenza leggermente maggiore in innesti-talea al termine della fase di forzatura e ha raggiunto la frequenza massima nelle barbatelle innestate all'espianco del barbatellaio. *P. chlamydospora* è stata anche rinvenuta in campioni prelevati da superfici dei locali di lavorazione, in campioni di acqua impiegata per l'idratazione del materiale nonché nella fase di forzatura del callo di saldatura, in tamponi microbiologici prelevati dalle postazioni innestatrici (lame e bancali) e, solo in un caso, quando sono stati analizzati campioni di segatura. La percentuale di rinvenimento è stata variabile negli anni e ciò lascia supporre un possibile apporto alla contaminazione da parte di ciascuna delle fasi del processo di produzione anche in relazione a quella che può essere la contaminazione ambientale per il verificarsi di condizioni termo-igrometriche favorevoli alla sporulazione del micete (Pollastro *et al.*, 2007, 2008). Il micete, invece, è stato rinvenuto solo erraticamente in campioni di terreno di barbatellai ove erano state prodotte barbatelle ospitanti frequentemente il micete e mai da campioni di terreno aderente alle radici di barbatelle infette da *P. chlamydospora* o da vigneti in cui era estremamente diffuso il mal dell'esca (Pollastro *et al.*, 2009).

## II.4 Forme di svernamento dei funghi dell'esca, fonti dell'inoculo, recettività delle ferite

S. Frisullo, A. Carlucci\*, F. Lops, L. Michelon, C. Pellegrini, I. Pertot, M. Quaglia, A. Zizzerini, S. Serra, M.A. Mannoni, V. Ligios, A. Demontis

### II.4.1 Introduzione

Come già detto in altre parti di questo volume, il mal dell'esca è una malattia largamente diffusa sia nelle aree vitivinicole italiane, che in quelle europee ed extraeuropee (Chiarappa, 2000a; Graniti *et al.*, 2000; Mugnai *et al.*, 1996b; Larignon e Dubos, 1997; Armengol *et al.*, 2001; Edwards *et al.*, 2001b; Morton, 2001; Rumbos e Rumbou, 2001) ed è causa di notevoli perdite economiche. Tenuto conto dell'incremento della malattia registrato negli ultimi 30-40 anni sia in vigneti adulti che in giovani impianti, è possibile ritenere che si tratti di una malattia con andamento epidemico.

In generale, le malattie delle piante assumono andamento epidemico soprattutto quando alcune condizioni sono pienamente soddisfatte, quali la presenza di una fonte d'inoculo, la disponibilità di ospiti suscettibili e l'instaurarsi di appropriate condizioni ambientali per un periodo di tempo sufficiente a consentire l'infezione, lo sviluppo del patogeno, la sua riproduzione e disseminazione.

Gravi manifestazioni epidemiche di malattia possono anche insorgere quando è in atto una coltura estensiva di un limitato numero di genotipi dell'ospite, particolarmente quando questi non sono frammisti a genotipi resistenti. Questa situazione determina una massiccia pressione nella selezione di genotipi patogeni virulenti che possono indurre gravi conseguenze.

Le principali fonti d'inoculo sono normalmente rappresentate dalle piante infette presenti nella coltivazione e dal materiale di propagazione, mentre il suolo, l'atmosfera e i vettori sono importanti nella dispersione e disseminazione delle spore. Anche le condizioni climatiche possono giocare un ruolo decisivo nelle epidemie, in quanto molti parassiti richiedono un limitato range di condizioni ambientali (temperatura, umidità, vento ecc.) per l'infezione, lo sviluppo, la riproduzione e la disseminazione. Ovvero, la presenza di una coltura con un ospite suscettibile in condizioni ambientali appropriate può influenzare lo sviluppo e la dispersione del patogeno, nonché le infezioni, anche nelle popolazioni future. Quindi, il verificarsi di una malattia può variare in funzione della biologia del patogeno e della coltura in atto.

Come già detto in altro capitolo, il mal dell'esca della vite (= esca propria) è una malattia ad eziologia complessa dovuta all'attacco di diversi funghi e in particolare di *Phaeoconiella chlamydospora*, di diverse specie di *Phaeoacremonium*, tra cui *P. aleophilum*, e di *Fomitiporia mediterranea*. Gli studi compiuti fino a ora sull'epidemiologia della malattia ci dicono che *P. chlamydospora* è in grado di formare picnidi o conidiofori liberi sulle viti infette, in particolare sulle vecchie ferite di potatura e tra le anfrattuosità della corteccia (Edwards *et al.*, 2001a;

Eskalen *et al.*, 2004). Queste ultime, in particolare, forniscono un ambiente protetto e umido favorevole alla sporulazione. L'inoculo prodotto può diffondersi per via aerea, specialmente in concomitanza di eventi piovosi (Larignon e Dubos, 2000; Eskalen e Gubler, 2001; Eskalen *et al.*, 2004). Inoltre, è stato ipotizzato anche il trasporto sul corpo di collemboli e acari fitoseidi (Edwards *et al.*, 2001a). Negli stessi siti in cui si sviluppano le fruttificazioni di *P. chlamydospora* si possono sviluppare gli ascocarpi di *Togninia minima*, teleomorfo di *P. aleophilum* (Rooney-Latham *et al.*, 2005b). Le spore di questo fungo vengono catturate solo durante la stagione vegetativa della vite e non durante l'inverno (Larignon e Dubos, 2000; Eskalen e Gubler, 2001). *Fomitiporia mediterranea* M. Fischer, noto agente causale della carie bianca, può attaccare diverse specie legnose ed è diffuso, in particolare, nella regione mediterranea. I corpi fruttiferi si possono trovare lungo il fusto e i vecchi tralci di piante vive (Fischer, 2002).

La modalità più conosciuta d'infezione da parte dei funghi associati al mal dell'esca è quella attraverso le ferite, specialmente quelle che mettono a nudo il legno. I conidi e le spore prodotti dai diversi miceti e diffusi per via aerea possono depositarsi su una ferita e dare inizio al processo infettivo, specialmente in concomitanza di eventi piovosi. Ogni anno, nel periodo invernale, la tecnica di coltivazione della vite prevede l'esecuzione di tagli di potatura più o meno energici a seconda della forma di allevamento. Quindi, la formazione di ferite che mettono a nudo il legno, attraverso le quali possono penetrare eventuali invasori fungini, non è un'eccezione ma la regola. In particolare, i tagli effettuati sui tralci dell'anno, che andranno a costituire i capi a frutto della successiva stagione vegetativa, sono comuni a tutte le forme di allevamento e, per motivi pratici, non vengono protetti con mastici.

È opinione comune che una potatura tardiva minimizzi i rischi di contaminazione delle ferite da questa provocata alla pianta poiché la loro cicatrizzazione è più rapida in prossimità del risveglio vegetativo. In questa direzione vanno i risultati degli studi condotti in Francia su *Phaeoconiella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum* e *Diplodia seriata* (= *Botryosphaeria obtusa*) (Larignon e Dubos, 2000; Larignon *et al.*, 2001a, 2001b); al contrario, una sperimentazione condotta in Sud Africa su diversi patogeni del legno tra cui *P. chlamydospora* e *Neofusicoccum australe* (= *Botryosphaeria australis*) ha dimostrato che sono proprio le ferite più tardive a essere infettate con maggiore frequenza (van Niekerk *et al.*, 2007). In California, le ferite effettuate a febbraio rimangono recettive alle infezioni di *P. chlamydospora* e *P. aleophilum* per almeno 4 mesi (Eskalen *et al.*, 2007). È probabile, quindi, che l'ambiente in cui viene studiato il fenomeno influisca sui risultati ottenuti.

In Italia non sono ancora stati compiuti studi specifici sulla presenza di fonti d'inoculo, sulla diffusione dello stesso e sulle vie di penetrazione. Per colmare questa lacuna sperimentazioni *ad hoc* sono state allestite in diverse parti d'Italia.

### II.4.2 Fonti dell'inoculo

È noto che gli agenti causali del mal dell'esca si isolano più o meno facilmente dalle piante sintomatiche, cioè affette da un lento deperimento caratterizzato da crescita stentata, ingiallimento e necrosi del fogliame, e in particolare da venature brune e necrosi del fusto e delle branche, o da carie sul fusto. Lo sviluppo dei corpi fruttiferi degli agenti causali del mal dell'esca può

\* Università di Foggia email: a.carlucci@unifg.it

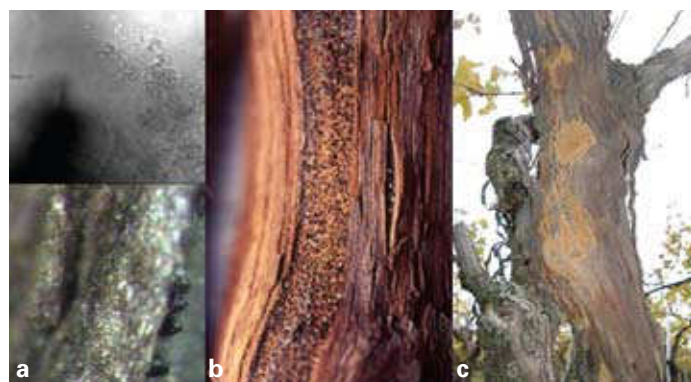


Fig. 1 - Corpi fruttiferi reperiti su piante di vite affette da mal dell'esca:  
a) Phaeomoniella chlamydospora;  
b) Neofusicoccum parvum;  
c) Fomitiporia mediterranea

dare utili indicazioni sulla presenza di fonti d'inoculo attive nei vari periodi dell'anno e quindi del ruolo dell'inoculo aereo (conidi, spore) nella diffusione della malattia.

Alcune sorgenti d'inoculo di *P. aleophilum*, *P. mortoniae*, *P. angustius*, *P. viticola*, *P. inflatipes*, *P. chlamydospora*, *F. mediterranea* formanti strutture sporigene gamiche e agamiche, possono essere osservate sulle stesse piante da cui sono comunemente isolati, mentre le stesse strutture possono essere osservate su altre specie di piante dislocate lontano dai vigneti. Infatti, le specie fungine *Fomitiporia* sp., *Lecythophora lignicola*, *P. aleophilum*, *P. rubrigenum* e *P. inflatipes* isolate da piante di olivo in diverse aree della Puglia sono in grado di indurre sintomi di malattia su piante di olivo e di vite (Carlucci *et al.*, 2009). Pertanto, la loro diffusione può avvenire per mezzo del vento, di insetti corticicoli o di schizzi di pioggia (Larignon e Dubos, 2000; Edwards *et al.*, 2001a; Eskalen e Gubler, 2001).

In Puglia, osservazioni condotte in vigneti dislocati negli agri di Foggia e Cerignola hanno evidenziato la presenza di corpi fruttiferi di *P. aleophilum*, *P. inflatipes*, *P. chlamydospora*, *Fomitiporia mediterranea* e specie di Botryosphaeriaceae su viti colpite da esca propria (fig. 1). In Trentino, eccetto il ritrovamento di un basidiocarpo di *F. mediterranea* nel mese di settembre del 2006, non sono stati osservati corpi fruttiferi degli agenti coinvolti nel mal dell'esca nonostante le piante sintomatiche nei vigneti monitorati risultassero infettate da *P. chlamydospora* e *P. aleophilum*. Una situazione simile è stata rilevata in Sardegna, dove la presenza di diversi corpi fruttiferi di *F. mediterranea* è stata osservata in due vigneti (cv. Sau-



Fig. 2 - Corpi fruttiferi di:  
a) Trametes pubescens;  
b) Trametes versicolor;  
c) Phellinus pomaceus;  
d) - e) Fomitiporia sp. (arancio e olivo)

vignon e 140Ru). Invece, corpi fruttiferi di *Diplodia* spp. sono stati rilevati su legno morto di viti con sintomi fogliari di esca in diversi vigneti.

Lo sviluppo dei corpi fruttiferi degli agenti causali del mal dell'esca può dare utili indicazioni sulla presenza di fonti d'inoculo attive nei vari periodi dell'anno e quindi del ruolo dell'inoculo aereo (conidi, spore) nella diffusione della malattia.

Il monitoraggio di circa 50 vigneti situati in Puglia e Basilicata ha dato esito al ritrovamento di numerosi ceppi di vite con corpi fruttiferi di *F. mediterranea*, mentre sulle piante di pesco e albicocco allevate nei vigneti o attigue a essi sono stati identificati *Phellinus pomaceus*, *Trametes versicolor*, *Trametes pubescens*, *Chondrostereum purpureum*, *Phellinus punctatus* e *Stereum* spp. (fig. 2). Successivamente inoculati su piante di vite cv. Italia e cv. Lambrusco, solo *F. mediterranea*, *P. punctatus* e *C. purpureum* hanno prodotto imbrunimenti con stadi iniziali di carie bianca.

### II.4.3 Diffusione delle spore fungine

La presenza di spore aeree degli agenti del mal dell'esca può indicare il loro ruolo nella diffusione della malattia nel vigneto. Il periodo in cui esse sono maggiormente presenti può dare indicazione circa il momento in cui potrebbero avviarsi le infezioni. A tal proposito in Puglia, in Trentino e in Umbria è stato effettuato un monitoraggio delle spore aeree in alcuni vigneti mediante l'utilizzazione di un campionatore volumetrico a ciclo continuo settimanale, o di un captaspore tipo Hirst, o di un Lanzoni e Burkard Spore Trap. Inoltre, la diffusione delle spore aeree è stata monitorata mediante il posizionamento settimanale di vetrini da microscopia trattati con una soluzione adesivante di silicone (900401 Lanzoni srl) su nuovi e vecchi tagli di potatura su piante di vite allevate in Puglia, Trentino e Umbria (figg. 3-5). L'isolamento delle spore è stato effettuato mediante le metodiche descritte da Larignon e Dubos (2000) e Eskalen e Gubler (2001). I dati meteorologici comprendenti la temperatura, l'umidità relativa e la piovosità sono stati rilevati mediante l'installazione di capannine meteorologiche munite di adeguate attrezzature.



Fig. 3 - Vetrino ricoperto di vaselina e collocato in prossimità di un vecchio taglio di potatura (rilievi in Puglia)

Con l'ausilio dei campionatori volumetrici a ciclo continuo, la cattura delle spore delle specie fungine direttamente associate alla sindrome del mal dell'esca è stata numericamente bassa rispetto alle specie fungine note per essere ubiquitarie e polifaghe (*Alternaria* spp., *Penicillium* spp., *Aspergillus*, spp., *Acremonium* spp., *Cladosporium* spp., *Fusarium* spp., *Botrytis cinerea* ecc.). Al contrario, il posizionamento di vetrini captaspore vicino alle ferite di potatura ha consentito catture numericamente più abbondanti delle spore dei fughi in esame. Infatti, è stato evidenziato che nei vigneti della Puglia oggetto di studio, le spore di *P. aleophi-*

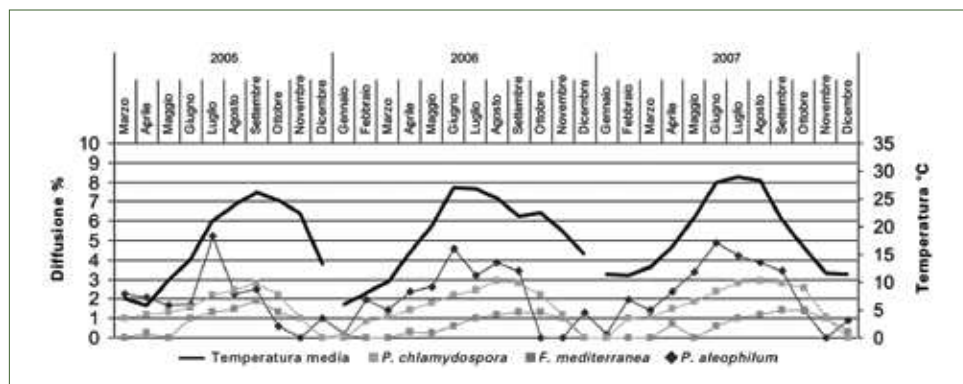


Fig. 4 - Diffusione degli agenti causali del mal dell'esca in funzione del tempo e della temperatura nel triennio considerato in Puglia

lum, *P. chlamydospora* e *F. mediterranea* sono state catturate in tutti i mesi dell'anno, ma le maggiori frequenze sono state registrate nel periodo primavera-estate (fig. 4). Insieme agli agenti causali del mal dell'esca, è stato rilevato in tutti i mesi dell'anno un alto numero di spore di specie di Botryosphaeriaceae successivamente identificate come *B. dothidea*, *Neofusicoccum parvum*, *Diplodia seriata*, *D. mutila*, *Dothiorella sarmentorum* e *Lasiodiplodia theobromae*.

In Trentino, nei vigneti sottoposti a indagine, le spore aeree dei funghi coinvolti nel mal dell'esca sono state catturate saltuariamente con bassissime frequenze nel periodo compreso tra marzo 2005 e dicembre 2007.

In Umbria le indagini sono state condotte presso il vigneto sperimentale dell'Università degli Studi di Perugia, sito in località Sant'Apollinare, provincia di Perugia, che è servito da una capannina meteorologica appartenente alla Rete Agrometeorologica Regionale. Le spore dei funghi agenti del mal dell'esca sono state catturate seguendo il metodo descritto da Eskalen e Gubler (2001). I vetrini da microscopia, ricoperti su ambo i lati con gel di silicone, sono stati affissi su piante di vite, in prossimità di ferite o di vecchi tagli



Fig. 5 - Vetrino da microscopia ricoperto su ambo i lati con gel di silicone (900401 Lanzoni srl) e affisso su vite, in prossimità di un taglio di potatura (rilievi in Umbria)



Fig. 6 - Colonie di Phaeoaniella chlamydospora su Malto Agar addizionato con tetraciclina HCl (0,1 g/l)

Fig. 7 - Numero di spore di Phaeoaniella chlamydospora catturate mensilmente, da gennaio a dicembre 2007, nel vigneto sperimentale dell'Università degli Studi di Perugia (Umbria). CFU= Unità Formanti Colonia

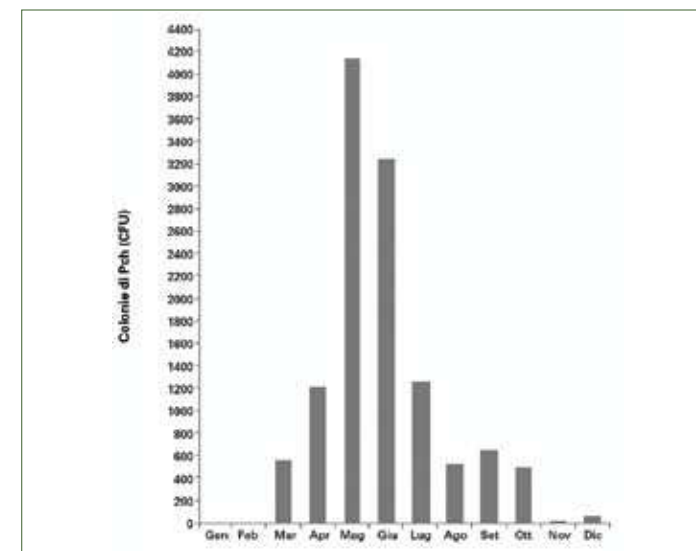
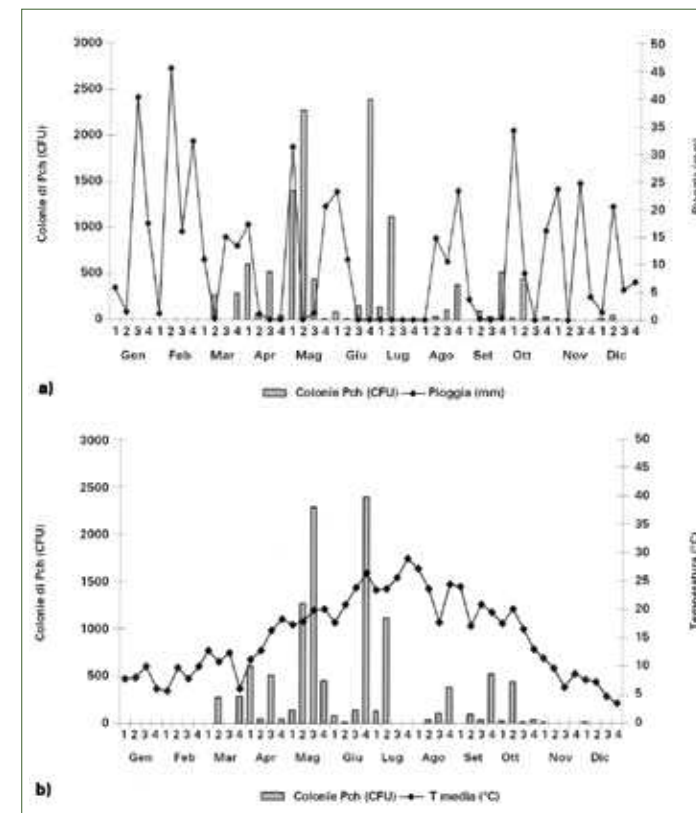


Fig. 8 - a) Andamento settimanale della cattura delle spore di Phaeoaniella chlamydospora e della piovosità (mm), da gennaio a dicembre 2007. b) Andamento settimanale della cattura delle spore di Phaeoaniella chlamydospora e della temperatura media (°C), da gennaio a dicembre 2007. CFU= Unità Formanti Colonia



di potatura (fig. 5). Nell'indagine sono stati impiegati 12 vetrini, posizionati a coppie su 6 piante differenti, scelte tra quelle che nell'annata precedente avevano manifestato sintomi fogliari di esca. I vetrini, raccolti settimanalmente, sono stati lavati in 10 ml di acqua deionizzata sterile e l'acqua di lavaggio è stata sottoposta a una doppia filtrazione utilizzando, in successione, filtri Minisart da 5 e da 0,45 µm. Il filtro da 0,45 µm è stato risciacquato con 1 ml di acqua deionizzata sterile e l'acqua di risciacquo deposta in piastre Petri (diametro 9 cm) contenenti Malto Agar (MA) addizionato con tetraciclina-HCl (0,1 g/l), pH 5,7. Da ciascun vetrino sono state ottenute 4 piastre, poi incubate in termostato a  $21 \pm 2^\circ\text{C}$ , al buio. Dopo 10 giorni di incubazione, si è proceduto al conteggio delle colonie sulle 4 piastre ottenute da ciascun vetrino. Il numero delle spore catturate è stato espresso come Unità Formanti Colonia (UFC o CFU), che esprime il numero di spore capaci di dare origine a nuove colonie. I dati relativi alla cattura delle spore sono stati messi in relazione con i dati climatici (pioggia e temperatura) rilevati dalla Rete Agrometeorologica Regionale, gestita dal 3 A-Parco Tecnologico Agroalimentare dell'Umbria. I rilievi sono stati effettuati da gennaio a dicembre 2007.

Tra i funghi agenti di esca è stata rilevata la sola presenza di *P. chlamydospora* (fig. 6). Il numero di spore catturate è aumentato con l'avanzare della primavera e ha raggiunto i valori massimi nei mesi di maggio e giugno (fig. 7). Il rilascio delle spore si è verificato essenzialmente in concomitanza o in seguito a eventi piovosi (fig. 8a). Anche la temperatura ha influenzato il rilascio delle spore. In effetti non ci sono state catture nelle settimane più calde e in quelle più fredde dell'anno (fig. 8b).

#### II.4.4 Diffusione delle spore di *Fomitiporia mediterranea*

Nel corso dello svolgimento del progetto non sono state raccolte indicazioni riguardo alla diffusione delle spore di *F. mediterranea*. Tuttavia, Fischer, in Germania, ha potuto accertare che la sporulazione del fungo inizia verso la fine di marzo-inizio aprile, con una temperatura intorno ai  $10^\circ\text{C}$ , e termina verso la fine di novembre-dicembre, quando la temperatura si stabilizza intorno ai  $5^\circ\text{C}$ . Produzione e diffusione delle spore sono favorite dalla pioggia, contemporanea o successiva al fenomeno. Fischer ha potuto anche accertare che *F. mediterranea* può infettare le ferite della potatura (o altre ferite) via micelio o spore e che sono necessarie almeno due spore per la formazione dell'eterocarion.

#### II.4.5 Recettività delle ferite di potatura

Esperimenti di inoculazioni artificiali eseguiti negli anni 2005, 2006 e 2007 con *P. aleophilum*, *P. chlamydospora*, *F. mediterranea* e specie di Botryosphaeriaceae, sui tagli di potatura invernale (gennaio-marzo) mediante deposizione sulla superficie di taglio di sospensioni conidiche o di micelio su piante di vite allevate in Puglia, Sardegna e nel Trentino hanno evidenziato un andamento delle infezioni variabile in funzione dei diversi funghi inoculati, delle condizioni climatiche verificatesi negli anni di prova, e dell'epoca di potatura, anche se quest'ultima sembra che abbia avuto una scarsa influenza.

#### Prove in Puglia

In Puglia le inoculazioni artificiali sui tagli di potatura invernale (gennaio, febbraio, marzo) mediante deposizione sulla superficie di taglio di sospensioni conidiche o di micelio su piante di vite cv. Italia allevate in vaso in serra fredda, non hanno prodotto infezioni, tranne che per *D. seriata*, *N. parvum* e *B. dothidea*. Mentre, in seguito a inoculazioni per iniezione, le specie *P. aleophilum* e *P. chlamydospora* hanno invaso i tessuti fino a una profondità di 16 cm.

#### Prove in Sardegna

In Sardegna, la sperimentazione è stata condotta per tre anni, dal 2005 al 2007, in un vigneto di circa 15 anni della cv. Sauvignon Blanc innestato su SO4, allevato a pergola e con una alta incidenza di viti affette da mal dell'esca. Durante la fase di dormienza della vite la potatura è stata effettuata in tre diverse epoche (la prima decade di gennaio, di febbraio e di marzo) lasciando uno sperone di 20-30 cm. Ogni settimana, 4000 conidi di *P. chlamydospora* e *P. aleophilum* e 2500 di *D. seriata* sono stati inoculati su 20 speroni per ogni fungo ed epoca di potatura. Venti speroni sono stati inoculati con acqua sterile. Quattro settimane dopo l'inoculazione gli speroni sono stati asportati alla base ed esaminati in laboratorio per verificare l'avvenuta infezione (Larignon e Dubos, 2000).

Per quanto riguarda *P. chlamydospora* le ferite effettuate più tardivamente, a marzo, sono risultate meno recettive alle infezioni in modo significativo solo nel 2005 (fig. 9). La recettività è calata nel corso della stagione, indipendentemente dall'epoca di potatura, nel 2005 e nel 2006. Tuttavia, solo nel 2005 si è avvicinata allo zero, o lo ha raggiunto, nelle ultime inoculazioni, mentre nel 2006 la contaminazione degli speroni è risultata rilevante anche a stagione vegetativa inoltrata. Infine, nel 2007 i valori di contaminazione sono risultati costantemente elevati durante tutta la stagione, senza sostanziali differenze tra le epoche di potatura, e hanno raggiunto i valori medi più alti di tutti e tre gli anni considerati.

La recettività delle ferite nei confronti di *P. aleophilum* ha avuto un andamento altalenante in tutti e tre gli anni senza sostanziali differenze tra le epoche di potatura, a eccezione del 2005 (fig. 10). In quest'annata, i valori di contaminazione più elevati sono stati riscontrati per le ferite effettuate più tardivamente. Contrariamente a quanto rilevato per *P. chlamydospora*, le percentuali medie di isolamento tra il primo e il secondo anno sono state simili, ma se si considera il periodo gennaio-marzo esse sono cresciute da 32,6% nel 2005 a 44,8% nel 2006. Nel 2007, analogamente a quanto rilevato per *P. chlamydospora*, le percentuali di isolamento sono state le più elevate in assoluto.

Infine, per quanto riguarda *D. seriata* l'andamento della suscettibilità delle ferite di potatura è stato molto diverso da un anno all'altro (fig. 11). Nel 2005 le percentuali di contaminazione più basse sono state rilevate all'inizio della prova al contrario del 2006, quando nello stesso periodo sono state riscontrate le percentuali più elevate. Nel 2007, invece, in controtendenza rispetto a *P. chlamydospora* e *P. aleophilum*, i valori d'infezione sono stati relativamente più bassi. È difficile spiegare questo andamento sia coi dati climatici che con quelli fenologici. Infatti, la temperatura ottimale di *D. seriata* è di  $25^\circ\text{C}$  (Úrbez-Torres *et al.*, 2006) e quindi si sarebbe dovuto avvantaggiare delle maggiori temperature raggiunte nel 2007. In corrispondenza del brusco calo registrato a marzo del 2006 la vite era in pianto e tale fenomeno si è protratto per altre due settimane. Tuttavia, nel 2005 in corrispondenza



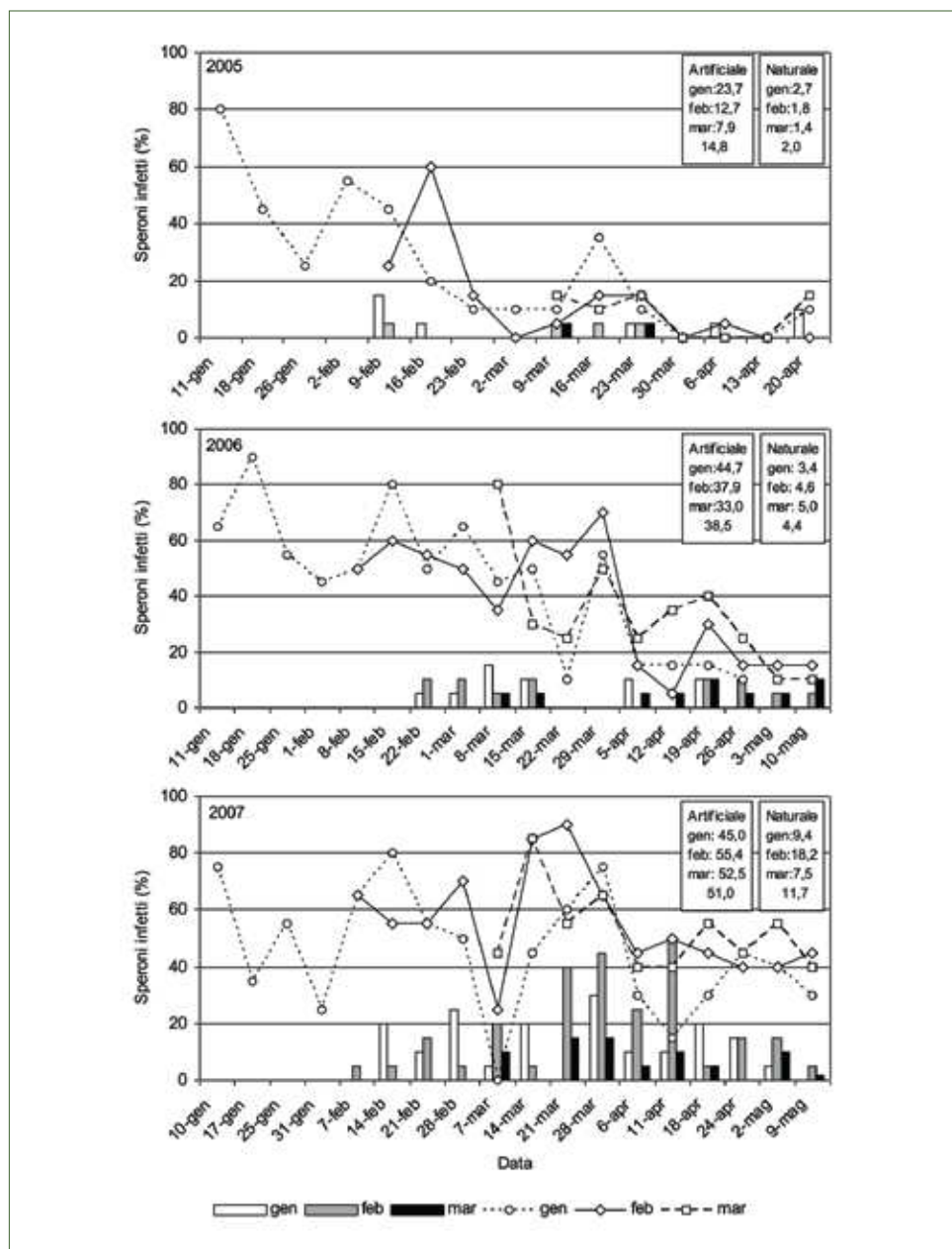


Fig. 9 - Percentuali di infezione settimanale degli speroni potati nella prima decade di gennaio, febbraio e marzo e inoculati artificialmente (linee) o infettati naturalmente (istogrammi) con Phaeoconiella chlamydospora nel periodo 2005-2007. Nei riquadri sono riportate le percentuali medie di infezione artificiale e naturale per epoca di potatura e per anno

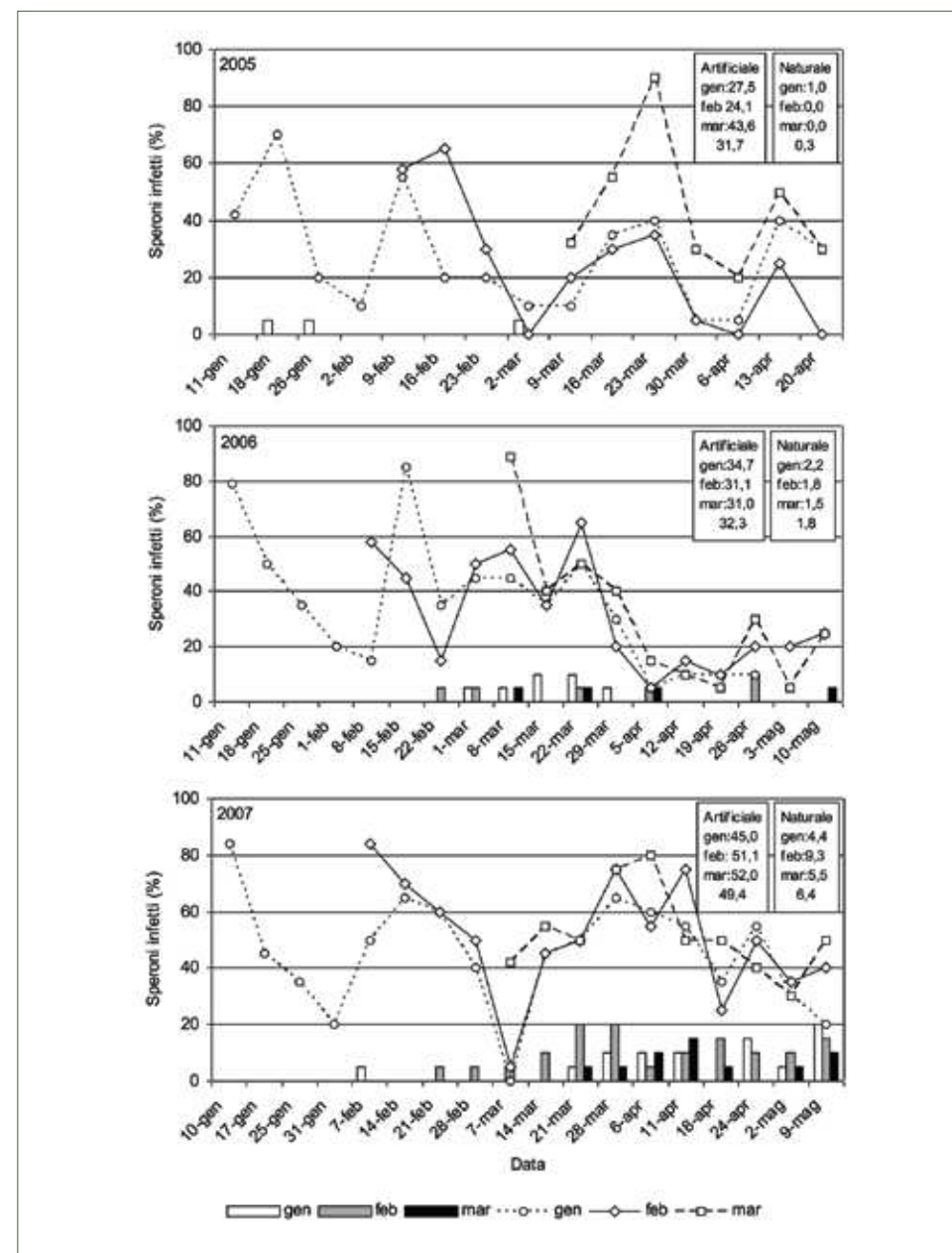


Fig. 10 - Percentuali di infezione settimanale degli speroni potati nella prima decade di gennaio, febbraio e marzo e inoculati artificialmente (linee) o infettati naturalmente (istogrammi) con Phaeoacremonium aleophilum nel periodo 2005-2007. Nei riquadri sono riportate le percentuali medie di infezione artificiale e naturale per epoca di potatura e per anno

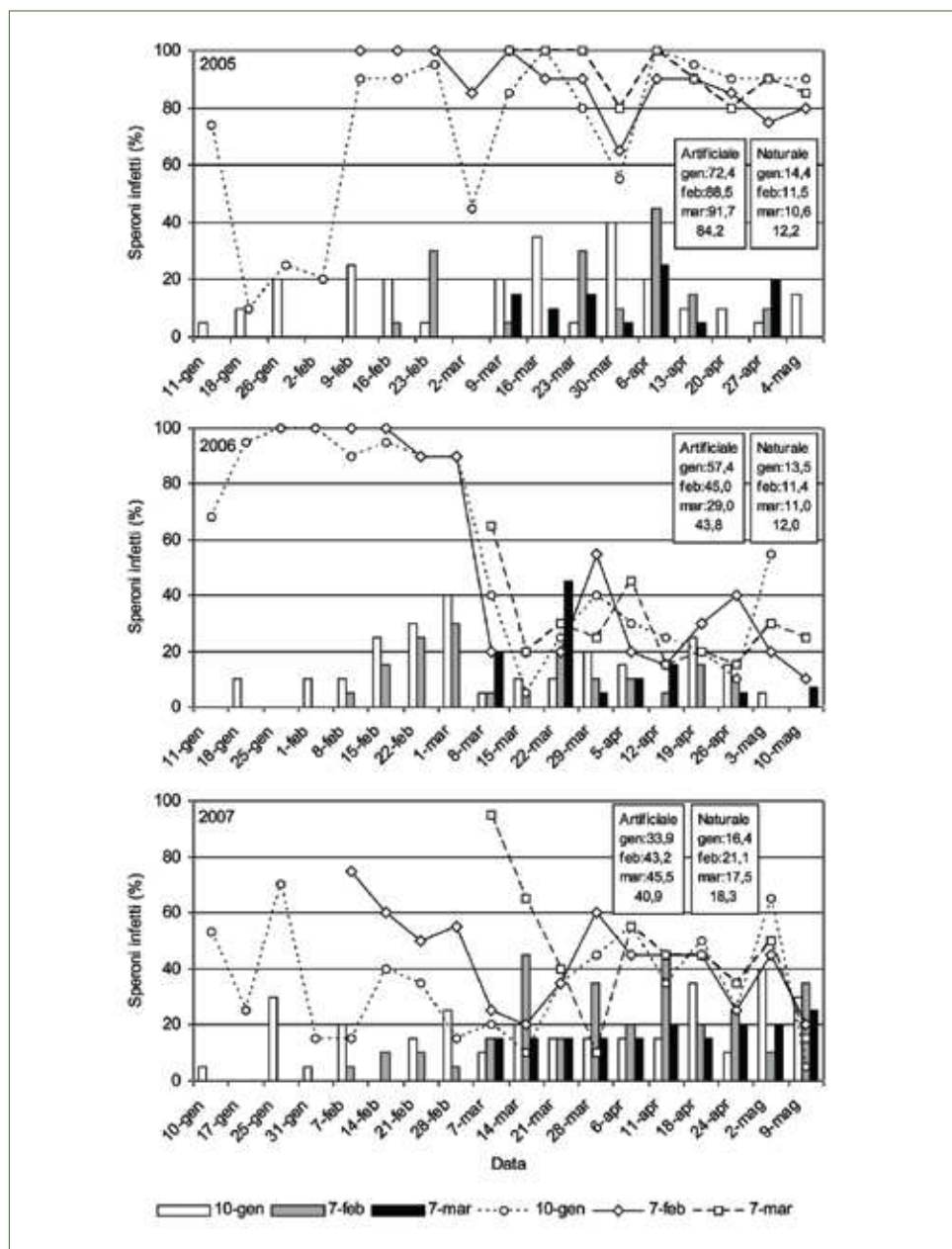


Fig. 11 - Percentuali di infezione settimanale degli speroni potati nella prima decade di gennaio, febbraio e marzo e inoculati artificialmente (linee) o infettati naturalmente (istogrammi) con *Diplodia seriata* nel periodo 2005-2007. Nei riquadri sono riportate le percentuali medie di infezione artificiale e naturale per epoca di potatura e per anno

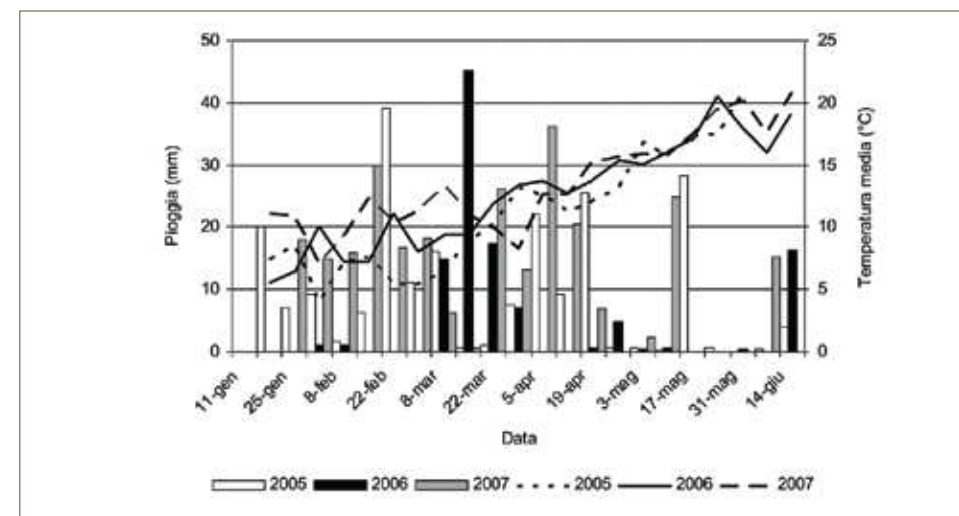


Fig. 12 - Piogge (istogrammi) e temperature medie (linee) settimanali registrate durante le prove nei pressi del vigneto

del pianto si è avuto un calo di lieve entità e subito dopo le percentuali di contaminazione sono tornate su livelli superiori all'80-90% per il resto della stagione.

In Sardegna sono state anche monitorate le infezioni naturali degli speroni da parte di *P. chlamydospora* e *P. aleophilum*. Tali infezioni sono state piuttosto scarse nel 2005 (figg. 9-10). Nel 2006, e ancor più nel 2007, la contaminazione spontanea degli speroni è stata più elevata e ciò può essere dipeso dalle temperature più elevate nel periodo invernale (fig. 12). In effetti, in tutti e tre gli anni di prova, con alcune eccezioni nel 2005, tale contaminazione è iniziata quando le temperature medie si sono assestate intorno ai 10°C. Nel 2007, tale valore è stato raggiunto con due settimane d'anticipo rispetto al 2006 e ben 5 rispetto al 2005. Ciò potrebbe aver favorito l'attività riproduttiva dei funghi in esame e la loro diffusione, facilitata anche dalle piogge che non sono mancate durante tutto il periodo di sperimentazione.

Le infezioni naturali degli speroni da parte di *D. seriata* sono state rilevate durante tutto l'arco delle prove, anche in pieno inverno (fig. 11). Quindi, almeno apparentemente, la temperatura non sembra influire in modo decisivo sulla produzione e diffusione dell'inoculo di questo fungo. Tuttavia, nel 2007 l'isolamento di *D. seriata* dagli speroni non inoculati è stato significativamente più elevato degli anni precedenti, probabilmente proprio a causa delle condizioni climatiche più favorevoli.

Tra i fattori che possono aver contribuito a determinare le maggiori frequenze d'isolamento negli ultimi due anni delle prove di inoculazione artificiale merita particolare attenzione la temperatura. Questa, nel periodo invernale (gennaio-marzo), è stata più elevata, nel 2006 e ancor più nel 2007 rispetto al 2005 (fig. 12). Ciò può aver favorito le infezioni di *P. chlamydospora* e *P. aleophilum* che hanno una temperatura ottimale di crescita di 25°C e 35°C, rispettivamente (Crous *et al.*, 1996). Inoltre, le temperature più elevate nel 2007

hanno determinato un consistente anticipo del germogliamento: le prime gemme aperte erano già visibili il 14 marzo, mentre negli altri due anni si è dovuto aspettare i primi giorni di aprile. Sia l'andamento termico che quello pluviometrico hanno poi condizionato il pianto. La piovosità ridotta durante il mese di marzo 2005 ha concentrato il pianto in un breve periodo (30 marzo), mentre le abbondanti piogge di marzo nel 2006 e di febbraio nel 2007 hanno determinato il prolungamento del fenomeno per diverse settimane (dall'8 al 22 marzo nel 2006; dal 14 febbraio al 7 marzo nel 2007). Quindi, nel 2007 l'anticipo del germogliamento avrebbe dovuto favorire la cicatrizzazione delle ferite e il protrarsi del pianto impedire l'ingresso dei patogeni nei vasi; invece l'infezione delle ferite è stata superiore agli altri anni. Secondo gli studi effettuati in Francia (Larignon e Dubos, 2000) la potatura effettuata in prossimità o in coincidenza del pianto limiterebbe sostanzialmente i rischi di infezione da parte di *P. chlamydospora* e *P. aleophilum*. Nella presente sperimentazione, invece, in corrispondenza di questo evento le percentuali d'infezione sono calate decisamente solo nel 2005 e nel 2007 ma, se si escludono quelle di *P. chlamydospora* nel 2005, sono poi risalite su livelli elevati.

**Prove in Trentino**

In Trentino, la recettività delle ferite di potatura è stata valutata mediante inoculazioni artificiali con deposizione di 40 µl di sospensione conidica di *P. chlamydospora* su ferite di potatura, effettuate all'inizio di dicembre e alla fine di febbraio, su piante di 4 vigneti (tab. 1). I risultati hanno indicato che le ferite maggiormente recettive sono state quelle della potatura effettuata alla fine di febbraio.

In particolare, nel corso della stagione invernale 2005-2006, sono state effettuate, nei vigneti 1 e 2, due potature, una nel mese di dicembre e l'altra alla fine del mese di febbraio. Immediatamente e a distanza di 1, 14, 30 e 90 giorni da ciascuna potatura, 20 ferite su tralci di due anni sono state coperte con silicone universale (BOSTICK® Misal Arexon). Tre mesi dopo ciascuna potatura, i tralci sono stati prelevati e portati in laboratorio dove sono stati effettuati gli isolamenti al fine di verificare l'eventuale infezione naturale e successiva colonizzazione da parte dei tre principali patogeni. In entrambi i vigneti non è mai stato

Tab. 1 - Caratteristiche generali dei quattro vigneti e relative attività svolte in ciascuno di essi				
Vigneto	Varietà	Età (anni)	Forma di allevamento	Attività
1	Traminer (T), Incrocio Manzoni (IM), Riesling (R)	22 (T), 9 (IM), 4 (R)	Pergola trentina	Monitoraggio spore, recettività ferite di potatura, evoluzione dei sintomi estivi
2	Chardonnay	23	Guyot	Monitoraggio spore, evoluzione dei sintomi estivi
3	Cabernet Sauvignon	35	Pergola trentina	Monitoraggio spore
4	Cabernet Sauvignon	17	Guyot	Recettività ferite di potatura

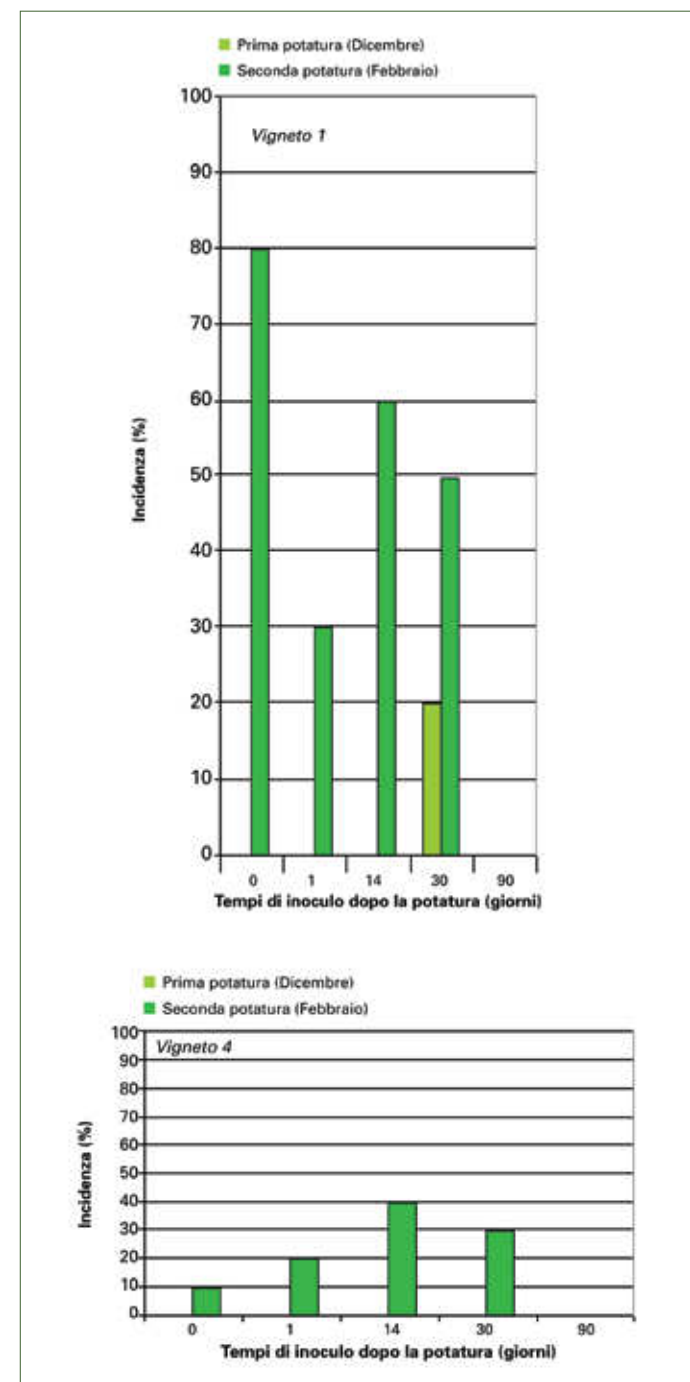


Fig. 13 - Incidenza di infezione (numero di ferite infette/numero di ferite inoculate) di *P. chlamydospora* a diversi giorni di distanza dalle due potature nei vigneti 1 e 4. Nel vigneto 4 dopo la prima potatura nessuna ferita è stata colonizzata dal patogeno

**Tab. 2 - Valori dell'integrale dell'incidenza d'infezione calcolato per le diverse date d'inoculazione per le due potature nei vigneti 1 e 4\***

Potatura	Integrale dell'incidenza**	
	Vigneto 1	Vigneto 4
Dicembre	152,0 a	0,0 a
Febbraio	474,0 b	255,3 b

\* In entrambi i siti le ferite risultano più recettive dopo la potatura di febbraio rispetto a quella di dicembre

\*\* Lettere diverse nella stessa colonna indicano differenze significative al test di Kolmogorov-Smirnov ( $P \leq 0,05$ ).

isolato alcuno degli agenti coinvolti nel mal dell'esca, in nessuna delle date considerate. Ciò indica l'assenza di infezioni naturali e conferma indirettamente che il livello di spore presente nell'aria dei due siti monitorati, era molto basso e probabilmente insufficiente a causare l'infezione attraverso i tagli di potatura nel periodo considerato.

La prova è stata ripetuta nei vigneti 1 e 4 eseguendo, questa volta, l'inoculazione artificiale sulle ferite di potatura con una sospensione conidica di *P. chlamydospora*, il patogeno più frequentemente isolato dalle nervature brune di piante sintomatiche in Trentino. Anche in questo caso sono state effettuate due potature, una all'inizio di dicembre e l'altra alla fine di febbraio. A distanza di 0, 1, 14, 30 e 90 giorni da ciascuna potatura, sono state inoculate 10 ferite su tralci di un anno con 40 µl di sospensione conidica ( $10^4$  conidi/ml). Il controllo è stato inoculato solo con acqua sterile. A tre mesi da ciascuna data di inoculo, i campioni sono stati prelevati e portati in laboratorio per verificare la colonizzazione del legno da parte del fungo. Contrariamente a quanto ci si aspettava, le ferite sono apparse maggiormente recettive nel caso di potatura tardiva (fine febbraio) rispetto alla potatura effettuata all'inizio della stagione invernale (primi di dicembre). Nel vigneto 4, nessuna ferita è risultata recettiva all'infezione da parte di *P. chlamydospora* dopo la prima potatura (fig. I.3). Per ciascuna potatura è stata calcolato l'integrale dell'incidenza della malattia nel periodo considerato e i valori relativi sono stati confrontati mediante test non parametrico per due campioni indipendenti; in entrambi i vigneti le ferite sono risultate essere significativamente più recettive dopo la potatura di fine febbraio rispetto a quella di dicembre ( $P \leq 0,05$ ). (tab. 2). Questo risultato contrasta, almeno in riferimento al Trentino, con le indicazioni relative al fatto che i tagli di potatura si cicatrizzano meglio, e sono conseguentemente meno recettive, se eseguiti tardi, a fine inverno-inizio primavera.

In entrambi i vigneti le ferite sono rimaste recettive fino a un mese dalla data di potatura e il periodo di maggiore recettività è quello che va dalla fine di febbraio alla fine di marzo.

I dati raccolti indicano che le ferite possono effettivamente rappresentare una via di penetrazione dei patogeni dell'esca, va anche considerato il rischio reale che l'infezione avvenga in natura, ossia se la quantità di spore presenti nell'aria sia sufficiente a determinare l'infezione. A tale scopo, è stata svolta una prova su piante in vaso per stabilire la concentrazione minima di conidi di *P. chlamydospora* e di *P. aleophilum* in grado di causare un'infezione. Le ferite sono state inoculate con sospensioni conidiche a concentrazione crescente (da 3 a 3.000 conidi/ferita) e con micelio fresco dei due agenti patogeni; in questo modo

è stato anche possibile confrontare l'efficacia dei due metodi d'inoculo (sospensione conidica e micelio). La prova è stata ripetuta in due periodi diversi (febbraio e giugno 2006). I risultati ottenuti hanno evidenziato percentuali di infezione molto basse dopo entrambe le potature; in generale si osserva un incremento delle percentuali di infezione all'aumentare della concentrazione delle sospensioni conidiche inoculate, ma le percentuali di infezione maggiori sono state ottenute mediante l'inoculo con micelio fresco, metodo risultato maggiormente efficace per entrambi i patogeni.

I risultati relativi di quest'ultima prova dimostrano che basse concentrazioni conidiche difficilmente determinano infezioni attraverso i tagli di potatura; è perciò probabile che sia necessaria un'elevata quantità di conidi nell'aria affinché questi propaguli possano giungere su una ferita e colonizzare il legno determinando una nuova infezione. Dal momento che i rilievi condotti in tre vigneti trentini nell'arco di tre anni hanno riscontrato la presenza di spore soltanto sporadicamente e in quantità bassissime, è ragionevole pensare che le spore non rappresentino, nei siti osservati, la principale via di infezione e che quindi, allo stato attuale, il rischio di una rapida diffusione della malattia può essere considerato basso.

Questa ipotesi è sostenuta anche dalla situazione generale della malattia in Trentino, che presenta valori di incidenza del mal dell'esca molto bassi e in debolissima crescita.

Ciò non significa che la situazione possa essere trascurata o che, nel caso in cui si verificano le condizioni ideali per la formazione e diffusione delle spore, il rischio di un incremento della malattia possa aumentare.

In Puglia, la recettività delle ferite è stata studiata nei mesi di gennaio, febbraio e marzo, in serra fredda su piante di vite di 5 anni di età della cv. Italia allevate in vaso. Alcuni tralci legnosi sono stati inoculati separatamente mediante sospensione conidica di *P. aleophilum* e *P. chlamydospora*. I risultati ottenuti indicano che i funghi inoculati sulla superficie di taglio tendono a invadere i tessuti sottostanti, fino a 16 cm, dopo tre mesi dal punto di inoculazione.

Quando la stessa sperimentazione è stata ripetuta su tralci verdi nei mesi di maggio, giugno e luglio, dopo 60 giorni, i tralci inoculati risultavano morti, sebbene i funghi siano stati reisolati. In queste condizioni sembra che l'epoca dell'inoculazione non influisca sull'invasione del fungo nei tessuti.

#### II.4.6 Traslocazione degli agenti patogeni attraverso la linfa

Lo studio relativo alla traslocazione dei funghi agenti del mal dell'esca mediante la linfa è stato seguito, in Puglia, per tre anni dal 2005 al 2007 in un vigneto cv. Italia mediante la raccolta della linfa sgorgante prima e dopo aver rinnovato il taglio di potatura all'inizio della vegetazione (marzo-aprile) da piante sintomatiche e da piante asintomatiche.

I risultati ottenuti dalle analisi di laboratorio non hanno evidenziato la presenza di agenti causali il mal dell'esca. Sporadicamente, e in basse percentuali, è stata rilevata la presenza di *Phomopsis viticola*, *N. parvum*, *D. seriata*, *Dothiorella sarmentorum* ed *Eutypa lata* nella linfa proveniente da piante sintomatiche. Dai campioni di linfa raccolti dalle piante asintomatiche la popolazione fungina isolata era composta da una bassa percentuale di specie appartenenti ai generi *Diplodia*, *Phomopsis* e *Pestalotiopsis* e, soprattutto, da specie non patogene comune-

**Tab. 3 - Specie fungine agenti di malattia del legno isolate (%) dalla linfa raccolta da piante malate e da piante apparentemente sane dai tagli di potatura nel 2005 e 2006 dalla cv. Italia**

Specie fungine	cv. Italia 2005				cv. Italia 2006			
	Pianta malata		Pianta sana		Pianta malata		Pianta sana	
	Linfa raccolta		Linfa raccolta		Linfa raccolta		Linfa raccolta	
	taglio rinn.	taglio inv.	taglio rinn.	taglio inv.	taglio rinn.	taglio inv.	taglio rinn.	taglio inv.
<i>Phomopsis viticola</i>	1,05	0	0	0	2,50	1,1	0	0
<i>Seimatosporium lonicerae</i>	0	0	1,0	0	0	0	0	0
<i>Seimatosporium lichenicola</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Neofusicoccum parvum</i>	3,0	2,1	0	1,0	0	0	0	0
<i>Diplodia seriata</i>	2,1	1,0	0	0	0	0	0	0
<i>Dothiorella sarmentorum</i>	1,5	3,0	0	0	1,0	0	0	0
<i>Eutypa lata</i>	1,0	5,0	0	0	2,0	0	0	0

**Tab. 4 - Specie fungine agenti di malattia del legno isolate (%) dalla linfa raccolta da piante malate e da piante apparentemente sane dai tagli di potatura nel 2007 dalla cv. Italia**

Specie fungine	cv. Italia 2007			
	Pianta malata		Pianta sana	
	Linfa raccolta		Linfa raccolta	
	taglio rinn.	taglio inv.	taglio rinn.	taglio inv.
<i>Phomopsis viticola</i>	1,68	0	1,0	2,1
<i>Seimatosporium lonicerae</i>	0	0	0	0
<i>Seimatosporium lichenicola</i>	0	0	0	0
<i>Neofusicoccum parvum</i>	2,7	2,4	0	1,2
<i>Diplodia seriata</i>	2,8	1,8	0,7	1,4
<i>Dothiorella sarmentorum</i>	1,4	2,8	0	0
<i>Eutypa lata</i>	1,1	3,8	0	0
<i>Penicillium spp.</i>	27,5	24,6	21,4	29,3

mente considerate specie ubiquitarie e polifaghe (tabb. 3-4). Tuttavia, alcuni Autori (Bruno e Sparapano, 2006b; Bruno e Sparapano, 2007a; Bruno *et al.*, 2007) in prove triennali hanno isolato gli agenti causali del “mal dell’esca” *P. chlamydospora*, *T. minima* e *F. mediterranea* direttamente dalla linfa sgorgante dalle ferite di potatura.

### II.4.7 Conclusioni

La sorgente dell’inoculo in natura è stata identificata, anche in Italia, nelle fruttificazioni fungine site sia sulle viti infette che su altre specie arboree. La mancata cattura di spore e/o conidi degli agenti del mal dell’esca in Trentino, associata alla recettività delle ferite di potatura protratta nel tempo, e il basso incremento della malattia riscontrato in quest’area andrebbero indirettamente a supportare quest’ipotesi.

Le ferite che si creano sui tralci di un anno per la costituzione del capo a frutto rappresentano una importante via di penetrazione dell’inoculo di *P. chlamydospora* e *P. aleophilum*. Esse, infatti, possono rimanere recettive a lungo indipendentemente dal periodo in cui vengono effettuate. Anzi, contrariamente a quanto ci si sarebbe potuto aspettare, le ferite effettuate più tardi si sono dimostrate più recettive in alcune annate. Inoltre, è stato dimostrato che le infezioni per questa via possono progredire con una certa rapidità all’interno del sistema vascolare confermando la capacità di questi funghi di muoversi all’interno dei vasi legnosi (Pascoe e Cottral, 2000; Feliciano e Gubler, 2001; Troccoli *et al.*, 2001). Uno degli aspetti più preoccupanti emersi dalle indagini è la capacità di *P. chlamydospora* e *P. aleophilum* di poter penetrare anche attraverso i tralci non lignificati. Questo significa che non solo le ferite di potatura invernale, ma anche quelle effettuate, per esempio, con la cimatura estiva possono costituire un pericolo. Pericolo reale, se si considera che la maggiore concentrazione di conidi nell’atmosfera è stata rilevata proprio durante i mesi primaverili ed estivi.

In conclusione, la programmazione della potatura invernale non sembra essere un mezzo utile a contrastare, per lo meno in maniera efficace, la diffusione dei funghi agenti del mal dell’esca. Alla luce dei risultati appare dunque molto importante trovare un sistema non solo efficace e duraturo, ma anche economico, per proteggere le ferite effettuate sui tralci dell’anno, sia durante il periodo invernale sia durante quello estivo.

## II.5 Suscettibilità al mal dell'esca del vitigno e influenza del portainnesto: osservazioni in Toscana e in Sardegna

**Premessa** di Guido Marchi

Nell'ambito delle popolazioni di individui appartenenti a una specie vegetale suscettibile a una data malattia, esiste una notevole variabilità tra i diversi genotipi nel livello di suscettibilità, ovvero nella incapacità di ridurre la crescita, il tasso di riproduzione o le attività dell'agente causale che portano alle manifestazioni della malattia stessa. Nel caso dell'esca bisogna poi ben distinguere tra resistenza alla malattia, tolleranza (che non è un grado inferiore di resistenza, bensì la capacità della pianta di recuperare il danno causato dal patogeno), e predisposizione a manifestare i sintomi fogliari dell'esca (una cultivar si ammala al pari di un'altra ma manifesta meno i sintomi della malattia, con minore frequenza o intensità). Comunque, anche nel caso dell'esca, sporadicamente, alcuni ricercatori si sono cimentati nella ricerca di differenze nella suscettibilità a livello cultivariale, ma ancora oggi, a distanza di oltre 100 anni dalla prima segnalazione della malattia, la ricerca non è mai andata oltre l'esecuzione di semplici indagini esplorative, ottenendo, per di più, risultati spesso contrastanti. Ad esempio, la cv. Semillon è risultata da un'indagine in Italia molto suscettibile (Marchi, 2001), mentre in Francia è considerata abbastanza resistente; la cv. Traminer in Trentino e la cv. Colorino in Toscana sono considerate resistenti ma quest'ultima cultivar si ammala come le altre (Mugnai, osservazioni personali); Cabernet Sauvignon e Sauvignon Blanc sono da tutti considerate molto suscettibili mentre Merlot appare poco colpita dall'esca. La cv. Trebbiano è risultata, in un'esperienza condotta in Toscana (Marchi, 2001), tra le meno suscettibili tra 17 varietà a bacca bianca monitorate; in altri ambienti è invece apparsa fortemente colpita dalla malattia (Vercesi, 1988).

Uno dei motivi dell'incertezza delle osservazioni sulla resistenza all'esca è sicuramente da ascrivere alle caratteristiche particolari della malattia. Negli anni venti-trenta del Novecento si era creduto inizialmente di aver individuato negli agenti di carie, *Phellinus igniarius* e/o *Stereum hirsutum*, la causa e già nel 1923, Marsais, riconduceva alla maggior ricchezza in tannini (polifenoli appartenenti al gruppo dei flavanoidi) la minor suscettibilità all'esca delle cultivar di *Vitis vinifera* innestate su *Vitis riparia* rispetto alle stesse cultivar innestate su *Vitis rupestris*, più povera in tannini. Questa prima osservazione sembrò trovare conferma, seppur indirettamente, nelle osservazioni di Arnoud e Arnoud (1931) e Baldacci e collaboratori (1962), ma non in quelle di Graniti (1960) che invece riportò una suscettibilità del piede all'azione degradativa prodotta dagli agenti causali della malattia. A partire dagli anni novanta, l'attenzione dei fitopatologi è andata via via sempre più focalizzandosi su altri

funghi, oggi classificati nei generi *Phaeoacremonium* e *Phaeomoniella*, e attualmente ritenuti gli agenti di quel un gruppo di malattie noto come *Complesso Esca* (es cap. I.4).

In questo nuovo quadro eziologico, Eskalen e colleghi (2001) hanno saggiato il livello di suscettibilità di 20 portainnesti diffusi in California a *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum* e *P. inflatipes*, quali agenti di una delle malattie del complesso esca: la malattia di Petri. Purtroppo, nonostante i saggi di laboratorio abbiano chiaramente indicato livelli diversi di suscettibilità dei diversi portainnesti ai diversi patogeni, non si è poi riusciti a trovare una correlazione tra questi risultati e l'incidenza della malattia di Petri in campo. In altre parole non è stata rilevata una relazione tra intensità dei sintomi interni, osservabili in corrispondenza dei tessuti legnosi, e tendenza all'espressione dei sintomi esterni (deperimento generalizzato, clorosi moderata del fogliame, graduale declino del vigore e della produttività) della malattia in vigneto da parte del nesto.

Similmente, anche in Italia, per quanto riguarda le relazioni tra tipo di portainnesto e incidenza dell'esca, ricerche condotte negli anni novanta (in particolare su Kober 5BB, 420A e SO4), hanno dato risultati negativi (Materazzi *et al.*, 1993; Minervini e Bisiach, 1995) o contrastanti (Marchi, 2001). I motivi del fenomeno sono molteplici e tra questi va sicuramente annoverato il *modus operandi* stesso delle ricerche eseguite. Siccome non è ancora possibile prevedere, se e quando una pianta sana si infetta, né se e quando la pianta infetta comincerà effettivamente a manifestare i primi sintomi fogliari, gli studi condotti sino a oggi in campo, sono stati effettuati in impianti già in produzione costituiti con materiale di propagazione il cui stato sanitario era ignoto e in cui la malattia, sebbene la sua distribuzione non fosse stata documentata, era già più o meno diffusa, esaminando piante che oltre che da *Pch* e/o *Pal* erano spesso già variamente colonizzate dagli agenti causali di altre malattie del legno quali carie bianca, eutipiosi o black dead arm. Inoltre, nel caso dell'esca, questo tipo di valutazioni sono enormemente complicate dal fenomeno della fluttuazione dei sintomi (vedi capitolo). Sebbene la/le cause di questo fenomeno sono ignote, le attuali conoscenze ci dicono che le piante infette manifestano i sintomi in maniera variabile, non solo in risposta a fattori dipendenti dall'interazione fra pianta e patogeni, i cui fattori virulenza individuati a oggi sono per altro ancora da caratterizzare, ma anche in dipendenza di fattori stagionali (pioggia e temperatura dell'aria), la cui intensità varia da un anno all'altro, e della co-presenza di altre patologie del legno (Christen *et al.*, 2007). Selezionatori e fitopatologi sanno bene che l'espressione e quindi la valutazione dei geni di resistenza richiede che il genotipo dell'ospite interagisca con quello del patogeno in un ambiente favorevole alla malattia ma nel caso dell'esca, purtroppo, questi parametri sono ignoti, o quantomeno ancora non ben definiti, e quindi non riproducibili. Appare evidente quindi che solo studi condotti in realtà agronomiche diverse e partendo dallo stesso materiale di propagazione il cui stato fitosanitario iniziale sia noto e monitorato con continuità, potranno fornire le informazioni necessarie per individuare, studiare e sfruttare le differenze genetiche esistenti tra le diverse varietà, nella suscettibilità all'esca.

### II.5.1 Incidenza del mal dell'esca su Cabernet Sauvignon, Chardonnay, Sangiovese e Trebbiano toscano in Toscana

G. Scalabrelli\*, R. Gucci, G. Caruso, C. Bertolla, L. Andreini, R. Viti

La diversa sensibilità della componente genetica alla sindrome del mal dell'esca è nota da tempo, tuttavia la carenza di osservazioni nello stesso ambiente rende poco generalizzabile la costruzione di una scala di sensibilità attendibile. Limitatamente alle osservazioni compiute su quattro vitigni aventi tre combinazioni di innesto, disposti a blocco randomizzato è emerso che il Cabernet Sauvignon (*fig. 1*) si è confermato particolarmente sensibile al mal dell'esca. In particolare, nella scala di sensibilità è superiore al Sangiovese e al Trebbiano toscano mentre lo Chardonnay è risultato il meno sensibile. Se prendiamo in considerazione la combinazione d'innesto si può notare come le piante autoradicate, manifestino sempre una minore incidenza di piante sintomatiche, a eccezione che sul Trebbiano toscano, mentre nelle combinazioni con 1103 Paulsen e con Kober 5BB si nota una maggiore percentuale di piante sintomatiche (*fig. 1*).

Osservazioni condotte in vigneti coetanei (10-13 anni) di Ansonica, Merlot, Sangiovese, Syrah e Vermentino, presenti in Maremma, hanno chiaramente indicato la elevata sensibilità del vitigno Ansonica, senza che tale sensibilità possa essere fatta risalire al diverso tipo di potatura. La presenza di 10 combinazioni di innesto in un vigneto sperimentale di Ansonica ha permesso anche di stabilire, nell'arco di un triennio, un diverso grado di sensibilità alla sindrome del mal dell'esca. Più in particolare, le piante che hanno presentato una minore

Portinnesto	Anno dei rilievi		
	2005*	2006	2007
1103P	14,06	38,33	83,80
110R	10,64	41,67	68,79
140Ru	1,79	36,67	84,21
157-11	5,36	38,89	79,36
41B	1,64	23,33	78,09
420A	7,37	20,00	76,88
775P	2,60	34,44	85,40
779P	3,13	23,89	73,22
Gravesac	6,18	50,00	88,27
K5BB	3,20	41,11	82,18
SO4	1,64	33,89	84,44

\* Non sono state considerate le piante morte negli anni precedenti.

infezione cumulata sono state quelle innestate su 110 Richter mentre la maggiore presenza di piante malate è stata registrata su Gravesac (*tab. 1*). La presenza non uniforme della sindrome nel vigneto randomizzato non ha consentito di evidenziare differenze significative tra gli altri portinnesti, anche molto diversi per vigoria e origine genetica. L'insieme delle informazioni ottenute da questi rilevamenti induce a ritenere che la presenza dell'innesto è fattore predisponente alla manifestazione dei sintomi classici e progressivi del mal dell'esca (foglie tigrate, necrosi internervali, necrosi delle foglie, caduta delle foglie, disseccamento de grappoli, e apoplezia ) mentre l'influenza del tipo di portinnesto non è sempre generalizzabile. In qualche caso, in funzione della sua vigoria, appare fattore predisponente (1103P, ad esempio); tuttavia, il Gravesac, che ha un vigore comparabile al 110R, diverge nettamente per la maggiore presenza di piante sintomatiche. Nell'impianto del vigneto sarebbe consigliabile, ove possibile, preferire vitigni più tolleranti alla malattia o, quanto meno, adottare tecniche colturali idonee a prevenire la manifestazione della malattia.

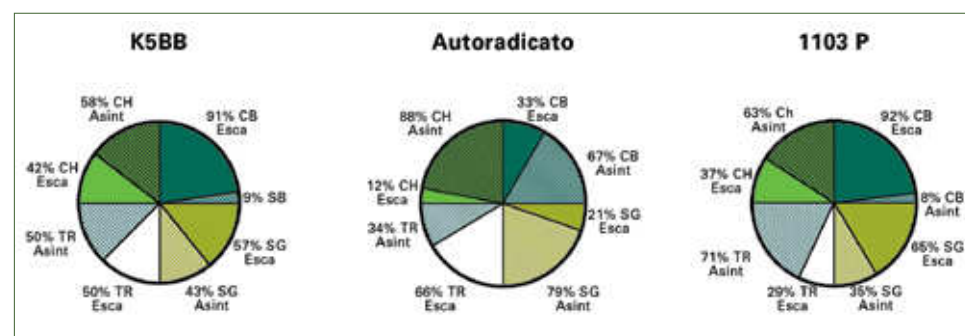


Fig. 1 - Percentuale di piante sintomatiche (esca) e apparentemente sane (asintomatiche), in funzione del portinnesto: 1103P, K5BB e autoradicato nei 4 vitigni (CB = Cabernet Sauvignon; TR = Trebbiano; SG = Sangiovese; CH = Chardonnay), presenti nel campo di Colignola (PI) nel triennio 2005-2007 (blocco randomizzato)

\* Università di Pisa email: gscalabrelli@agr.unipi.it

## II.5.2 Incidenza del mal dell'esca su Cannonau, Sauvignon Blanc e Cabernet Sauvignon in Sardegna

S. Serra\*, M.A. Mannoni, V. Ligios

Anche in Sardegna è stata valutata la predisposizione al mal dell'esca, oltre che di due cloni di Cannonau (70 e 362 su 110R), anche di due cloni di Sauvignon Blanc (ISV1 e R3 su SO4) e di due di Cabernet Sauvignon (R5 e 338 su 110R).

I tre vigneti monitorati erano situati nell'azienda vitivinicola Sella & Mosca, in provincia di Sassari, allevati a pergoletta sarda, sottoposti alle medesime tecniche colturali e a vendemmia meccanica. La manifestazione di sintomi di mal dell'esca è stata seguita dal 2002 al 2007 su oltre 500 viti per clone (*tab. 1b*). Al momento del primo rilievo i vigneti di Sauvignon Blanc, Cabernet Sauvignon e Cannonau avevano 13, 11 e 10 anni rispettivamente. Ogni anno sono stati registrati i sintomi sulla chioma della piante (tigrature tipiche; clorosi o necrosi del margine o del lembo fogliare, spesso accompagnati da defogliazione e avvizzimento della vegetazione e/o da disidratazione e seccumi dei grappoli). Inoltre, sono stati registrati i fenomeni di apoplezia e di mancata ripresa vegetativa, entrambi a carico di uno solo dei due cordoni o dell'intera pianta.

Nella *tab. 1* sono riportati i dati cumulati, cioè la percentuale di piante che hanno mostrato i sintomi cronici o di apoplezia almeno in un anno di rilievo o che hanno smesso di vegetare nel corso dei sei anni in esame. L'incidenza dei sintomi in tutte le categorie prese in considerazione è stata maggiore sulla cv. Sauvignon Blanc. Le viti della cv. Cabernet Sauvignon hanno fatto registrare valori intermedi per quanto riguarda i sintomi cronici, ma i più bassi per quanto riguarda i fenomeni di apoplezia e la mancata ripresa vegetativa. Sono state rilevate anche differenze per quanto riguarda la tipologia di sintomi cronici: molte piante di Sauvignon Blanc hanno manifestato solo sintomi aspecifici, mentre le tigrature hanno avuto una maggiore incidenza sulle altre varietà e in particolare su Cabernet Sauvignon. Lepiante o i cordoni morti non sempre avevano manifestato sintomi cronici di mal dell'esca o apoplezia negli anni precedenti.

Considerate le caratteristiche delle tre varietà ci si sarebbe potuta aspettare un'incidenza maggiore di sintomi sulla cv. Cannonau. Infatti, quest'ultima è la più vigorosa, seguita in ordine decrescente da Sauvignon Blanc e Cabernet Sauvignon. Di solito, sono le piante più vigorose a essere maggiormente soggette agli attacchi dei funghi del legno, fondamentalmente a causa del maggior numero di interventi cesori necessari a contenerne lo sviluppo, ma anche perché possono entrare più facilmente in uno stato di stress, non solo idrico. Certamente, non si può trascurare del tutto il fattore età, anche se gli anni che separano le

Tab. 1 - Incidenza percentuale di viti delle varietà Sauvignon Blanc (SAUV), Cabernet Sauvignon (CABS) e Cannonau (CAN) che hanno manifestato sintomi cronici e/o acuti in almeno un anno dal 2002 al 2007								
Varietà	Clone/PI	n. piante*	Sintomi cronici		Apoplezia		Cordoni o piante morte	
SAUV	ISV1/SO4	525	73,1	68,5	15,4	13,6	37,3	33,1
	R3/SO4	521	63,9		11,7		28,8	
CAB S	R5/110R	525	71,8	58,5	1,9	3,0	10,5	9,9
	338/110R	526	45,2		4,2		9,3	
CAN	70/110R	521	50,1	48,1	6,3	7,4	18,4	24,6
	362/110R	519	46,1		8,5		30,8	

\* Numero di piante in piedi alla fine dell'estate 2001 su cui sono state calcolate le percentuali.

tre varietà studiate in questa indagine sono pochi per poter determinare differenze statisticamente significative. Un elemento importante, invece, può essere il portinnesto. Le combinazioni Cabernet Sauvignon e Cannonau su 110R presentano spesso problemi di disaffinità, evidenziati da un cospicuo ingrossamento del punto d'innesto, che potrebbero aver limitato la vigoria del Cannonau in particolare. Ciò può aver causato una minore incidenza dei fenomeni di apoplezia o di mancato germogliamento rispetto al Sauvignon Blanc che invece presenta una buona affinità col portinnesto SO4. Inoltre, i valori elevati di sintomi acuti e cronici sulla cv. Sauvignon Blanc sono dovuti essenzialmente al clone ISV1, allevato su una zona di terreno con maggiore capacità idrica e questo può essere stato determinante nel conferire un maggior vigore vegetativo in un clima tendenzialmente siccitoso.

Esaminando più in particolare le differenze tra i cloni, anche in questo caso sembra che esse siano dovute più a fattori ambientali che genetici. Per quanto riguarda la cv. Sauvignon Blanc, il tipo di terreno su cui sono allevati i due cloni è probabilmente, come già detto, la principale causa della maggiore incidenza di sintomi cronici e di cordoni morti sul clone ISV1 rispetto al clone R3. Infatti, si tratta di cloni di provenienze italiana che partono da una base genetica comune.

Al contrario, tra i due cloni di Cabernet Sauvignon potrebbero esistere differenze genetiche più marcate poiché il clone R5 è di origine italiana, quello 338 è di provenienza francese. Oltre a ciò, le differenze significative tra l'incidenza dei sintomi cronici, maggiore sul clone R5, e dei fenomeni di apoplezia, maggiore su 338, possono essere dipese anche da fattori esterni. Per esempio, le viti del clone R5 hanno manifestato un'elevata incidenza di sintomi della virosi "accartocciamento fogliare" e questo potrebbe aver favorito l'espressione dei sintomi cronici del mal dell'esca. Un certo sinergismo tra queste due malattie è stato già rilevato in altre zone (Borgo, comunicazione personale). Per quanto riguarda le differenze significative tra l'incidenza di apoplezia, bisogna considerare che le viti monitorate del clone R5 si trovano in prossimità di una formazione rocciosa artificiale (creata con le pietre recuperate dallo scasso

\* Università di Sassari email: salvase@uniss.it



profondo del terreno) che favorisce l'ombreggiamento e la scarsa circolazione dell'aria, limitando i fenomeni di traspirazione intensa e quindi la predisposizione all'apoplezia.

La frequenza di viti con sintomi cronici o con apoplezia non differisce tra i due cloni di Cannonau, entrambi di origine francese e quindi con una base genetica comune, ma aumentano in maniera significativa i fenomeni di mancato germogliamento totale o parziale sul clone 362. In questo caso non è stato possibile individuare differenze che possano aver causato tale comportamento.

## Conclusioni

L'insieme delle informazioni ottenute dai rilievi in Toscana induce a ritenere che la presenza dell'innesto è fattore predisponente alla manifestazione dei sintomi classici e progressivi del mal dell'esca (foglie tigrate, necrosi internervali, necrosi delle foglie, caduta delle foglie, disseccamento de grappoli, e apoplezia) mentre l'influenza del tipo di portainnesto non è sempre generalizzabile. In qualche caso, in funzione della sua vigoria, appare fattore predisponente (1103P, ad esempio); tuttavia, il Gravesac, che ha un vigore comparabile al 110R, diverge nettamente per la maggiore presenza di piante sintomatiche.

Le osservazioni in Sardegna portano invece a ritenere che le differenze varietali o tra cloni nella manifestazione dei sintomi di mal dell'esca possano dipendere da molti fattori, non sempre di natura genetica. Tuttavia, si può sottolineare che, a causa dell'irregolarità con cui si manifestano i sintomi fogliari, uno studio di questo tipo può dare indicazioni sulla predisposizione delle piante a manifestare un certo tipo di sintomatologia e non sulla vera suscettibilità all'attacco dei patogeni. Per far ciò bisognerebbe effettuare un rilievo distruttivo e valutare il grado di alterazione del legno.

## III. Gravità e diffusione della malattia nei vigneti di alcune regioni italiane



## Premessa

Giuseppe Surico

Già nei primi anni del Novecento l'apoplessia (= esca) era considerata endemica in tutte le principali regioni viticole del mondo con incidenze annuali che variavano dal 2-5 al 15-25%. In un articolo del 1909 Vinet riferisce di gravi danni occorsi nel 1908 in numerosi vigneti a Beaulieu, nell'antica provincia dell'Angiò (in francese Anjou), corrispondente all'attuale Dipartimento di Maine-et-Loire la cui capitale è Angers. In particolare, Vinet riferisce di una vigna di 20 anni di Chenin blanc (innestata su *Rupestris* Martin, York Madeira e Jacques), allevata a Guyot, che aveva fornito 70 ettolitri di vino per ettaro nel 1896 e 79 nel 1899. Dopo queste date la produzione ha cominciato a diminuire, ma i casi di apoplessia si erano verificati già da qualche anno tanto che era stato necessario sostituire, dopo soli 7 o 8 anni dall'impianto, da 125 a 200 ceppi per anno e per ettaro. Nel solo 1908 fu necessario rimpiazzare 905 viti in un'area di soli 4 ettari.

In un altro articolo pubblicato nel 1923 da Moreau e Vinet sui *Comptes rendus* dell'Accademia di Agricoltura di Francia (*Contribution à l'étude de l'apoplexie de la Vigne et de son traitement*) gli autori seguono per tre anni consecutivi gli sviluppi dell'apoplessia in un vigneto di 1,5 ettari con 6.750 viti a Belle-Beille, sempre nel Dipartimento di Maine-et-Loire. Fu accertato che la malattia, ritenuta peculiare del Sud della Francia, era ben presente anche nell'Ovest. Nel 1920 il numero di viti morte furono il 35%, nel 1921 il 10% e nel 1922 il 65%. L'esame accurato delle viti morte portò gli autori ad affermare che il 90% nel 1920 e l'80% nel 1921 di esse era attaccato da quello che era allora ritenuto il "fungo dell'esca", *Fomes igniarius*.

Gard riferisce in un suo articolo del 1922 che la malattia era risultata meno grave nel 1923 rispetto al 1922, ma nei terreni calcarei intorno a Cognac l'incidenza aveva raggiunto il 25%.

Un dato riferito all'Italia dei primi anni del Novecento ce lo fornisce Viala: dal 1904 al 1913, il 32% delle viti andò distrutto nei vigneti della fattoria La Badessa, a Squinzano (Lecce). Successivamente, l'uso dell'arsenito di sodio ha in qualche modo ridimensionato il problema "esca" anche se sono continuate le segnalazioni di elevate incidenze in vigneti di tutto il bacino del Mediterraneo. In Italia si possono citare le segnalazioni di Graniti (1960) e di Baldacci *et al.* (1962).

Si è ritornati a rilevare elevate e diffuse incidenze di mal dell'esca dal 1986 in poi. Nell'ambito del progetto interregionale è stata monitorata l'incidenza della malattia in quasi tutte le regioni partecipanti al progetto stesso. Di seguito si riportano i dati raccolti per l'Abruzzo, l'Emilia-Romagna, la Liguria, le Marche, il Piemonte, la Puglia, la Sardegna, la Sicilia, la Toscana, il Trentino, l'Umbria e il Veneto.

### III.1 Il mal dell'esca della vite in Abruzzo

F. Calzarano\*, V. D'Agostino

Già nel 1993, similmente a quanto stava accadendo in altre zone vitate del territorio italiano, veniva registrata nella regione Abruzzo una notevole diffusione della malattia, segnalata da osservazioni estemporanee degli operatori del settore. Le preoccupazioni dell'intero comparto vitivinicolo stimolarono quindi la realizzazione di indagini atte in prima istanza a definire incidenza e gravità della malattia nelle aree viticole del teramano che vennero avviate nel 1994 nell'ambito del progetto "Studio per la messa a punto di nuove metodologie di difesa contro il mal dell'esca della vite" finanziato dalla Fondazione della Cassa di Risparmio della Provincia di Teramo. In questo contesto venne monitorata un'area di oltre 43 ettari coltivata con i vitigni Montepulciano d'Abruzzo e Trebbiano d'Abruzzo e furono scelti 11 vigneti situati nelle diverse zone viticole della provincia, idonei alla prosecuzione degli studi, e allevati per la quasi totalità con la cv. Trebbiano d'Abruzzo, risultata maggiormente colpita dalla malattia. I risultati ottenuti dalle osservazioni condotte in tali appezzamenti, di età variabile tra i 15 e i 25 anni, all'inizio dei rilievi, e che ricoprivano complessivamente una superficie di 93.114 mq con 10.170 ceppi di vite, evidenziarono un'incidenza reale della malattia (ossia nel computo venivano considerate anche le piante malate soggette ai fenomeni di remissione dei sintomi) variabile nel 2002, ultimo anno di indagine, dal 23,1% al 68,7% (Cesari *et al.*, 2005). In seguito i rilievi delle manifestazioni dell'esca proseguirono in alcuni di questi vigneti mentre altri furono estirpati in ragione della età avanzata e della compromissione dovuta alla presenza della malattia. In particolare, nell'ambito del progetto MESVIT è stato possibile ottenere diverse informazioni sull'evoluzione della malattia nell'arco di un periodo di 15 anni prolungando i monitoraggi fino al 2008 in tre vigneti, fra quelli citati, situati in tre differenti aree viticole della provincia di Teramo: Controguerra e Giulianova, con età, a oggi, di 32 anni e Mosciano, 34 anni. In tali impianti sono stati valutati ogni anno l'incidenza manifesta della malattia (numero di piante manifestanti sintomi fogliari), l'incidenza nascosta (numero di piante malate che occultano i sintomi nell'anno del rilievo), l'entità dei colpi apoplettici e il numero di piante morte a causa della malattia, in rapporto al numero di piante in piedi nel 1994, anno di inizio delle rilevazioni, riuscendo a valutare l'evoluzione della malattia in un periodo di tempo considerevole della vita produttiva dei vigneti (figg. 1-3).

I risultati ottenuti nei tre vigneti esaminati evidenziano come sia necessario ricorrere a un periodo prolungato di osservazioni annuali dei sintomi fogliari per valutare l'incidenza

\* Università di Teramo email: fcalzarano@unite.it

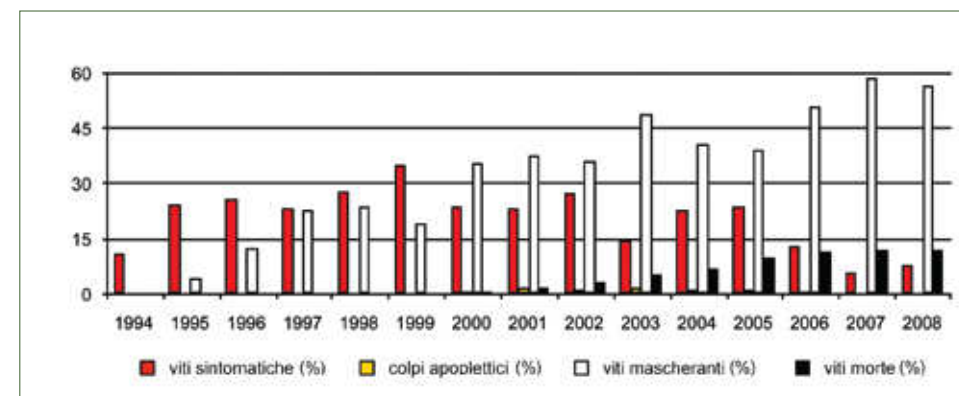


Fig. 1 - Evoluzione del mal dell'esca nel vigneto di Controguerra (TE) in un periodo di 15 anni

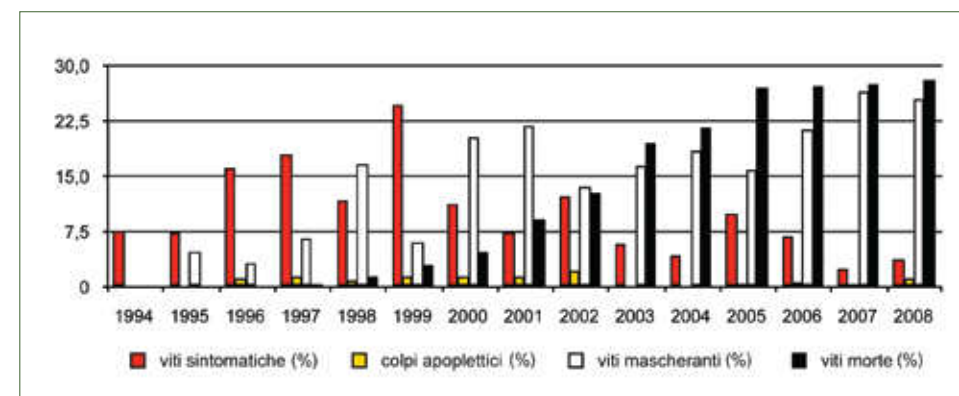


Fig. 2 - Evoluzione del mal dell'esca nel vigneto di Giulianova (TE) in un periodo di 15 anni

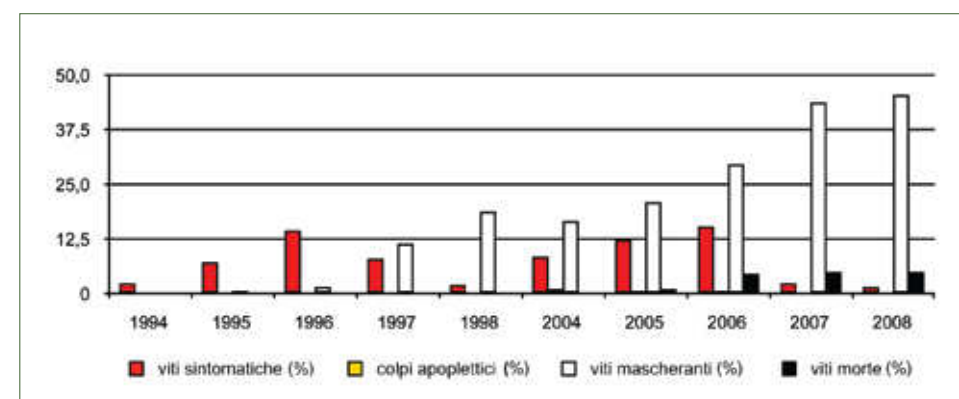


Fig. 3 - Evoluzione del mal dell'esca nel vigneto di Mosciano (TE) in un periodo di 15 anni

della malattia; il fenomeno di remissione delle manifestazioni fogliari cui sono soggette le viti colpite da esca impone la ripetizione dei rilievi per un periodo superiore ai 10 anni al fine di classificare tutte le viti affette dalla malattia, dal momento che una vite malata è passibile di occultare i sintomi anche per un tale periodo di tempo. Nel 2008, ultimo anno dei rilievi, l'incidenza complessiva della malattia data dalla somma delle viti sintomatiche, delle viti mascheranti il sintomo, dei colpi apoplettici e delle viti morte risultava nei tre vigneti di Controguerra, Giulianova e Mosciano pari rispettivamente al 78,38%, 58,83% e 53,49%. Nonostante tale non trascurabile bilancio complessivo dovuto alla presenza dell'esca, l'accorciamento della vita produttiva del vigneto, dato dal numero di piante morte in conseguenza dello stato patologico, è risultato non particolarmente elevato, più evidente nel vigneto di Giulianova, 28,08% nel 2008, e sensibilmente inferiore negli altri due impianti, 12,43% e 5,38% a Controguerra e Mosciano rispettivamente. Anche nel caso del primo vigneto citato, la percentuale di piante che soccombono in conseguenza della malattia, stimata nell'ultimo anno di rilievi, non appare particolarmente elevata se rapportata al lungo periodo di presenza dell'ampelopatia nel vigneto che probabilmente era già comparsa prima del 1994, anno di inizio dei monitoraggi. Tale valutazione, che sostiene una certa longevità delle viti colpite da esca, insieme alla scarsa incidenza dei colpi apoplettici, nelle condizioni dei vigneti del teramano osservati, e all'evidenza che solo le viti sintomatiche contribuiscono a ogni vendemmia allo scadimento qualitativo del prodotto, date le simili caratteristiche delle uve di viti asintomatiche e delle uve di viti sane (Calzarano *et al.*, 2004b) ribadisce l'importanza degli studi tendenti alla comprensione dei meccanismi responsabili dell'insorgenza dei sintomi fogliari e dei conseguenti interventi che potranno essere messi a punto al fine di ottenere la riduzione delle manifestazioni fogliari. Tra i fattori coinvolti nella manifestazione dei sintomi sembra assumere una certa rilevanza l'entità delle precipitazioni, monitorate nei siti di ubicazione dei vigneti osservati e nei medesimi anni dei rilievi delle espressioni fogliari; in particolare è sembrata sussistere una relazione tra le piogge ingenti cadute nel periodo giugno-luglio e la massiccia manifestazione dei sintomi nei periodi successivi della stagione, contrariamente a quanto avveniva nelle annate in cui il decorso del bimestre citato, e in generale della stagione, si mostrava più siccitoso (Calzarano e Di Marco, 2007), similmente a quanto rilevato in altri studi (Surico *et al.*, 2000a; Marchi *et al.*, 2006).

Nei due vigneti di Controguerra e Giulianova, negli anni 2006 e 2007, sono stati eseguiti tre rilievi dei sintomi fogliari a partire dal mese di giugno fino alla terza decade di settembre, periodo nel quale l'espressione dei sintomi risulta, nella zona indagata, al suo apice, nell'intento di verificare l'inizio delle manifestazioni della malattia nella stagione vegetativa. Nel 2007 i primi due rilievi sono stati effettuati in ritardo rispetto alle date scelte nel 2006 per via della scarsa presenza di viti sintomatiche, dovuta con buona probabilità al decorso della stagione particolarmente siccitoso. Ad ogni modo, in entrambi i vigneti e anni di osservazione, il primo rilievo, effettuato a fine giugno nel 2006 e i primi di luglio nel 2007, ha permesso di registrare l'assoluta assenza di manifestazioni della malattia, similmente a quanto già emerso nei monitoraggi degli anni precedenti, permettendo di attribuire alla seconda decade del mese di luglio, nel caso della cv. indagata, il Trebbiano d'Abruzzo, e nei siti di ubicazione dei vigneti osservati, l'inizio delle espressioni della malattia, a prescindere dal particolare decorso della stagione vegetativa (*fig. 4*). La massima incidenza delle tigrature

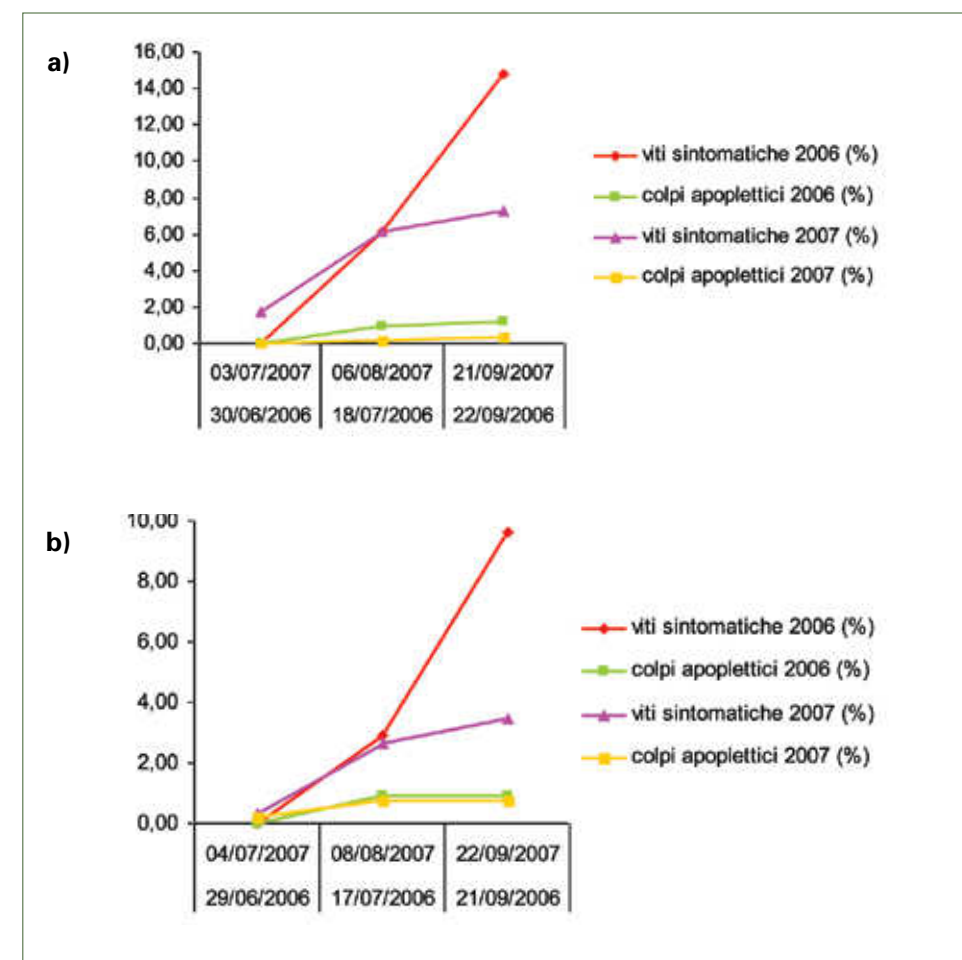


Fig. 4 - Comparsa e andamento nella stagione vegetativa dei sintomi fogliari e dei colpi apoplettici nei vigneti di Controguerra (a) e Giulianova (b)

fogliari, a conferma di quanto affermato in precedenza, è stata raggiunta, in entrambi i vigneti e in ognuno dei due anni indagati, nel mese di settembre, in particolare, nella seconda decade, in concomitanza con la data di raccolta della cultivar in oggetto. Nel contesto dei vigneti in esame, l'incremento dei sintomi fogliari, cui si è assistito nel passaggio dal secondo al terzo rilievo, diveniva particolarmente marcato a partire dal mese di agosto. Anche i colpi apoplettici si sono verificati a partire dal mese di luglio, ma contrariamente ai sintomi fogliari, registrati in aumento esponenziale da tale momento della stagione in poi, hanno raggiunto il loro massimo proprio in tale mese o sono stati soggetti solo a un debole incremento nella parte successiva della stagione (*fig. 4*).

### III.2 Il mal dell'esca della vite in Emilia-Romagna

S. Di Marco\*, F. Osti

Agli inizi degli anni novanta furono condotte indagini sulla presenza dell'esca nel territorio regionale, patologia allora ritenuta tipica di impianti maturi. Tali indagini, finalizzate alla verifica dell'efficacia di applicazioni di fungicidi a singole piante infette, contribuirono a evidenziare una presenza generalizzata di esca in impianti di oltre 10-15 anni delle cultivar Cabernet, Cabernet-Sauvignon e Pignoletto nella zona dei colli bolognesi; Albana e Sangiovese nell'imolese e nel faentino; Sangiovese e Trebbiano in Romagna; Barbera e Bonarda nel piacentino; Sauvignon e Malvasia nel parmense; Lambrusco Salamino a Modena e Reggio Emilia. Furono inoltre segnalati casi crescenti di manifestazione di mal dell'esca su impianti di 5-6 anni (CRPV Relazione tecnica 1999). Negli anni successivi, la manifestazione dell'esca non ha mostrato segni di riduzione, eccezion fatta per l'anno 2003, anomalo per le elevate temperature e scarsa piovosità (Schär *et al.*, 2003) e non favorevole all'espressione delle malattia (Marchi *et al.*, 2006). Tuttavia, anche nel 2003 l'esca fu segnalata come malattia in continua espansione e fonte di preoccupazione per i viticoltori (Provincia di Ravenna, Settore Politiche agricole e Sviluppo rurale, 2004).

Nel quinquennio 2003-2007 sono state condotte osservazioni in diverse zone viticole del territorio regionale. I rilievi sono stati effettuati nel momento di maggiore espressione della malattia, valutando la percentuale di piante che manifestavano sintomi sul totale delle piante esaminate. I dati sono stati raccolti in una mappa (*fig. 1*) ed espressi come esca manifesta ed esca cumulata, corrispondenti a incidenza annuale e cumulata della malattia (Marchi *et al.*, 2006; Di Marco e Osti, 2008). Analisi effettuate su alcune piante di ogni appezzamento hanno permesso di evidenziare zone necrotiche di legno bruno e duro e zone cariate. Isolamenti effettuati hanno confermato la presenza dei microrganismi associati al complesso dell'esca nella condizione di esca propria.

In provincia di Bologna, sono state effettuate indagini nella zona DOC "Colli Bolognesi". I risultati ottenuti indicano una diffusione della malattia negli impianti del territorio oggetto d'indagine e confermano quanto emerso in analoghe osservazioni condotte in altri areali di coltura, circa fluttuazione dei sintomi nel corso degli anni (*tab. 1*). Si noti in tal senso quanto rilevato nel vigneto in località Ponte Ronca, cv. Pignoletto, già oggetto di rilevamento nei 2 anni precedenti e in cui, a fronte di incidenze stagionali di esca variabili tra 1,7% e 7% (2007) l'incidenza cumulata mostra valori del 34%. Analoga preoccupante forbice tra quanto si mostra in una determinata annata e le piante certamente malate è presente in

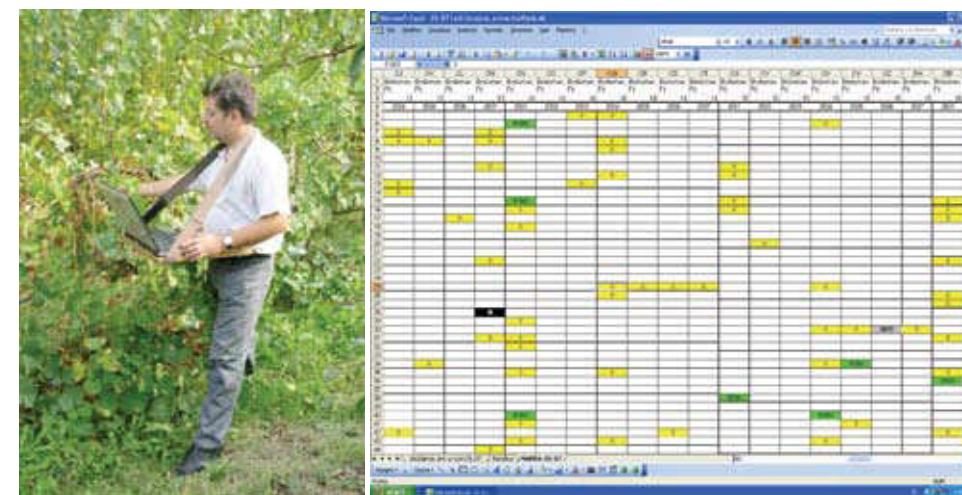


Fig. 1 - Il rilevamento dell'esca in vigneto è stato effettuato registrando su foglio elettronico la presenza di sintomi della malattia per ogni singola pianta (a sinistra) ed è stata predisposta una mappa relativa ai rilievi effettuati in tutti gli anni di osservazione (a destra)

Tab. 1 - Incidenza annuale e cumulata registrata sulle diverse varietà e nelle diverse zone della zona Doc "Colli Bolognesi"												
Località	Cultivar	Età	Esca manifesta (%)					Esca cumulata (%)				
			2003	2004	2005	2006	2007	2003	2004	2005	2006	2007
Castel San Pietro	Sangiovese	11	0,7	7,5	9	11	—	0,7	8,5	17	27	—
Ponte Ronca	Pignoletto	11	1,7	9	6	4	7	20	27	31	33	34
Zola Predosa	Pignoletto	12	0	0,1	0	0	—	0	0,1	0,1	0,1	—
Zola Predosa	Sauvignon	13	2	13	2,8	2,9	5	2	14	15	17	21
Zola Predosa	Riesling	13	1,6	10	5	4	9	1,6	11	15	18	29
San Giovanni P.	Montuni	13	9	54	—	—	—	9	56	—	—	—
San Giovanni P.	Pignoletto	14	1,6	9	5	—	—	1,6	10	11	—	—
Montevoglio	Pignoletto	15	1,6	11	12	7	18	1,6	11	17	21	30
Castel San Pietro	Trebbiano	15	0,7	9	4	8	10	0,7	9	13	18	25
Castel San Pietro	Albana	16	—	10	10	15	12	—	10	19	26	33

\* CNR - IBIMET, Bologna email: s.dimarco@ibimet.cnr.it

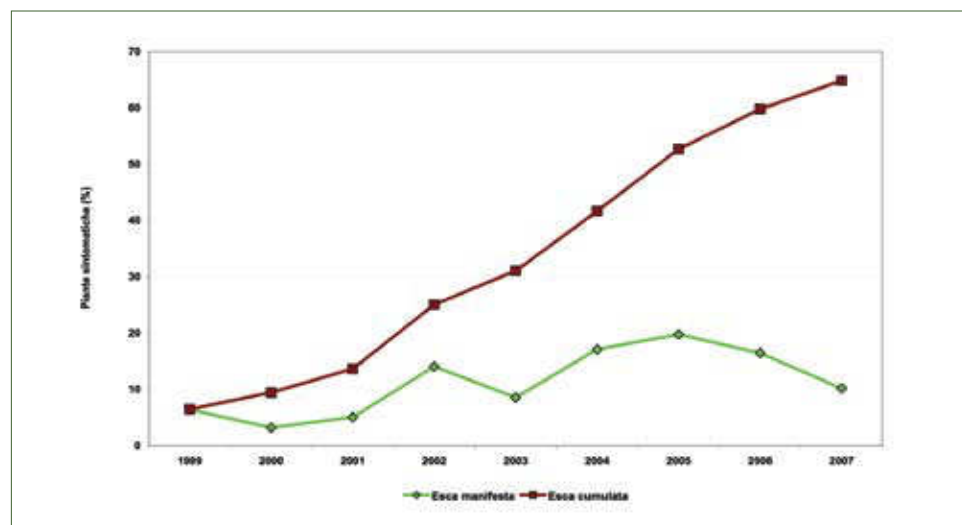


Fig. 2 - Incidenza annuale e cumulata registrata sulla varietà Albana, zona Colli Faentini (RA)

pressoché tutti gli impianti monitorati. Soltanto l'impianto di Pignoletto di 12 anni mostra una quasi totale e inspiegabile assenza di manifestazione della malattia, capillarmente diffusa in tutto il territorio monitorato.

In Romagna sono state realizzate indagini territoriali basate su stime d'incidenza di campioni di circa 70-100 piante e un monitoraggio puntuale e poliennale su un impianto della cv. Albana, unica DOCG dell'Emilia Romagna, ubicato nella collina imolese-faentina. I dati sono raccolti nella *fig. 2*.

Anche in questo caso, il vigneto, indagato dalla prima comparsa della malattia (1999) ed espantato nel 2008, mostra una diffusione della mal dell'esca, in termini di incidenza annuale e cumulata, in linea con quanto rilevato in altre aree viticole italiane e internazionali.

I dati relativi alle stime effettuate su campioni di piante in vigneti delle province di Forlì e Cesena, evidenziano una maggior diffusione della malattia nella cultivar Cabernet-Sauvignon. La cultivar è presente come impianti giovani o di oltre 20 anni. In questi ultimi impianti, i dati raccolti hanno permesso di verificare, nel 2007, un'incidenza molto elevata, variabile tra 30 e 40%. I vigneti di 5-7 anni di età hanno mostrato percentuali di piante con sintomo di esca mediamente del 2-5%.

L'esca è apparsa meno diffusa sulla cultivar Trebbiano (10-15% di piante sintomatiche) la cui forma di allevamento (cordone speronato) prevede un periodico rinnovo del tralcio, operazione che, pur favorendo le occasioni d'infezione, potrebbe non escludere una condizione di minore probabilità di manifestazione della malattia.

I dati relativi a indagini effettuate in vigneti ubicati alle province di Piacenza e Parma sono stati ricavati da una semplice stima della presenza della malattia e comprendono anche impianti inferiori a 5 anni, in cui la malattia non si era ancora manifestata. Sono stati effettuati controlli nella zona DOC "Colli piacentini" e "Colli di Parma" sulle vallate del Treb-

bia, Vezzeno, Nure, Arda e Tidone (Chiusa *et al.*, 2008). Considerando globalmente i dati raccolti, l'indagine indica una capillare diffusione della malattia nel territorio, nell'ambito del quale sono state visitate oltre 200 aziende durante i 4 anni di verifica.

Analoghe stime sono state effettuate nelle province di Modena e Reggio Emilia, nelle zone DOC del Lambrusco e "Colli di Scandiano e di Canossa". Le indagini condotte in questi ultimi anni hanno permesso di evidenziare la comparsa della malattia a partire dall'ultima decade di maggio. Le varietà più attaccate sono il Lambrusco salamino, per le uve nere; Montuni, Pignoletto e i Trebbiani nell'area modenese, Spergola e le Malvasie nel reggiano per le varietà a bacca bianca. Nel triennio sono state individuate manifestazioni inattese anche su cultivar considerate "meno a rischio", come l'Ancellotta e il Lambrusco grasparossa. In entrambe le province si segnala una progressiva diffusione dei sintomi (1-5%) su impianti di giovane età (5-8 anni). La cosa sembra coincidere con il ricorso crescente alle operazioni meccanizzate a carico della pianta. A ciò si sommano evidenti deperimenti dei cordoni ladove si eseguano tagli "rasenti" al legno (questo sia in fase di potatura interamente manuale sia in rifinitura a quella meccanica). Un ultimo aspetto preoccupante è il frequente ripresentarsi dei sintomi anche su piante capitozzate, nonostante la sensazione di aver operato con tempestività e applicando le misure di disinfezione da sempre suggerite.

#### Ringraziamenti

Si ringraziano i dott.ri Giovanni Nigro (CRPV), Massimo Scannavini (Astra - Innovazione e Sviluppo) Bruno Chiusa, Valentino Testi e Anselmo Montermimi (Consorzio Fitosanitario Provinciale di Piacenza, Parma, Reggio-Emilia e Modena) e la d.ssa Marisa Fontana (enologa).

### III.3 Il mal dell'esca della vite in Liguria

B. Pesenti Barili\*, M. Ghironi

L'attività di monitoraggio è stata svolta dal Centro di Agrometeorologia Applicata Regionale (CAAR) – Settore Servizi alle Imprese agricole, nell'ambito del Programma "Azioni tecniche specialistiche e di valorizzazione dell'agricoltura ligure – Ambito: Viticoltura".

L'indagine è stata effettuata a fine estate-inizio autunno 2008, sui vitigni a bacca rossa e bianca presenti in alcuni vigneti della rete di monitoraggio della Regione Liguria (fig. 1). Le varietà considerate sono state quelle più diffuse sul territorio regionale, in particolare *Vermentino* e *Pigato*.

Nella *tab. 1* sono riportati i risultati dei rilievi, suddivisi per zona geografica. In particolare, sono state raggruppate le province di Savona e di Imperia nel Ponente ligure e quelle di La Spezia e di Genova nel Levante ligure. Mediamente le superfici vitate rilevate sono state all'incirca di 1-2 ettari a Levante; di poco inferiori all'ettaro a Ponente. Nei vigneti del Levante l'incidenza della malattia è risultata in molti casi inferiore all'1%. Invece, nel Ponente, l'incidenza è stata leggermente superiore, soprattutto in vigneti a bacca rossa, raggiungendo in un caso il 4%.

Nella *tab. 2* è riportata la distribuzione percentuale delle piante colpite da mal dell'esca in tutti i vigneti esaminati, raggruppate per classi di età. Dal confronto fra vitigni a bacca bianca e a bacca nera emerge una netta distinzione nella distribuzione di piante colpite sulla base dell'età. Per quanto riguarda invece i due vitigni più rappresentativi, si nota come la distribuzione della malattia nel caso del *Vermentino* vari a seconda della classe di età, mentre nel caso del *Pigato* la quasi totalità delle piante colpite (97%) è di età superiore o uguale a 10 anni.

**Tab. 2 - Distribuzione percentuale delle piante colpite da mal dell'esca raggruppata per classi di età dei diversi vitigni**

Varietà	Classi di età (anni)			
	0 - 5	5 - 10	10 - 20	> 20
Vermentino*	17%	33%	38%	12%
Pigato*	—	3%	41%	56%
Granaccia*	100%	—	—	—
Albarola*	—	91%	9%	—
Barbarossa*	50%	50%	—	—
Dolcetto*	—	—	100%	—
Rossese**	18%	12%	70%	—
Cabernet Sauvignon**	—	—	100%	—
Sangiovese**	—	—	80%	20%
Barbera**	71%	—	29%	—

\* Vitigni a bacca bianca; \*\* Vitigni a bacca nera.



Fig. 1 - Inquadramento territoriale dei vigneti oggetto di monitoraggio

Per quanto riguarda i vitigni a bacca nera si può notare come nel Rossese, Cabernet Sauvignon e Sangiovese, la maggioranza delle piante (oltre il 70%) sia compresa nella fascia di età 10-20 anni, mentre per il Barbera quasi il 72% delle piante colpite sia composto da piante di età inferiore ai 5 anni. È comunque significativo il fatto che in diversi casi sono stati rilevati sintomi di esca su piante nelle fasce di età 0-5 e 5-10 anni.

A titolo di esempio si riporta in *fig. 2* la distribuzione spaziale delle piante di vite sintomatiche nel 2008 in un vigneto a Ortonovo, in provincia di La Spezia. Si nota un raggruppamento delle viti sintomatiche solo in una zona del vigneto.

**Tab. 1 - Incidenza percentuale media del mal dell'esca in diversi vitigni della Liguria e numero di vigneti monitorati**

Varietà	Ponente ligure		Varietà	Levante ligure	
	n. vigneti	%		n. vigneti	%
Vermentino	3	0,4	Vermentino	5	0,3
Pigato	6	1,2	Albarola	2	1,3
Granaccia	1	2,0	Sangiovese	2	0,1
Barbarossa	1	0,2	Cabernet Sauvignon	1	0,5
Rossese	3	4,0	Dolcetto	1	0,3
			Barbera	2	0,2

\* Regione Liguria-CAAR, Sarzana (SP) email: beatrice.pesenti@regione.liguria.it



Fig. 2 - Distribuzione spaziale delle piante colpite in un vigneto del Levante ligure (Ortonovo, SP)

A commento dei dati rilevati si precisa che i rilievi effettuati hanno riguardato, almeno per ora, un solo anno e che nella maggior parte dei vigneti monitorati è uso estirpare le piante colpite dall'esca al momento della potatura invernale. L'incidenza rilevata misura dunque la cosiddetta esca manifesta (frazione di piante ammalate che manifesta ogni anno i sintomi fogliari dell'esca) e tale incidenza potrebbe risultare sottostimata poiché potrebbero esserci nei vigneti monitorati piante ammalate che non hanno ancora cominciato a manifestare i sintomi. I rilievi che saranno effettuati nei prossimi anni potranno permettere di valutare più esattamente lo stato del mal dell'esca in Liguria, che al momento si presenta preoccupante ma non grave.

#### Ringraziamenti

Si ringraziano i tecnici rilevatori per i sopralluoghi nei vigneti: dott. E. Cafici, agt. A. Monticelli, dott. L. Calcagno, dott. C. Merlini, agt. D. Passaniti.

## III.4 Il mal dell'esca della vite nelle Marche

G. Romanazzi\*, S. Murolo, L. Pizzichini, S. Nardi

Nelle Marche la coltivazione della vite si estende su una superficie di circa 20 mila ettari, distribuiti, per lo più in aree collinari, per metà nelle province di Ascoli Piceno e Fermo e un quarto in quella di Ancona. Nella regione esiste un'ampia variabilità genetica, con 206 varietà censite, ma di fatto solo Sangiovese, Montepulciano, Verdicchio e Trebbiano toscano predominano nettamente, interessando più del 70% della superficie vitata, seguiti da Biancame, Maceratino, Pecorino e Passerina (a bacca bianca), Vernaccia nera e Lacrima (a bacca nera). Accanto a questi sono presenti altri vitigni autoctoni di un certo interesse enologico e per i quali è in atto un lavoro di valorizzazione che, a partire dalla sperimentazione, coinvolge l'intera filiera. Inoltre, la viticoltura marchigiana ha manifestato attenzione per vitigni internazionali (Chardonnay, Merlot, Sauvignon, Cabernet Sauvignon, Syrah ecc.) alcuni dei quali, come i primi due, già inseriti e coltivati con successo.

La vite, anche se da sempre presente sul territorio marchigiano, ha trovato una razionalizzazione e valorizzazione in tempi relativamente recenti. Nel 2004 le Marche hanno ottenuto il riconoscimento di denominazione di origine controllata e garantita (DOCG) di due vini: la Vernaccia di Serrapetrona – vino spumante prodotto con vernaccia nera nelle tipologie dolce e secco – e il Conero, evoluzione della tipologia Riserva del Rosso Conero, prodotto da uve Montepulciano e Sangiovese. Oltre alle due DOCG, sono definite 15 aree a denominazione di origine controllata (DOC): Bianchetto del Metauro, Colli Maceratesi, Colli Pesaresi, Esino, Falerio dei Colli Ascolani o Falerio, I Terreni di San Severino, Lacrima di Morro o Lacrima di Morro d'Alba, Offida, Rosso Conero, Rosso Piceno, Serrapetrona, Verdicchio dei Castelli di Jesi e Verdicchio di Matelica (fig. 1), alle quali si sono di recente aggiunte Pergola e San Ginesio (non inserite nella figura).

I vigneti delle Marche sono generalmente disposti in filari che si sviluppano lungo le linee di massima pendenza e la sistemazione a rittochino agevola l'impiego delle macchine utilizzate per eseguire lavorazioni superficiali per il contenimento delle infestanti. Per quanto riguarda le forme di allevamento, sono predominati le controspalliere, spesso in passato in forma di "capovolto bilaterale", caratterizzate da potatura lunga e tralcio rinnovato. Anche in quest'ambito, nell'ultimo decennio, si è registrata una inversione di tendenza: i nuovi impianti sono indirizzati verso forme semplificate, in grado di ridurre i costi di gestione, con l'adozione di tecniche sempre più compatibili con l'ambiente e tese al conseguimento di prodotti di miglior qualità.

\* Università Politecnica delle Marche, Ancona email: g.romanazzi@univpm.it



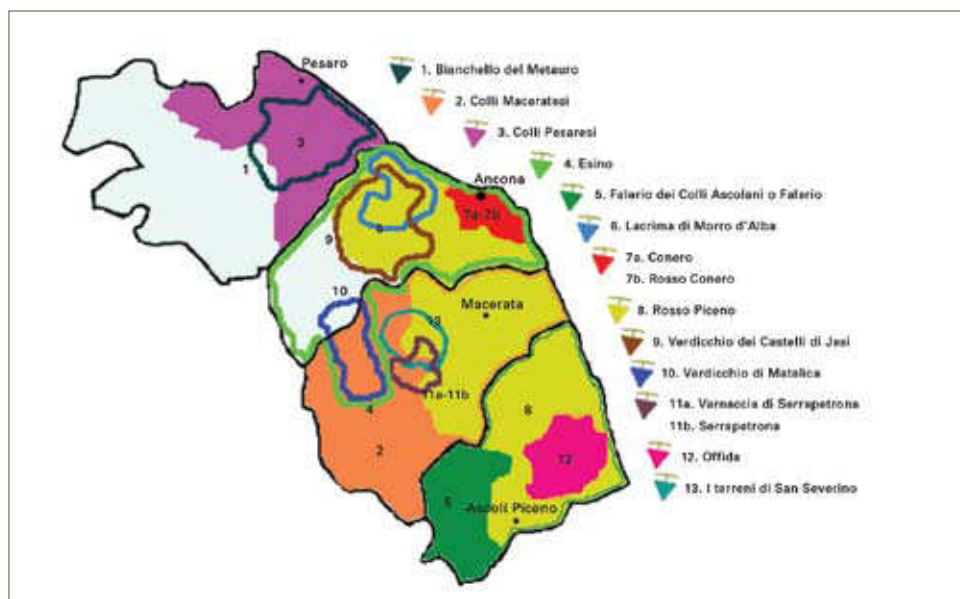


Fig. 1 - Areali marchigiani di produzione con denominazione di origine controllata (DOC) (<http://www.vinidocitalia.it/marche.htm>)

Tra le malattie di origine fungina che interessano la vite, anche nelle Marche è diffuso il “mal dell’esca” che negli ultimi anni ha avuto una crescente attenzione da parte dei ricercatori, anche in considerazione dei considerevoli danni economici prodotti. Difatti, la malattia è la principale causa della morte delle viti nei vigneti marchigiani e spesso riduce drasticamente la vita economica di un vigneto a causa delle frequenti fallanze conseguenti (fig. 2).

Il mal dell’esca è diffuso in quasi tutte le aree viticole del mondo come per esempio in California (Scheck *et al.*, 1998), Portogallo (Rego *et al.*, 2000), Francia (Larignon e Dubos, 1997), Spagna (Giménez-Jaime *et al.*, 2006), Australia (Edwards e Pascoe, 2004), Grecia (Rumbos e Rumbou, 2001), Nuova Zelanda (Ridgway *et al.*, 2002) e Sud Africa (Halleen *et al.*, 2003), dove sono state registrate notevoli perdite economiche soprattutto nel caso in cui a essere colpiti sono stati impianti giovani. In Italia, la situazione sanitaria relativa a impianti infetti da mal dell’esca non è dissimile da quella del resto del mondo. Tale sindrome, diffusa un po’ in tutte le regioni viticole italiane (Abruzzo, Emilia Romagna, Marche, Piemonte, Puglia, Sardegna, Sicilia, Toscana e Umbria) (Cravero *et al.*, 2000; Pollastro *et al.*, 2000; Sidoti *et al.*, 2000; Surico *et al.*, 2000; Romanazzi *et al.*, 2006, 2009; Calzarano e Di Marco, 2007; Quaglia *et al.*, 2009; Serra *et al.*, 2009) può raggiungere, in taluni vecchi vigneti, percentuali di infezione molto elevate (fino al 60-80%). Un’incidenza più bassa della malattia è stata invece riscontrata in alcune regioni dell’Italia Settentrionale (Trentino e Veneto) (Michelon *et al.*, 2007; Borgo *et al.*, 2008), sebbene in alcuni impianti e varietà del Veneto si raggiungano incidenze ragguardevoli, soprattutto su Sauvignon, Corvina e Negrara.

La presenza di piante sintomatiche anche in vigneti di 2-3 anni di età, ha permesso di ipo-

tizzare o un incremento esponenziale dell’inoculo fungino nel sistema vigneto oppure l’utilizzo di materiale di propagazione già infetto al momento dell’impianto. Il materiale può essere già infetto quando viene prelevato dalle piante madri (Pascoe e Cottral, 2000) o essere infettato durante le fasi di preparazione (Bertelli *et al.*, 1998; Scheck *et al.*, 1998). Da recenti studi è emerso che l’uso di materiale raccolto da piante madri di portinnesti infetti può portare a giovani viti infette (Whiteman *et al.*, 2003). La presenza di *Phaeoconiella chlamydospora* (*Pch*) in tralci di piante madri, della lunghezza di 4-6 metri è stata spiegata ammettendo che le spore o i frammenti di ife del fungo possono essere trasportati dalla corrente linfatica (Edwards *et al.*, 2004a). La possibilità che materiale di propagazione infetto sia stato commercializzato dai vivai potrebbe essere dipesa dalla grande domanda occorsa intorno alla metà degli anni ottanta, proprio nel momento in cui l’esca diventava una malattia molto comune (Surico *et al.*, 2004). Tale possibilità assume una consistenza maggiore per il fatto che i conidi di alcuni dei principali funghi coinvolti nel mal dell’esca, come *Pch* e *Phaeoacremonium aleophilum* (*Pal*), sono capaci di colonizzare i tessuti xilematici del materiale di propagazione prelevato dalle piante madri, senza la possibilità di essere diagnosticati mediante una semplice analisi visiva (Bertelli *et al.*, 1998; Edwards *et al.*, 2004a; Whiteman *et al.*, 2004; Landi *et al.*, 2009). È stato, inoltre, ipotizzato che le barbatelle possono essere infettate da *Pch* in barbatellario grazie alla differenziazione di clamidospore (Bertelli *et al.*, 1998) che consentono al fungo di conservarsi a lungo vitale nel terreno (Ferreira *et al.*, 1999; Mugnai *et al.*, 1999). Le strategie di controllo dovrebbero prevenire in vivaio e/o ridurre in campo l’instaurarsi e lo sviluppo della malattia (Di Marco *et al.*, 2000; Fourie e Halleen, 2006; Surico *et al.*, 2006). Un passo indispensabile per la lotta contro la malattia è costituito dalla scelta del materiale di propagazione, da sottoporre non solo all’analisi visiva, ma anche ad analisi di laboratorio, possibilmente rapide e capaci di verificare la presenza di propaguli di agenti fungini anche in concentrazioni molto basse. Un modello da prendere ad esempio è la produzione di materiale certificato “virus-esente”, ottenuto attraverso una scrupolosa selezione clonale e sanitaria, supportata da saggi biologici, sierologici e molecolari (Walter e Martelli, 1997).



Fig. 2 - Impianto adulto della varietà Verdicchio ubicato in agro di Cupramontana (AN). Si osservano le diffuse fallanze dovute al mal dell’esca e, a sinistra, una pianta appena disseccata

Considerata l'importanza che la vite ricopre nell'economia marchigiana e il peso che questa malattia può avere sulla produzione e sulla vitalità degli impianti, si è ritenuto opportuno fare il punto sulla situazione della diffusione del mal dell'esca nella Regione nell'ambito del progetto "Ricerca e Sperimentazione in vivaio e in campo per il contenimento del mal dell'esca della vite" (MESVIT). Il lavoro sperimentale ha previsto una serie di sopralluoghi nelle principali aree viticole della regione, volti a verificare l'incidenza del mal dell'esca in alcuni dei vitigni più comuni e successivamente identificare gli agenti causali mediante analisi di laboratorio basate su tecniche classiche e molecolari.

**Indagini in campo**

Per valutare la presenza di piante con sintomi di mal dell'esca, sono stati individuati 26 vigneti commerciali, distinguendoli a seconda dell'età di impianto in giovani (2-7 anni dall'impianto) e adulti (>11 anni dall'impianto), costituiti con le principali varietà coltivate nelle Marche (Verdicchio, Montepulciano, Sangiovese e Passerina). Gli impianti sono ubicati nelle province di Ancona (17), Pesaro-Urbino (3) e Ascoli Piceno (6) (tab. 1). Inoltre, è stata anche valutata l'incidenza della malattia nella collezione varietale dell'Agenzia per i Servizi nel Settore Agroalimentare delle Marche (ASSAM) presente a Petritoli (FM), impiantata nel 1990 su Kober 5BB, nella quale sono presenti 67 ecotipi (36 a bacca bianca e 31 a bacca nera). Osservazioni sono state effettuate anche nel limitrofo campo di portinnesti (SO4, Kober 5BB, 420A, 1103P) di circa 30 anni.

A partire dal settembre 2005, sono stati effettuati rilievi visivi nei suddetti vigneti commerciali per verificare

la presenza di sintomi ascrivibili a mal dell'esca. Per ciascuna delle varietà e tipologia prese in considerazione sono stati ispezionati da 1 a 6 vigneti, aventi un numero di piante compreso tra 500 e 1720 per quelli giovani e fra 400 e 864 per

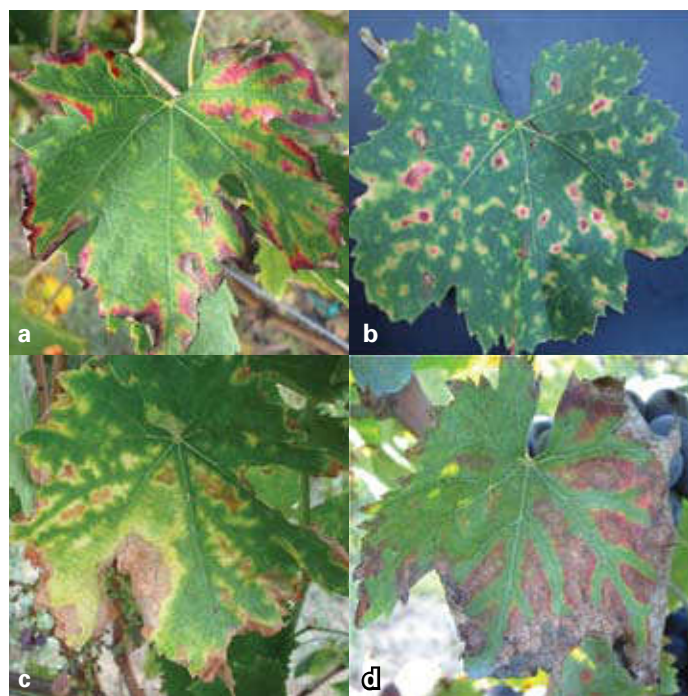


Fig. 3 - Sintomi ascrivibili al mal dell'esca su foglie di viti giovani delle varietà Montepulciano (a), Sangiovese (b), Passerina (c) e Verdicchio (d)

**Tab. 1 - Caratteristiche dei vigneti sottoposti ai rilievi per la presenza del mal dell'esca**

Varietà	ID	Provenienza (provincia)	Anno di impianto	Piante osservate (n.)	Sistema di allevamento
Montepulciano	MP1G	Osimo (AN)	2003	1176	C.S.*
	MP2G	Osimo (AN)	2002	1568	C.S.
	MP1A	Falconara M. (AN)	1975	600	C.S.
	MP2A	Falconara M. (AN)	1985	580	C.S.
Sangiovese	SG1G	Fiorenzuola di Focara (PU)	2003	900	C.S.
	SG2G	Cartoceto (PU)	2003	1152	D.C.
	SG3G	Ripatransone (AP)	2001	900	C.S.
	SG1A	San Lorenzo in Campo (PU)	1998	500	D.C.*
	SG2A	Falconara M. (AN)	1975	576	C.S.
	SG3A	Falconara M. (AN)	1985	500	C.S.
	SG4A	Falconara M. (AN)	1985	580	C.S.
	SG5A	Falconara M. (AN)	1998	400	C.S.
	SG6A	Ripatransone (AP)	1970	650	C.S.
	Verdicchio	VD1G	San Paolo di Jesi (AN)	2003	1280
VD2G		Cupramontana (AN)	2001	1064	C.S.
VD3G		Montecarotto (AN)	2004	1175	C.S.
VD4G		Montecarotto (AN)	2003	1055	C.S.
VD1A		Castellbellino (AN)	1990	490	C.S.
VD2A		San Marcello (AN)	1994	564	C.S.
VD3A		Cupramontana (AN)	1980	500	C.S.
VD4A		Staffolo (AN)	1975	600	C.S.
VD5A		Castelplanio (AN)	1975	864	C.S.
Passerina		PS1G	Ripatransone (AP)	2002	800
	PS2G	Ripatransone (AP)	1999	1050	C.S.
	PS3G	Ripatransone (AP)	2001	500	C.S.
	PS1A	Ripatransone (AP)	1970	800	C.S.
Totale piante ispezionate				20824	

\* C.S. = cordone speronato; D.C. = doppio capovolto.

quelli adulti. Le piante sintomatiche sono state contrassegnate in campo con un cartellino ed evidenziate su una mappa. L'incidenza delle alterazioni da mal dell'esca è stata rilevata su ciascuna pianta, raccogliendo inoltre dati sull'intensità di malattia in base a una scala empirica costituita da sei classi di gravità. L'adozione della scala empirica ha permesso di calcolare, per ciascuna pianta osservata, la diffusione (D), la gravità (G) e l'intensità media ponderata della malattia (I) o Indice di infezione di McKinney (McKinney, 1923). I dati sono stati sottoposti ad analisi statistica ed è stata calcolata la relativa deviazione standard (ds).

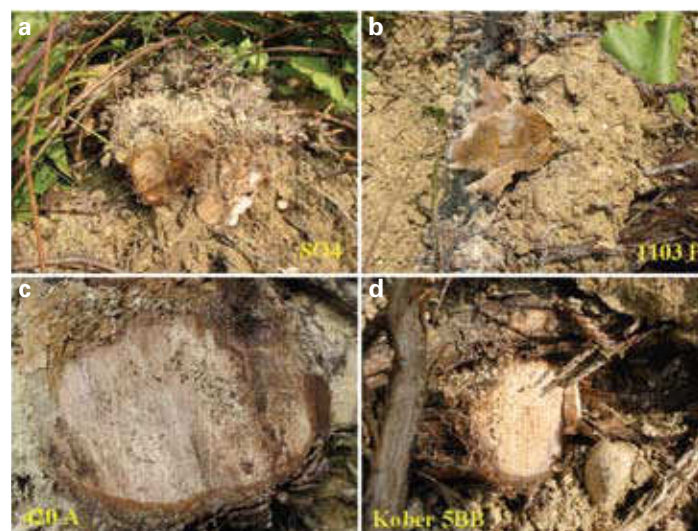


Fig. 4 - Imbrunimento dei tessuti interni di piante SO4 (a); corpi fruttiferi di Fomitiporia mediterranea alla base di piante di 1103P (b); emissione di goccioline di linfa nerastra su piante di 420A e Kober 5BB in seguito a sezione trasversale del ceppo (c-d)

Tab. 2 - Diffusione (D), gravità (G) e indice di McKinney (I) delle infezioni di mal dell'esca riscontrate nei vigneti adulti oggetto di studio

Vigneto	Diffusione (D)			Gravità (G)			Indice di McKinney (I)		
	Piante infette (%)	media	ds*	Piante infette (%)	media	ds*	Piante infette (%)	media	ds*
MP1A	13,17			1,75			3,83		
MP2A	10,34	11,76	2,02	1,53	1,64	0,15	2,64	3,23	0,84
SG1A	25,70			1,32			5,64		
SG2A	11,63			1,30			2,52		
SG3A	30,00			1,00			5,00		
SG4A	6,03			1,77			1,78		
SG5A	20,25			1,14			3,83		
SG6A	97,00	31,41	32,20	n.d.**	1,30	0,29	n.d.**	3,75	1,62
VD1A	37,55			2,00			12,52		
VD2A	53,01			3,89			34,40		
VD3A	12,20			1,18			2,40		
VD4A	91,67			2,55			38,89		
VD5A	1,16	39,02	35,69	1,00	2,72	1,73	0,23	17,69	17,99
PS1A	47,00	47,00		n.d.**			n.d.**		
media	32,62			1,70			9,47		

\* ds = deviazione standard; \*\* n.d. = dato non disponibile.

Tab. 3 - Diffusione (D), gravità (G) e indice di McKinney (I) delle infezioni di mal dell'esca riscontrate nei vigneti giovani oggetto di studio

Vigneto	Diffusione (D)			Gravità (G)			Indice di McKinney (I)		
	Piante infette (%)	media	ds*	Piante infette (%)	media	ds*	Piante infette (%)	media	ds*
MP1G	12,20			1,89			3,85		
MP2G	1,98	7,11	7,26	1,58	1,73	0,21	0,52	2,18	2,35
SG1G	0,00			0,00			0,00		
SG2G	5,03			1,38			1,16		
SG3G	5,52	3,52	3,05	n.d.**		0,97	n.d.**	0,58	0,81
VG1G	5,31			1,69			1,50		
VG2G	12,60			1,62			3,41		
VG3G	9,70			1,81			2,92		
VG4G	3,98			1,79			1,18		
VG5G	0,00	6,32	4,94	0,00	1,38	0,77	0,00	1,80	3,37
PS1G	5,63			1,00			0,93		
PS2G	3,08			1,07			0,50		
PS3G	2,80	3,84	1,55	1,04	1,03	0,03	0,46	0,63	0,26
media	5,21			1,24			1,37		

\* ds = deviazione standard; \*\* n.d. = dato non disponibile.

Dalle osservazioni effettuate in campo a fine estate-inizio autunno, è stato possibile verificare la presenza di sintomi ascrivibili al mal dell'esca della vite nella maggior parte dei vigneti adulti e giovani oggetto di indagine, nonché su portinnesti (figg. 3-4).

I valori medi di diffusione (D), gravità della malattia (G) e indice di infezione o di McKinney (I) registrati nei vigneti adulti sono risultati più elevati rispetto a quelli dei vigneti giovani. Nei vigneti adulti, la diffusione media della malattia è stata del 32,58%, toccando valori minimi nel vigneto VD5A (circa 1%) e punte massime in VD4A e SG6A (91,67% e 97%) (tab. 2). Da questi risultati emerge, a grandi linee e in assenza di differenze statistiche, che le due varietà a bacca rossa, Montepulciano e Sangiovese, sono risultate meno suscettibili delle due varietà a bacca bianca (Verdicchio e Passerina), raggiungendo un'incidenza media di infezione di 11,76 e 31,41% rispetto a 39,02 e 47,00%, rispettivamente. Una maggiore incidenza del mal dell'esca in Sangiovese rispetto al Montepulciano è stata anche osservata in Umbria (Quaglia *et al.*, 2009).

Una tendenza analoga è stata osservata da Borgo *et al.* (2008) in Veneto, prendendo in considerazione 31 varietà, di cui 12 a bacca rossa e 19 a bacca bianca. Sebbene in tale indagine non siano presenti le stesse varietà considerate nella nostra indagine, il livello medio di piante con sintomi di esca registrato nei vigneti a bacca bianca è più alto rispetto a quello nei vigneti a bacca rossa. Tuttavia, prendendo in considerazione un elevato numero di ecotipi marchigiani, tali differenze non appaiono, nella nostra regione, come vedremo in seguito, sostanzialmente evidenti.

Nei vigneti giovani, la diffusione media della malattia riscontrata è stata del 5,21%, con un

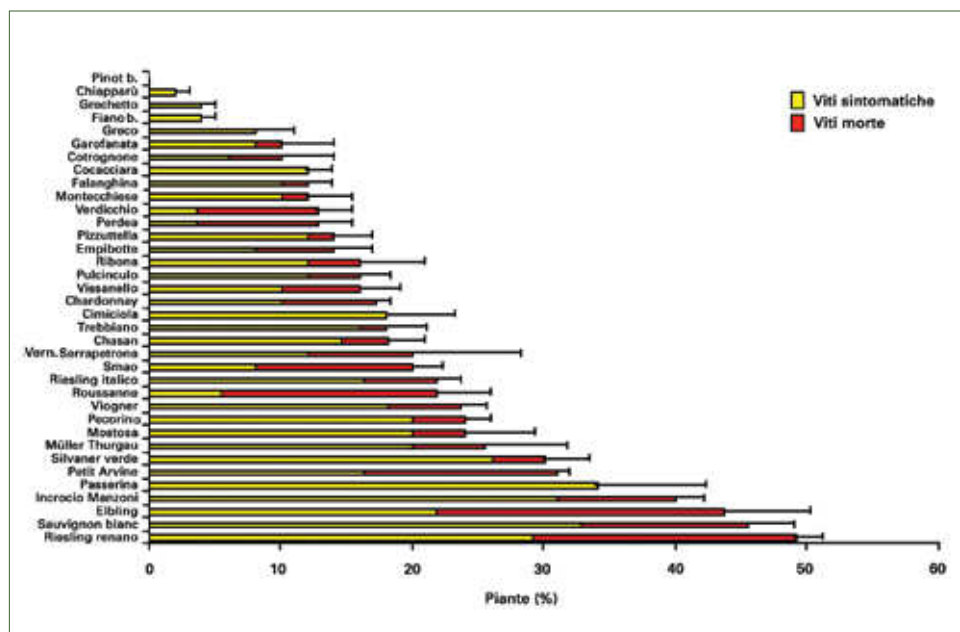


Fig. 5 - Incidenza del mal dell'esca su 36 ecotipi a bacca bianca allevati nel vigneto sperimentale dell'ASSAM di Petritoli (FM)

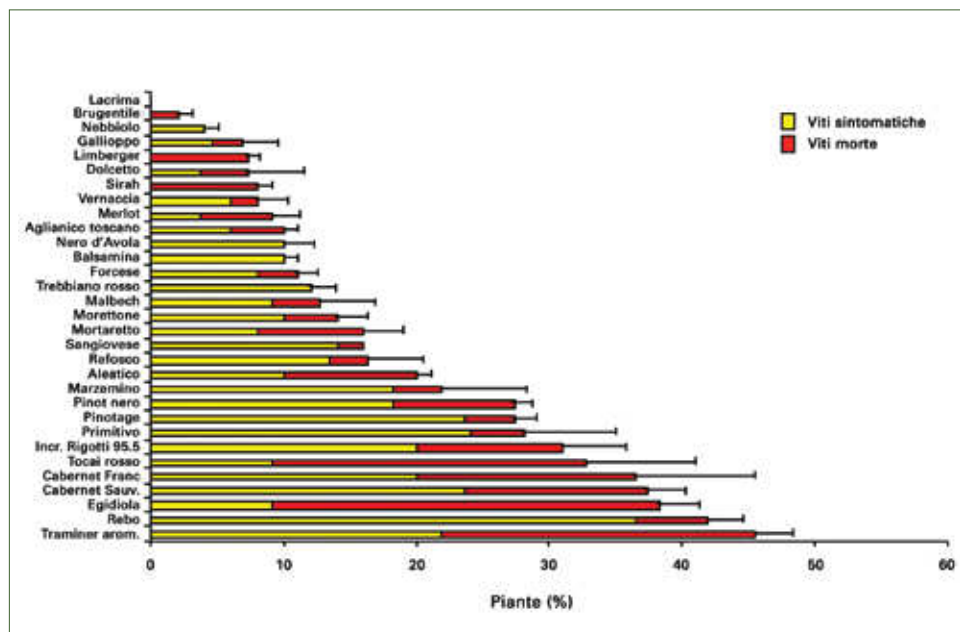


Fig. 6 - Incidenza del mal dell'esca su 31 ecotipi a bacca nera allevati nel vigneto sperimentale dell'ASSAM di Petritoli (FM)

massimo di circa il 12% in VG2G e MPIG. In due soli vigneti (SG1G e VG5G) non sono stati rinvenute piante con sintomi di esca. Delle piante sintomatiche, la maggior parte rientrava nelle classi 1 e 2 pari al 34,12% e 60,61%, rispettivamente. Sono stati registrati sporadici casi di piante con sintomi di classe 4. Sia nei vigneti adulti, sia in quelli giovani non sono state individuate piante completamente infette (classe 5) o morte per apoplezia (classe 6) (tab. 3).

Dalle osservazioni effettuate sui 67 ecotipi allevati nel campo di confronto varietale è stato possibile verificare che l'incidenza media cumulata (piante sintomatiche + piante morte) è di poco inferiore al 19%. Non sono state riscontrate differenze significative nell'incidenza media cumulata fra ecotipi a bacca bianca (19,46%) ed ecotipi a bacca nera (18,31%). Tra questi ultimi, è stata registrata la percentuale più elevata di piante morte (7,04% rispetto al 5,72%), pertanto l'incidenza media delle piante sintomatiche è risultata leggermente più elevata nelle varietà bianche (13,74%) rispetto a quelle a bacca nera (11,50%). Rilievi empirici condotti negli anni precedenti hanno permesso di associare i decessi ad apoplezia da mal dell'esca, sebbene non si possano escludere sporadici casi dovuti a cause diverse. Particolarmente interessante è il comportamento tra le uve a bacca bianca delle varietà Reisling renano e Sauvignon bianco, che hanno mostrato i valori più elevati di incidenza (49,09% e 45,45% rispettivamente), mentre Pinot bianco, Chiapparù, Grechetto e Fiano, al contrario, hanno fatto registrare i più bassi valori (al di sotto del 5%) sia nelle osservazioni condotte nelle Marche, sia in quelle condotte da Borgo *et al.* (2008) in Veneto (fig. 5). Tra le varietà a bacca nera, Traminer aromatico e Rebo, insieme a Cabernet Sauvignon e Cabernet franc sembrano essere gli ecotipi più suscettibili, mentre Lacrima, Brugnente e Nebbiolo sono quelli che hanno manifestato una maggiore resistenza alla malattia (fig. 6).

### Indagine spazio-temporale sulla diffusione del mal dell'esca

Per poter ottenere una fotografia rappresentativa della situazione dell'infezione di esca in campo è necessario considerare l'incidenza di malattia cumulata durante un periodo di osservazione di 3-5 anni, in quanto sintomi chiaramente espressi a inizio estate-fine autunno, non sempre appaiono costanti ogni anno perché probabilmente influenzati da fattori esogeni come per esempio pioggia e temperatura (Surico *et al.*, 2000). Per questo è stata effettuata un'analisi spazio-temporale della diffusione dell'esca in due vigneti adulti di Verdicchio (VD1A e VD2A) e in uno giovane di Sangiovese (SG1G) mediante osservazioni ripetute, oltre che nel 2005, anche nel mese di settembre del 2006 e 2007. Tutte le piante mostranti sintomi sono state identificate e riportate su una mappa bidimensionale, evidenziando i dati di incidenza annuale e cumulata. Dallo studio epidemiologico della malattia nel tempo e nello spazio, è stato possibile verificare che nel vigneto VD1A, su un totale di 490 piante, il 37,95% ha mostrato sintomi nel 2005, il 34,48% nel 2006 e il 38,36% piante nel 2007 (fig. 7). Il 19,18% delle piante ha mostrato sintomi in un solo anno, il 30,61% sono risultate sintomatiche in due anni, mentre solo 67 piante, pari al 13,67% ha costantemente mostrato sintomi della malattia durante nei tre anni di osservazione (fig. 8). Nei tre anni di studio sono risultate sintomatiche complessivamente il 63,46% delle piante costituenti il vigneto.

Nel vigneto VD2A su 564 piante adulte ispezionate, più della metà (52,12%) ha mostrato sintomi nel 2005. Nel 2006 e nel 2007, è stata registrata una leggera flessione del numero di piante sintomatiche (43,08% e 41,48%, rispettivamente) (fig. 9). Il 19,14% dei ceppi

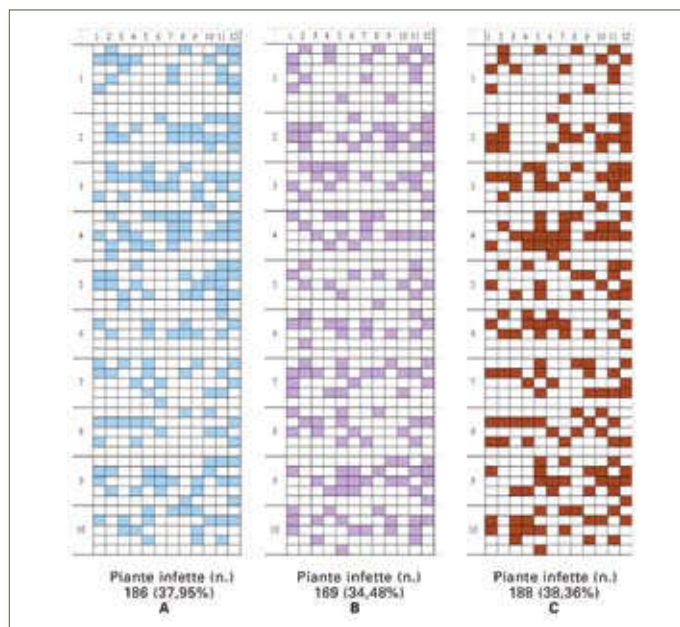


Fig. 7 - Mappa del vigneto adulto di Verdicchio VD1A sito nel comune di Castelbellino (AN). Piante affette da mal dell'esca nel 2005 (A), 2006 (B) e 2007 (C)

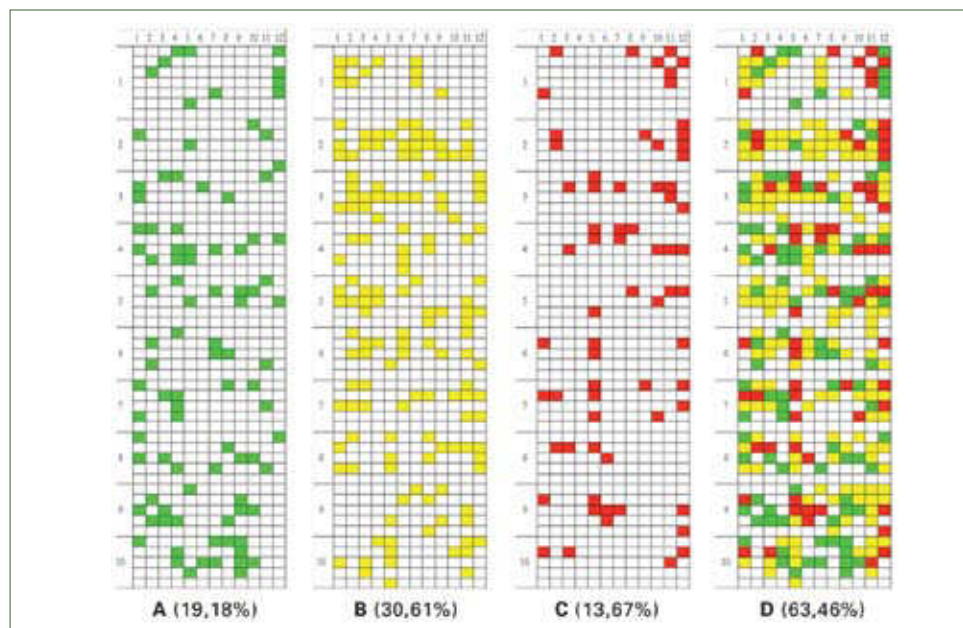


Fig. 8 - Mappa del vigneto di Verdicchio adulto di Verdicchio VD1A sito nel comune di Castelbellino (AN). Le caselle in verde (A) indicano le piante risultate sintomatiche in un solo anno di osservazione, quelle in giallo (B) le piante risultate sintomatiche per due anni, quelle in rosso (C) indicano le piante che per tre anni consecutivi hanno mostrato sintomi. In (D) vengono indicate le piante risultate malate nei tre anni di osservazione

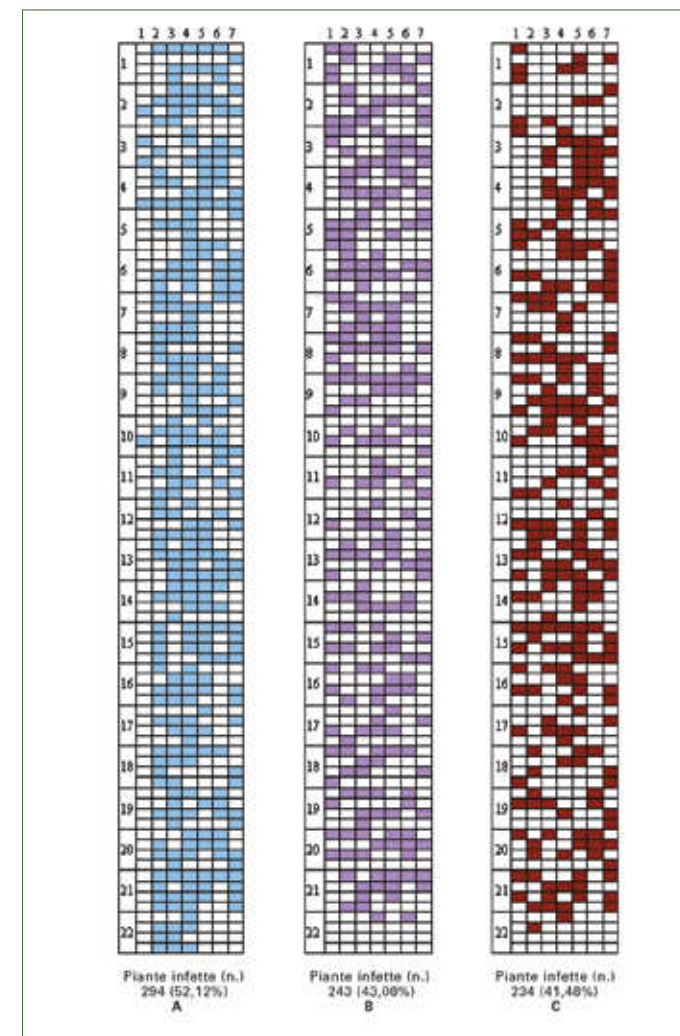


Fig. 9 - Mappa del vigneto di Verdicchio adulto VD2A sito nel comune di San Marcello (AN). Piante affette da mal dell'esca nel 2005 (A), 2006 (B) e 2007 (C)

ha manifestato sintomi per un solo anno, il 28,72% per due anni e solo il 18,43% delle piante è stato costantemente sintomatico nei tre anni. Nei tre anni di osservazione, quindi, il 66,29% delle piante sono risultate complessivamente affette da mal dell'esca (fig. 10). La frequenza di piante infette che hanno mostrato sintomi costantemente durante i tre anni di osservazione è stata pari al 13 e al 18%, rispettivamente, nei due vigneti.

Lievi, sporadici sintomi sono stati rinvenuti nel vigneto SG1G nel 2005, dove negli anni seguenti (2006 e 2007) è stato possibile osservare sintomi evidenti e una diffusione che ha raggiunto circa il 48,00 e il 31,44% di piante infette, con una frequenza cumulata del 59,88%. L'ampia fluttuazione nei sintomi fogliari sembra possa essere imputata alle condizioni climatiche caratterizzate da penuria di piogge estive durante il 2005. L'abbondante e costante disponibilità idrica verso le foglie favorisce la traslocazione e l'accumulo di composti fitotossici nelle foglie, inducendo la comparsa di sintomi (Marchi *et al.*, 2006).

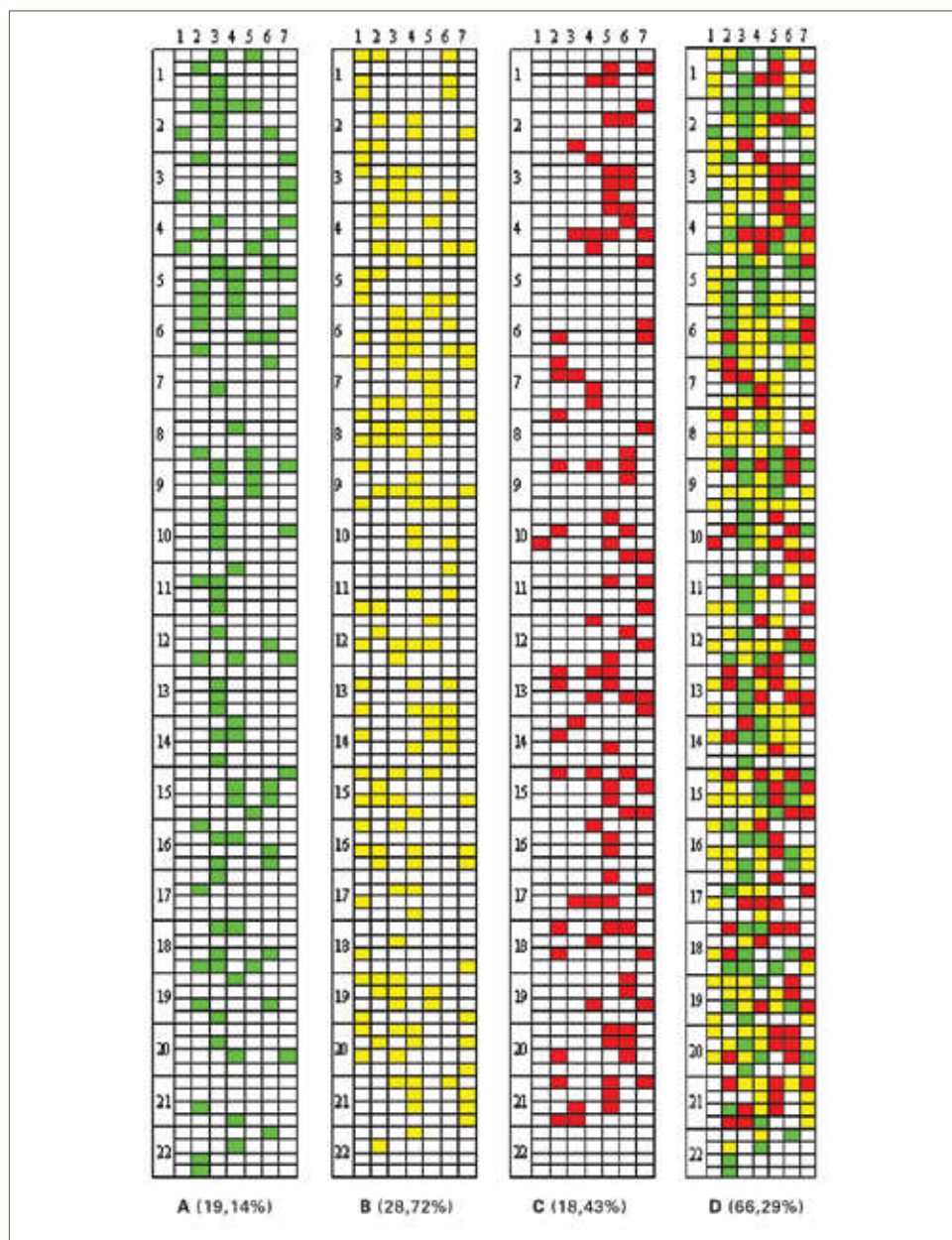


Fig. 10 - Mappa del vigneto di Verdicchio adulto (VD2A) sito nel comune di San Marcello (AN). Le caselle in verde (A) indicano le piante risultate sintomatiche in un solo anno di osservazione, quelle in giallo (B) le piante risultate sintomatiche in due anni, quelle in rosso (C) indicano le piante che per tre anni consecutivi hanno mostrato sintomi. In (D) vengono indicate tutte le piante risultate sintomatiche nei tre anni di osservazione

### Indagini di laboratorio

#### Analisi classica

Sono stati prelevati campioni legnosi da 80 piante (41 nei vigneti adulti, 27 nei giovani e 12 da portinnesti) con sintomi fogliari o scelte a caso per i portinnesti. Le analisi di laboratorio sono state condotte sia mediante la diagnosi classica (isolamento su substrato agarizzato) sia attraverso tecniche molecolari (estrazione del DNA seguita da amplificazione degli acidi nucleici). I campioni sono stati scortecciati e sterilizzati esternamente mediante immersione per 1 min in alcool etilico al 95% e passati su fiamma. Successivamente, sotto cappa, in condizioni di asepsi sono stati effettuati una serie di tagli sul campione per eliminare il ritidoma e osservare la presenza di zone di legno imbrunite. Da queste sono stati prelevati 20 frammenti di legno, insediati in 5 capsule Petri contenenti 12 ml di Agar Patata Destrosio (PDA) addizionato di una soluzione antibiotica (150 mg/l Streptomycina e 150 mg/l Ampicillina).

Le piastre, opportunamente sigillate, sono state incubate a temperatura ambiente (25°C) e dopo una settimana sono state effettuate subculture delle colonie fungine sviluppatesi su nuove piastre di PDA selettivo. L'identificazione delle colonie si è basata sulle caratteristiche morfologiche e colturali delle stesse, nonché sull'osservazione allo stereomicroscopio e al microscopio ottico di preparati "a fresco" in acqua. Sono state utilizzate colonie di riferimento di *Pch*, *Phaeoacremonium aleophilum* (*Pal*), *Fomitiporia mediterranea* (*Fmed*) e diverse *Botryosphaeriaceae* (*Bot*). Tutte le colonie fungine identificate, sono state conservate in gel di silice a -20°C. Dall'analisi classica è stato possibile isolare in coltura prevalentemente quattro tipologie di funghi successivamente identificati come *Pch*, *Pal*, *Fmed* e *Bot* (fig. 11).

I campioni prelevati da piante adulte sono risultati infetti da *Pch* (15), *Bot* (8), *Fmed* (4) e *Pal* (4) (tab. 5). Colonie di *Fmed* sono state isolate con elevata frequenza da tessuto spugnoso, cariato, mentre *Pch* e *Bot* prevalentemente da tessuti imbruniti, come descritto anche in studi condotti su piante adulte di Italia, Panse precoce, Vittoria, Pizzutella, Sangiovese, Malvasia nera (Mugnai *et al.*, 1999; Pollastro *et al.*, 2000). Una elevata correlazione positiva (0,94) tra imbrunimenti del legno su piante innestate e portinnesti e presenza di *Pch* è stata registrata da Abbatecola *et al.* (2006). Tuttavia, la semplice osservazione degli imbrunimenti non è sufficientemente informativa circa la presenza di *Pch*, in quanto alterazioni cromatiche del legno possono essere causate da fattori abiotici (Frisullo *et al.*, 1992; Rumbos e

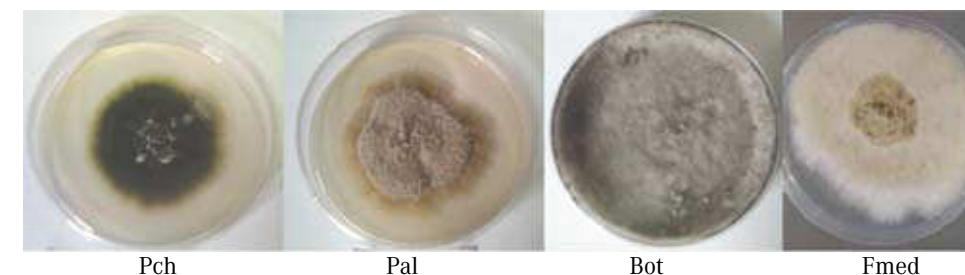


Fig. 11 - Colonie fungine di *Pch*, *Pal*, *Bot* e *Fmed*, associate a piante con sintomi di mal dell'esca della vite isolate su PDA

Rumbou, 2001). Eskalen *et al.* (2001) hanno dimostrato la capacità di *Pch* e *Pal* di produrre striature nere sui portinnesti, ma anche la presenza di alterazioni cromatiche del legno in campioni non inoculati. Dal fusto di piante giovani sono state isolate principalmente colonie di *Bot* (tab. 4), al momento in via di identificazione, il cui ruolo nel complesso del mal dell'esca è tuttora in discussione. Un elevato numero di specie afferenti a questa famiglia possono infettare le vite e indurre un ampio range di sintomi e gravi perdite (Larignon e Dubos, 2001; Phillips *et al.*, 2002; van Niekerk *et al.*, 2004, 2006; Urbéz-Torres *et al.*, 2006, 2008; Carlucci *et al.*, 2009; Martos *et al.* 2008).

In Spagna il materiale di propagazione è risultato infetto da *Pch* e *Pal* soprattutto dopo la messa a dimora delle barbatelle innestate (Giménez-Jaime *et al.*, 2006). Per *Pal* e *Pch* i conidi prodotti in abbondanza sulla superficie delle viti vive, morte o sui residui legnosi, possono essere dispersi e infettare le viti penetrando attraverso le ferite di potatura (Larignon e Dubos, 2001) o possono conservarsi per lunghi periodi nel terreno (Scheck *et al.*, 1998; Khan *et al.*, 1999). Comunque, *Bot* associate al "black dead arm" (Larignon e Dubos, 2001) e al deperimento di viti adulte in Francia, sono state rinvenute anche in vivaio su materiale di propagazione proveniente da piante madri apparentemente sane (Halleen *et al.*, 2003; Fourie e Halleen, 2004).

Un caso particolare è costituito dal rinvenimento di corpi fruttiferi di *Fmed* sulle ceppaie di piante di 1103P, ed emissione di goccioline di linfa nerastra su piante di 420A e Kober 5BB in seguito a sezione trasversale ed estesi imbrunimenti su SO4. Tuttavia, al momento non è stata accertata alcuna relazione tra la presenza di tali funghi nelle ceppaie e la contaminazione degli spezzoni poi utilizzati per gli innesti, sebbene *Pch* e *Pal* sono risultati presenti (tab. 5). Diversi autori hanno sottolineato l'importanza del materiale di propagazio-

**Tab. 4 - Funghi associati al mal dell'esca isolati in coltura da campioni provenienti da impianti adulti e giovani e identificati mediante tecniche molecolari**

Varietà	Colonie fungine isolate (n.)					Analisi molecolare			
	n. campioni	<i>Pch</i>	<i>Pal</i>	<i>Fmed</i>	<i>Bot</i>	n. campioni	<i>Pch</i>	<i>Pal</i>	<i>B. dothidea</i>
Vitigni adulti	Montepulciano	13	5	0	2	5	13	11	0
	Verdicchio	22	5	1	0	3			
	Vernaccia	3	3	3	3	0			
	Trebbiano	1	1	0	0	0			
	Chardonnay	1	1	0	0	0			
	Sangiovese	1	0	0	1	0			
Vitigni giovani	Montepulciano	18	0	0	0	13	14	3	0
	Verdicchio	5	0	0	0	0			
	Lacrima nera	2	1	1	0	0			
	Traminer	2	1	0	0	0			
<b>Totale</b>	<b>68</b>	<b>17</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>21</b>	<b>27</b>	<b>14</b>	<b>0</b>	<b>2</b>

**Tab. 5 - Funghi associati al mal dell'esca isolati in coltura da portinnesti e identificati mediante tecniche molecolari**

Portinnesti	Diagnosi classica					Diagnosi molecolare		
	n. campioni	<i>Pch</i>	<i>Pal</i>	<i>Fmed</i>	<i>Bot</i>	<i>Pch</i>	<i>Pal</i>	<i>B. dothidea</i>
Kober 5BB	3	2	2	0	2	2	0	0
1103P	2	2	0	2	2	2	0	0
420A	3	3	0	0	2	3	0	0
SO4	4	2	2	2	0	4	0	0
<b>Totale</b>	<b>12</b>	<b>9</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>11</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

ne infetto, specialmente portinnesti, come principale mezzo di diffusione di questi agenti patogeni (Fourie e Halleen, 2004; Aroca *et al.*, 2006; Zanzotto *et al.*, 2007). Una volta che il materiale di propagazione infetto è messo in campo, questo può fungere da fonte di inoculo, dal momento che è stata dimostrata la diffusione della malattia in campo principalmente mediante la dispersione aerea delle spore per *Fmed* (Larignon, 1999; Cortesi *et al.*, 2000).

Nei 12 campioni raccolti da portinnesti, è stata isolata frequentemente *Pch* (9), seguita da *Bot* (6), *Pal* e *Fmed* (4) (tab. 5). La tecnica dell'isolamento su substrato artificiale ha dei limiti legati soprattutto alla lenta crescita di *Pch*, *Pal* e *Fmed*, che in alcuni casi sono inibiti nello sviluppo dalla presenza di altri miceti come specie di *Botryosphaeriaceae* spp. e *Alternaria* spp., abili colonizzatori del substrato, nonché dalla necessità di effettuare diverse subcolture per ottenere colonie fungine in purezza idonee per l'identificazione (Ridgway *et al.*, 2002).

Per poter velocizzare il processo di diagnosi, nell'ultimo decennio sono stati messi a punto per l'identificazione dei principali agenti causali del mal dell'esca tecniche di diagnosi molecolare come PCR, *nested*-PCR, *one-tube nested*-PCR e PCR quantitative (SYBR-green e TaqMan), partendo da DNA estratto direttamente da campioni di talee, acqua e terreno, sia prelevati in vivaio sia in pieno campo (Tegli *et al.*, 2000a; Abbatecola *et al.*, 2006; Retief *et al.*, 2006; Edwards *et al.*, 2007a, 2007b).

**Analisi molecolare**

Il DNA è stato estratto da talee di vite mediante il protocollo CTAB (Doyle e Doyle, 1990). La rimozione delle possibili sostanze interferenti è stata effettuata con Sepharose CL-6B (Pharmacia, Peapak, NJ-USA) mediante eluizione attraverso una "spin column" (Bramwell *et al.*, 1995). Gli acidi nucleici purificati sono stati conservati a -20°C. Il DNA estratto dal materiale vegetale è stato impiegato in reazioni PCR e *nested*-PCR. La diagnosi di *Pch* è stata effettuata in *nested*-PCR utilizzando due coppie di primer specifiche (Abbatecola *et al.*, 2006). Per verificare contaminazioni di *B. dothidea*, il DNA totale è stato amplificato con la coppia di primer EBdF e EBdR (Ma *et al.*, 2003). Infine i primer *Pal1N* e *Pal2R* sono stati utilizzati nell'amplificazione per la diagnosi di *Pal* (Tegli *et al.*, 2000). L'amplificazione è stata realizzata in un termociclatore Bio-Rad Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA-USA) programmato a seconda della coppia di primer utilizzata. Aliquote (10 µl) del prodotto di amplificazione sono state caricate su gel all'1,5%

di agarosio (Molecular Biology Certified Agarose, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA-USA) insieme allo standard 100 pb DNA Ladder (New England BioLabs, Beverly, USA). L'immagine dei gel è stata digitalizzata utilizzando una telecamera a integrazione (Sistema Gel Doc 1000, Bio-Rad Laboratories). La tecnica utilizzata per l'estrazione del DNA genomico partendo dalle colonie pure di *Pch*, *Pal* e *Bot* ha consentito l'ottenimento, in circa 2 h, di 100-200 ng/ $\mu$ l di DNA per ciascun isolato. Il metodo di estrazione del DNA genomico partendo direttamente da talee di vite presumibilmente infette è risultato più laborioso, dovendo purificare il DNA estratto mediante passaggio in colonnina di Sepharose. Tale procedura consente di superare la fase intermedia dell'isolamento *in vitro* degli agenti causali, le subculture e l'osservazione al microscopio, e di ottenere risultati in tempi brevi. La presenza di elevate quantità di composti polifenolici e polisaccaridici rappresenta uno dei maggiori problemi di contaminazione nella purificazione del DNA estratto da pianta. Infatti, durante il processo di estrazione del DNA, quando si rompono le pareti cellulari, questi composti citoplasmatici possono venire in contatto con gli acidi nucleici e, legandosi in modo covalente, rendono il DNA poco utilizzabile per ulteriori indagini genetiche. Un DNA di alta qualità è richiesto se si vuole procedere con l'amplificazione (PCR e *nested*-PCR). Il protocollo di estrazione del DNA e la successiva purificazione dell'estratto, utilizzato nella presente ricerca, già applicato in precedenti studi da Abbatecola *et al.* (2006) ha permesso di ottenere una buona qualità di acidi nucleici.

Il DNA estratto dalle 15 colonie fungine, 5 colonie per ogni tipologia (*Pch*, *Pal* e *Bot*) e dai 30 campioni di tralci, è stato sottoposto all'amplificazione con le coppie di primer specifici per *Pch*, *Pal* e *Bot*. Le coppie di oligonucleotidi hanno mostrato un'ottima efficienza di diagnosi. In particolare, tutte le colonie fungine pure identificate come *Pch*, *Pal* e *Bot* mediante le osservazioni al microscopio, sono risultate positive già durante la prima reazione di amplificazione e a maggior ragione nella *nested*-PCR, consentendo di ottenere un ampliconi specifici di circa 498 pb, 620 pb e 700 pb rispettivamente.

Quando è stato utilizzato DNA estratto da legno di viti che presentavano alterazioni riconducibili al mal dell'esca (venature brune, essudati gommosi e carie), la coppia di primer specifici per *Pch* alla prima reazione di amplificazione non hanno amplificato nessuno dei campioni sottoposti ad analisi molecolare. Solo con la *nested*-PCR, utilizzando una ulteriore coppia di primer specifica per *Pch* che amplifica un frammento di DNA interno alla regione già amplificata è stato possibile ottenere ampliconi della dimensione attesa. Le analisi hanno

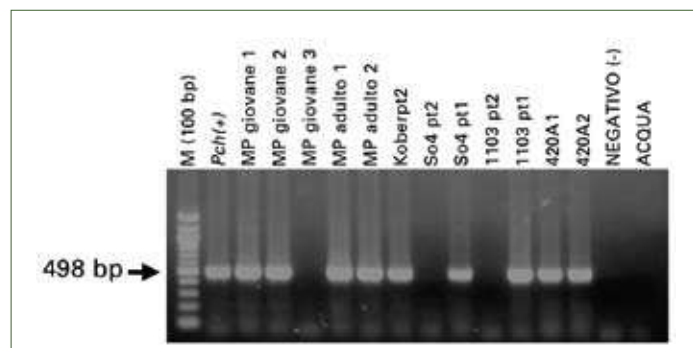


Fig. 12 - Esempio di gel di agarosio al 1,5% mostrante ampliconi di 498 pb ottenuti con i primer specifici per *Pch*. M: marker di riferimento per pesi molecolari (100 bp DNA Ladder Plus, MBI, Fermentas, GMBH, Germania)

evidenziato una maggiore sensibilità dell'analisi molecolare rispetto a quella classica. Infatti la maggior parte dei campioni (11/13) provenienti da vigneti adulti di Montepulciano sono risultati infetti da *Pch* mediante la *nested*-PCR (fig. 12), rispetto ai soli 5 campioni risultati infetti in seguito a isolamento *in vitro* di frammenti di legno (tab. 4).

Inoltre nei campioni provenienti dai vigneti giovani di cv. Montepulciano, in cui erano state riscontrate solo infezioni da *Bot*, in analisi classica, sono state riscontrate anche infezioni di *Pch* durante le analisi molecolari (tab. 4). In particolare, in questi campioni, *Bot* è stata isolata sia dal portinnesto sia dal nastro, mentre *Pch* solo nel portinnesto. Due campioni, risultati infetti da *Bot* mediante la tecnica classica, sono risultati positivi quando amplificati con i primer specifici per *B. dothidea*. Tale patogeno può anche infettare altre colture, come l'olivo, spesso allevato nelle vicinanze di vigneti, soprattutto nell'Italia centro-meridionale (Lazizzera *et al.*, 2008).

Infine, nei portinnesti su 12 campioni 11 sono risultati infetti da *Pch*, mentre nessun campione è stato amplificato con la coppia di primer specifici per *Pal* (tab. 5). Tale risultato in disaccordo con l'analisi classica, dalla quale erano state isolate alcune colonie di *Pal*. L'apparente contraddizione può essere spiegata considerando il fatto che mentre per la diagnosi molecolare di *Pch* sono state utilizzate due amplificazioni consecutive (*nested*-PCR) rendendo la diagnosi più sensibile, per *Pal* e *B. dothidea* è stata utilizzata una sola coppia di primer che probabilmente ha portato a sottostimare la presenza di tali agenti. È importante quindi disporre di tecniche di diagnosi affidabili che permettano di identificare i patogeni in modo inequivocabile, diagnosticare precocemente le infezioni, anche in campioni asintomatici in modo da poter fornire un valido supporto ai vivaisti durante il processo di certificazione sanitaria. Materiale infetto da *Pal* è stato frequentemente rinvenuto in Toscana e Veneto, sporadicamente in Marche e Puglia (Pollastro *et al.*, 2000; Romanazzi *et al.*, 2009).

A tutt'oggi non è ancora chiaro se le tecniche vivaistiche possono effettivamente influenzare la contaminazione delle barbatelle da *Pch* e *Pal*, se *Bot* ha un ruolo nel processo infettivo dei vigneti giovani, quanto gli eventi climatici influiscono sulla presenza della malattia, se esiste un'interazione positiva o negativa tra *Fmed*, *Pch*, *Pal* e *Bot*. Ulteriori informazioni potrebbero essere ottenute mediante l'uso di isolati marcati di funghi coinvolti nel mal dell'esca, disponibili attualmente per *Pch* (Landi e Romanazzi, 2006), per valutare il grado di colonizzazione e una eventuale differente suscettibilità varietale.

#### Ringraziamenti

Si ringraziano la dott.ssa S. Talevi, la dott.ssa M. Righi e il dott. S. Virgili dell'ASSAM, A. Tramontano e P. Federico per la collaborazione nei sopralluoghi e il prof. F. Faretra dell'Università di Bari per aver fornito i primer specifici per la diagnosi di *P. chlamydospora*.



### III.5 Il mal dell'esca della vite in Piemonte

S. Cravero\*, S. Bergaglio, E. Paravidino

Il mal dell'esca è un'avversità parassitaria di primaria importanza per la viticoltura in Piemonte (tab. 1). Caratteristiche salienti della malattia nella regione sono la corrispondenza fra età del vigneto e gravità della malattia e una notevole sensibilità su base varietale. Le vigne con maggiore incidenza dell'esca sono infatti quelle mature, indicativamente oltre i 15 anni dall'impianto. Poco presenti, in particolare nei nuovi impianti, sono risultate invece la malattia di Petri e l'esca giovane. Dal punto di vista della sensibilità varietale, sulla base di osservazioni di massima, è possibile affermare che il Barbera e il Moscato bianco presentano, nell'ambito del panorama varietale regionale, la più elevata frequenza di manifestazione dei sintomi. Se consideriamo che le suddette varietà sono quelle più estesamente coltivate e che l'età media dei vigneti piemontesi è tendenzialmente elevata, diventa evidente l'importanza del mal dell'esca in Piemonte.

Riguardo alla diffusione territoriale è stato possibile evidenziare una sostanziale uniformità della distribuzione della malattia in tutti i diversi areali produttivi piemontesi, pur caratterizzati da indici di piovosità diversi (tab. 2). Per quanto invece concerne il tempo della comparsa

**Tab. 2 - Valori delle precipitazioni in Piemonte negli anni 2006-2008**

n.	Località	Cultivar	Precipitazioni totali in mm		
			2006	2007	2008*
1	Chieri (TO)	Freisa	666	637	730
2	Albugnano (TO)	Barbera	830	593	802
3	Carpeneto (AL)	Barbera	655	556	583
4	Tortona (AL)	Timorasso	724	546	511
5	Tortona (AL)	Barbera	724	546	511
6	Monleale (AL)	Timorasso	724	546	511
7	Monleale (AL)	Freisa	724	546	511
8	Costa Vescovato (AL)	Cortese	584	462	517
9	Costa Vescovato (AL)	Barbera	584	462	517
10	Villaromagnano (AL)	Barbera	584	462	517

\* In quest'anno le precipitazioni riportate sono relative al periodo gennaio-ottobre. I dati dei vigneti di Tortona e Monleale si riferiscono alla stazione di Montemanzino, quelli di Villaromagnano alla stazione di Costa Vescovato.

dei sintomi, è apparsa evidente la pressoché totale assenza di sintomi precoci, cioè dal germogliamento alla fioritura, e una loro concentrazione essenzialmente dall'allegagione in poi. Il mal dell'esca in Piemonte sembra pertanto associato alle temperature elevate dell'estate. I colpi apoplettici, abbastanza comuni, sono apparsi in aumento con l'età della vigna.

In Piemonte non si praticano, in generale, interventi agronomici particolari volti al contenimento della diffusione del mal dell'esca. Infatti, le piante con sintomi di esca manifesta, anche se d'intensità elevata, normalmente non vengono rimosse. Si provvede invece, solitamente durante la potatura invernale, alla rimozione delle piante morte in seguito a colpo apoplettico.

**Tab. 1 - Vigneti oggetto del monitoraggio e relativa incidenza del mal dell'esca**

n.	Località	Cultivar	Incidenza (%)				Età (nel 2008)
			2006	2007	2008	cumulata	
1	Chieri (TO)	Freisa	5,8	28,6	4,8	35,2	33
2	Albugnano (TO)	Barbera	0,5	0,2	1,4	2,1	28
3	Carpeneto (AL)	Barbera	n.r.	3,6	3,4	4,1	20
4	Tortona (AL)	Timorasso	0,2	1,3	0,4	1,9	7
5	Tortona (AL)	Barbera	29,0	27,3	3,2	46,2	10
6	Monleale (AL)	Timorasso	4,4	1,9	1,1	7,2	18
7	Monleale (AL)	Freisa	13,1	0,8	12,5	24,3	14
8	Costa Vescovato (AL)	Cortese	2,1	2,9	0,0	4,8	25
9	Costa Vescovato (AL)	Barbera	7,1	5,1	1,0	11,3	17
10	Villaromagnano (AL)	Barbera	2,3	7,0	n.r.	8,3	43

\* Regione Piemonte - Servizio Fitosanitario, Torino email: sergio.cravero@regione.piemonte.it

### III.6 Il mal dell'esca della vite in Puglia

S. Frisullo\*, A. Carlucci, F. Lops

In Puglia, lo studio della diffusione della malattia è stato effettuato nell'estate 2004 mediante sopralluoghi in vigneti di uve da vino con cultivar a bacche rosse e bacche bianche. In particolare sono stati monitorati 31 vigneti dislocati in provincia di Lecce, 35 in provincia di Brindisi, 24 in provincia di Taranto, 38 in provincia di Bari e 30 vigneti in provincia di Foggia, di età variabile tra 4 e 18 anni. La diffusione della malattia è stata valutata come percentuale di piante con sintomi esterni sul totale delle piante esaminate. I risultati ottenuti indicano chiaramente che nei vigneti monitorati la percentuale più alta di piante malate (34%) è stata registrata in un vigneto di Sangiovese allevato in provincia di Lecce, mentre la più bassa diffusione è stata rilevata su Malvasia bianca coltivata in provincia di Taranto (9%) (tab. 1). Comunque, in seguito a tale indagine è emerso che i vigneti con uva a bacche rosse sono più soggetti a manifestare i sintomi tipici del mal dell'esca rispetto ai vigneti con uva a bacche bianche. Infine bisogna aggiungere che il numero delle piante con sintomi esterni in realtà non coincide con il numero reale delle piante infette, infatti in una sperimentazione triennale condotta su un vigneto di uva "Italia" la diffusione delle viti con sintomi esterni è risultata variabile dal 31,7 al 40,3%, mentre al rilievo avvenuto nella fase dell'estirpazione, attraverso l'osservazioni dei sintomi interni, la diffusione è aumentata fino all'80,6%.

#### Incidenza e diffusione della malattia in campo

Nei quattro vigneti oggetto di studio è stata valutata, a fine settembre, l'incidenza annuale della malattia e successivamente calcolata l'incidenza cumulata dal 2005 al 2007.

Nei vigneti 1 e 2, dal 2005 al 2007, sono stati inoltre svolti dei rilievi settimanali, dal mese di giugno al mese di settembre, al fine di monitorare la presenza di piante sintomatiche e osservare il decorso della malattia durante tutta la stagione estiva. Le piante di ciascun vigneto sono state riportate su mappe indicando quelle sintomatiche e il tipo di decorso (cronico e acuto). I dati meteorologici (temperatura media e pioggia totale) sono stati ottenuti dalle stazioni meteorologiche di riferimento (<http://meteo.iasma.it/meteo/>).

I dati raccolti nel corso dei tre anni di rilievo hanno evidenziato che i primi sintomi della malattia possono comparire da metà giugno e durante tutta la stagione estiva in relazione alla varietà e alle condizioni climatiche (tab. 2). Nell'annata 2007, in entrambi i vigneti osservati, i sintomi sono apparsi piuttosto in anticipo rispetto ai due anni precedenti: questa precocità è senz'altro riconducibile alle temperature nettamente superiori rispetto alla media,

**Tab. 1 - Diffusione percentuale (%) del mal dell'esca in vigneti con uva da vino a bacche rosse e bacche bianche monitorati nelle cinque province della Puglia nel luglio 2004**

Cultivar	Lecce			Brindisi			Taranto			Bari			Foggia		
	n.	%	Età	n.	%	Età	n.	%	Età	n.	%	Età	n.	%	Età
Negroamaro*	6	12-18	8-18	4	16-21	6-11	4	12-20	12-14	2	20-28	7-8	0	—	—
Malvasia bianca**	4	10-13	4-10	4	13-18	5-12	3	9-12	6-9	0	—	—	1	11	6
Malvasia nera*	7	15-31	4-10	5	14-33	6-9	4	12-28	7-13	1	22	8	1	19	7
Sangiovese*	2	27-36	6-11	6	25-34	8-13	2	20-36	5-10	5	18-22	6-9	6	14-21	11-14
Montepulciano*	0	—	—	2	22-24	8-15	0	—	—	4	21-30	7-9	4	14-23	13-15
Malbec*	2	15-33	9-13	1	15	7	0	—	—	2	10-31	6-11	0	—	—
Uva di Troia*	0	—	—	2	17-26	11-15	2	11-18	6-9	2	22-27	7-14	3	23-33	16-18
Lambrusco*	0	—	—	2	12-27	9-13	1	15	9	3	18-24	7-15	3	13-25	12-15
Trebbiano Toscano**	2	21-26	6-15	0	—	—	2	23-27	7-13	4	23-26	12-17	4	22-28	6-9
Verdeca**	2	22-31	5-11	3	19-28	11-16	1	13	11-14	2	11-15	6-9	1	21	11
Bianco d'Alessano**	1	13	6	2	15-26	8-9	1	18	12	1	16	8	0	—	—
Fiano**	0	—	—	0	—	—	1	10	9	0	—	—	0	—	—
Bombino bianco**	0	—	—	0	—	—	1	12	6	2	14-18	9-11	1	11	15
Greco di Tufo**	2	18-21	4-8	3	12-26	7-16	1	18	9	3	11-26	7-12	0	—	—
Susamanello**	2	23	6-9	1	20	13	1	23	6	2	15-19	8-9	0	—	—
Primitivo*	0	—	—	0	—	—	0	—	—	5	23-27	7-9	0	—	—
Merlot*	0	—	—	0	—	—	0	—	—	0	—	—	2	12-21	8-12
Ciliegiolo*	0	—	—	0	—	—	0	—	—	0	—	—	1	17	11
Lacrima**	1	19	12	0	—	—	0	—	—	0	—	—	0	—	—
Moscato di Trani**	0	—	—	0	—	—	0	—	—	0	—	—	1	23	9
Aleatico**	0	—	—	0	—	—	0	—	—	0	—	—	2	13-18	12-15
<b>Totale</b>	<b>31</b>	<b>—</b>	<b>—</b>	<b>35</b>	<b>—</b>	<b>—</b>	<b>24</b>	<b>—</b>	<b>—</b>	<b>38</b>	<b>—</b>	<b>—</b>	<b>30</b>	<b>—</b>	<b>—</b>

\* = bacche bianche; \*\* = bacche rosse

n. = numero di vigneti monitorati; % = incidenza della malattia; Età = età media dei vigneti.

\* Università di Foggia email: s.frisullo@unifg.it

**Tab. 2 - Percentuali di esca manifesta e cumulata nei quattro vigneti; data di prima comparsa dei sintomi, pioggia cumulata e data in cui è stata raggiunta l'incidenza massima stagionale**

Vigneto	Anno	Esca manifesta (%)	Esca cumulata <sup>1</sup> (%)	Data di comparsa dei primi sintomi	Pioggia <sup>2</sup> (mm)	Data di incidenza annuale massima
1	2005	1,1	—	6 luglio	193,2	14 luglio
	2006	1,0	2,0	5 luglio	121,0	9 agosto
	2007	3,2	5,3	11 giugno	128,2	7 agosto
2	2005	5,3	—	14 luglio	259,8	13 settembre
	2006	3,7	8,6*	5 luglio	140,2	13 settembre
	2007	5,4	12,7*	20 giugno	196,2	29 agosto
3	2005	6,5	—	n.r.	n.r.	n.r.
	2006	8,5	13,0	n.r.	n.r.	n.r.
	2007	10,0	19,5*	n.r.	n.r.	n.r.
4	2005	3,8	—	n.r.	n.r.	n.r.
	2006	6,4	8,4*	n.r.	n.r.	n.r.
	2007	4,5	10,1*	n.r.	n.r.	n.r.

<sup>1</sup> I valori contrassegnati dall'asterisco rappresentano percentuali di esca cumulata significativamente maggiori di quelle di esca manifesta nello stesso anno (Test Chi-Quadro, P = 0,01).

<sup>2</sup> Pioggia cumulata dal germogliamento (fase 05, Lorenz) alla data di prima comparsa dei sintomi. n.r. = non rilevato.

registrate a fine inverno e primavera; tali condizioni hanno, infatti, determinato un anticipo della ripresa vegetativa di circa 10-15 giorni rispetto al normale andamento stagionale.

Non sembra ci sia invece nessuna correlazione fra la pioggia e la data di prima comparsa dei sintomi della malattia.

L'incidenza annuale della malattia variava dall'1% (vigneto 1) al 10% (vigneto 3); nei vigneti 2 e 4 le percentuali di esca cumulata calcolate negli anni 2006 e 2007 erano significativamente maggiori di quelle di esca manifesta nei medesimi anni (P = 0,01).

Per quanto concerne l'evoluzione dei sintomi durante la stagione estiva, monitorata nei vigneti 1 e 2, in tutti e tre gli anni è stato osservato un rapido incremento del numero di piante sintomatiche durante la prima parte della stagione (indicativamente durante il mese successivo alla data di prima comparsa dei sintomi); nel 2006, solo nel vigneto 2, nuove piante sintomatiche sono comparse durante la seconda settimana di settembre, forse determinate dalle condizioni piovose e fresche che hanno caratterizzato il mese di agosto dello stesso anno.

### III.7 Il mal dell'esca della vite in Sardegna

S. Serra\*, M.A. Mannoni, V. Ligios

La sperimentazione compiuta in Sardegna ha riguardato la valutazione della comparsa dei sintomi di mal dell'esca in rapporto a varietà e cloni diversi e in relazione all'andamento climatico. Sono stati scelti tre vigneti il cui monitoraggio era già cominciato a partire dal 2002.

Ogni vigneto è costituito da una diversa varietà e ogni varietà è rappresentata da due cloni; in particolare sono state esaminate due varietà internazionali, Sauvignon blanc (cloni ISV1 e R3 sul portinnesto SO4) e Cabernet Sauvignon (cloni R5 e 338 su portinnesto 110R), e una locale, Cannonau (cloni 70 e 362 su portinnesto 110R).

I tre vigneti monitorati sono situati nell'azienda vitivinicola Sella & Mosca, in provincia di Sassari, allevati a pergoletta sarda, sottoposti alle medesime tecniche colturali e a vendemmia meccanica. La manifestazione di sintomi di mal dell'esca è stata seguita dal 2002 al 2007 su oltre 500 viti per clone. Al momento del primo rilievo i vigneti di Sauvignon blanc, Cabernet Sauvignon e Cannonau avevano 13, 11 e 10 anni rispettivamente. Ogni anno sono stati registrati i sintomi cronici sulla parte aerea come tigrature (specifici) e clorosi o necrosi del margine o del lembo fogliare (aspecifici), spesso accompagnati da defogliazione e avvizzimento della vegetazione e/o da disidratazione e seccumi dei grappoli (*fig. 1*). Inoltre, sono stati registrati i fenomeni di apoplezia (*fig. 2*), cioè avvizzimento improvviso della vegetazione, e di mancata ripresa vegetativa, entrambi a carico di uno solo dei due cordoni o dell'intera pianta. I dati sono stati espressi come percentuale di viti manifestanti sintomi.

Dal 2002 al 2004 è stato compiuto un solo rilievo ad agosto o a settembre. Dal 2005 al 2007, invece, sono stati compiuti 4 rilievi mensili (da giugno a settembre nel 2005 e da maggio ad agosto nel 2006 e 2007). I dati climatici sono stati ottenuti da una capannina meteorologica (Prometeo, Micros) localizzata entro il perimetro aziendale.

#### *Evoluzione annuale dei sintomi*

L'incidenza annuale di mal dell'esca nei tre vigneti esaminati si è attestata su livelli medio-alti (*fig. 3*) ed è aumentata in modo più o meno costante nel corso degli anni (se si esclude un calo nel 2003 su tutte le varietà e nel 2007 sulla cv. Cannonau). Nonostante il numero di piante con sintomi sia aumentato, non sono state sempre le stesse a manifestarli. Come è noto, la comparsa dei sintomi fogliari di mal dell'esca è casuale: le piante con legno alterato non manifestano costantemente i sintomi sulla parte aerea, ma in alcuni anni possono sembrare apparentemente risanate. Nella *fig. 3* sono riportate sia le percentuali di piante con sintomi

\* Università di Sassari email: salvase@uniss.it

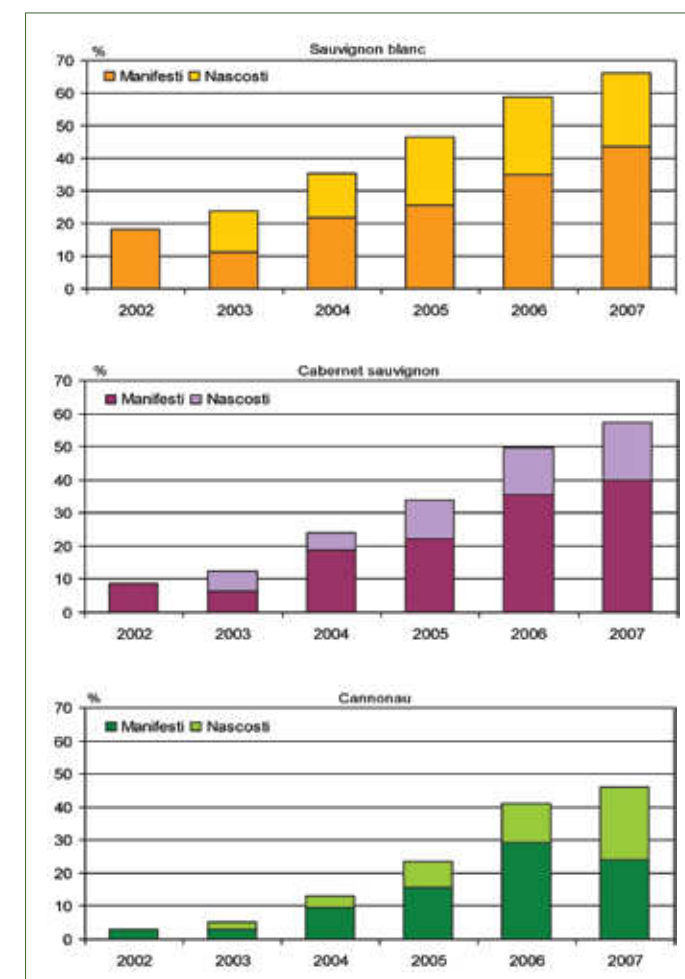


Fig. 1 - Tigrature su Cabernet Sauvignon (a), Cannonau (b) e Sauvignon blanc (c); necrosi del margine su Sauvignon blanc (d); tigrature insieme a defogliazione dei tralci, disidratazione e avvizzimento dei grappoli su Cannonau (e); necrosi del lembo insieme a disidratazione e avvizzimento dei grappoli su Cannonau (f)



Fig. 2 - Apoplezia su viti in fase fenologica di grappolini separati cv. Sauvignon blanc (a), in pieno sviluppo vegetativo cv. Cannonau (b) e in fase di maturazione avanzata cv. Cannonau (c)

Fig. 3 - Percentuali di viti di Sauvignon Blanc, Cabernet Sauvignon e Cannonau con sintomi fogliari di mal dell'esca nell'anno del rilievo (manifesti) e negli anni precedenti (nascosti)



sulla parte aerea nell'anno del rilievo (manifesti) sia quelle delle viti che avevano manifestato sintomi solo negli anni precedenti (nascosti). Quest'ultima percentuale è risultata maggiore nella cv. Sauvignon blanc in tutti gli anni di rilievo; in tutte le varietà, le viti con sintomi nascosti sono risultate inferiori a quelle con sintomi manifesti.

In tab. 1 sono riportate le percentuali di viti con sintomi di diversa tipologia. Le viti con sintomi cronici di tigratura, eventualmente presenti insieme a quelli aspecifici, sono risultate mediamente più numerose sulla cv. Cabernet Sauvignon. Sulla cv. Sauvignon blanc, invece, sono state maggiori le percentuali medie di quelle che hanno manifestato solo sintomi aspecifici, di apoplezia o che non hanno vegetato, in toto o in parte. È necessario però sottolineare che le piante o i cordoni morti non sempre avevano manifestato sintomi cronici di mal dell'esca o apoplezia negli anni precedenti.

L'analisi della regressione tra la percentuale di viti con sintomi cronici (tigrature più aspecifici) o di apoplezia da una parte e la pioggia caduta dal mese di maggio al momento del rilievo dall'altra, non ha evidenziato alcuna relazione tra i due parametri.

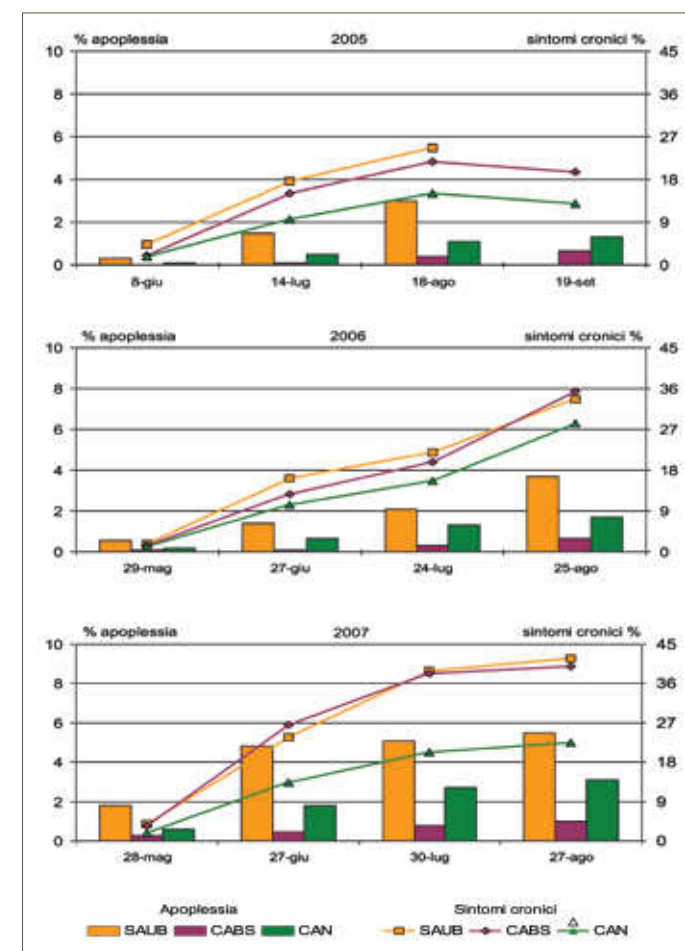
**Tab. 1 - Percentuali di viti di Sauvignon blanc, Cabernet Sauvignon e Cannonau manifestanti diverse tipologie di sintomi fogliari di mal dell'esca nei sei anni di indagine**

Cultivar	Anno	Tigrature	Aspecifici	Apoplessia	Mancato germogliamento
Sauvignon blanc	2002	10,9	7,4	0,7	1,5
	2003	6,8	4,0	1,2	4,3
	2004	17,3	4,1	0,9	5,5
	2005	14,2	10,5	3,0	8,2
	2006	20,0	13,7	3,7	6,6
	2007	28,0	13,8	5,5	9,4
	Media	16,2	8,9	2,5	5,9
Cabernet Sauvignon	2002	8,6	0,2	0,3	0,3
	2003	5,8	0,4	0,1	0,8
	2004	18,3	0,2	0,3	0,7
	2005	21,2	0,8	0,7	0,6
	2006	27,7	7,0	0,7	3,0
	2007	39,1	0,8	1,0	3,4
	Media	20,1	1,6	0,5	1,4
Cannonau	2002	2,7	0,3	0,2	0,9
	2003	0,4	2,2	0,8	0,8
	2004	8,1	1,3	0,5	2,3
	2005	10,8	4,5	1,3	4,9
	2006	21,5	6,8	1,7	5,7
	2007	20,9	1,7	3,1	10,8
	Media	10,7	2,8	1,2	4,2

**Evoluzione mensile dei sintomi**

I risultati dei rilievi mensili dal 2005 al 2007 sono riportati nella *fig. 5*. Nel 2005 sulla cv. Sauvignon blanc sono stati eseguiti solo 3 rilievi. Per tale cultivar, più precoce delle altre due, nell'ambiente considerato viene di solito effettuata la raccolta entro la fine di agosto. Non è stato quindi possibile effettuare il rilievo a settembre. Sempre nel 2005, tra agosto e settembre sulle altre due varietà non c'è stato alcun incremento di piante sintomatiche. Anzi, la presenza di sintomi di origine fisiologica (invecchiamento, stress idrico ecc.) e di accartocciamento fogliare, questi ultimi presenti in modo più o meno intenso su entrambe le cultivar rosse, hanno ostacolato il rilievo, tanto da far passare inosservate viti con sintomi lievi di mal dell'esca. Ciò ha portato a un'apparente regressione delle piante sintomatiche. Per questi motivi, nel 2006 e nel 2007 i rilievi sono iniziati una decina di giorni in anticipo rispetto al 2005, a fine maggio, e si sono conclusi a fine agosto.

*Fig. 5 - Percentuali di viti delle cv. Sauvignon blanc (SAUB), Cabernet Sauvignon (CABS) e Cannonau (CAN) con sintomi cronici o di apoplessia rilevate mensilmente dal 2005 al 2007*



Per quanto riguarda l'evoluzione stagionale dei sintomi cronici (tigrature più aspecifici), questi hanno iniziato a manifestarsi a fine maggio su un ridotto numero di viti. Tale numero ha subito poi un incremento non sempre regolare. Nel 2007 il numero di piante sintomatiche è aumentato in modo consistente tra maggio e luglio, mentre tra luglio e agosto, il numero di nuove piante sintomatiche è stato alquanto ridotto. Nel 2005 l'incremento maggiore è stato registrato a luglio e nel 2006 ad agosto.

Anche i primi sintomi di apoplessia hanno cominciato a manifestarsi a fine maggio, ma in alcuni casi anche prima. Si è trattato per la maggior parte di piante in fase fenologica di grappolini separati o di fioritura, ma alcune erano ancora in fase di grappolini visibili o in fasi precedenti (il germogliamento, nei tre anni considerati, è iniziato tra la fine di marzo e i primi 10 giorni di aprile per le tre varietà). Come prevedibile, il numero di fenomeni di apoplessia a carico dell'intera pianta o di un solo cordone è aumentato nel corso dell'estate,



Fig. 4 - Sintomi di accartocciamento fogliare e di mal dell'esca sulla stessa vite cv. Cabernet Sauvignon

man mano che sono diventate più intense le esigenze idriche delle viti, con un incremento più o meno regolare fino all'ultimo rilievo, a eccezione del 2007. In quest'annata, l'incremento maggiore è stato registrato a fine giugno; inoltre, sulla cv. Sauvignon blanc il fenomeno si è quasi stabilizzato con un numero successivo di eventi apoplettici molto ridotto.

L'analisi della regressione tra la percentuale di viti con sintomi cronici e la piovosità nel periodo compreso tra un rilievo e l'altro (per il primo rilievo è stata considerata la pioggia caduta a partire dal primo maggio) non ha messo in evidenza nessuna interazione tra questi due parametri. Considerando, invece, gli incrementi percentuali di piante sintomatiche tra un rilievo e l'altro è risultata una correlazione di secondo grado, di tipo parabolico, per tutte e tre le varietà. Ciò significa che gli incrementi di viti con sintomi cronici sono maggiori in corrispondenza di valori di piovosità intermedi. Ciò può essere spiegato se si considera che i valori di piovosità più elevati vengono di solito rilevati nel periodo primaverile (maggio, in questo caso) quando lo sviluppo vegetativo delle viti è ancora limitato e i sintomi iniziano a manifestarsi su un numero ridotto di piante. Quando invece la pianta ha raggiunto uno sviluppo vegetativo adeguato, tra giugno e luglio, i valori di piovosità si riducono. In questa seconda fase, però, è evidente che periodi di maggiore piovosità favoriscono la comparsa dei sintomi cronici. Al contrario, non è stata evidenziata nessuna correlazione tra i mm di pioggia caduti tra un rilievo e l'altro e la percentuale (o l'incremento percentuale) di viti con sintomi di apoplezia.

### III.8 Il mal dell'esca della vite in Sicilia

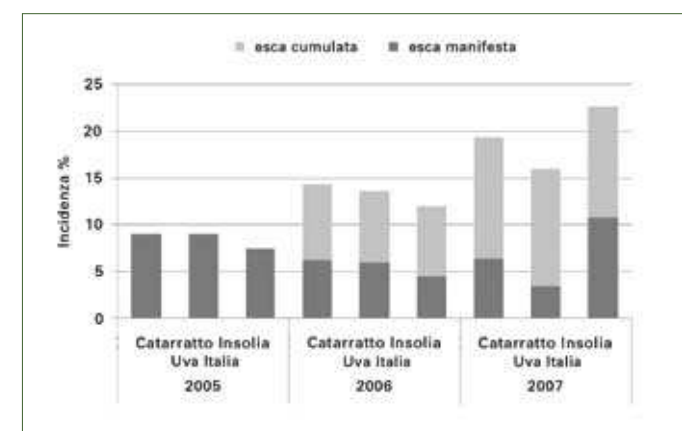
S. Burruano\*, A. Alfonzo, G. Conigliaro, V. Mondello, L. Torta

Nei vigneti siciliani, il mal dell'esca è stato segnalato per la prima volta da Lionello Petri, intorno ai primi anni del secolo scorso (Petri, 1912), su viti di età (4-18 anni), varietà e portainnesto differenti, provenienti dai vivai reggi e ricadenti in diversi areali viticoli dell'isola (Messina, Palermo, Trapani). L'Autore, inoltre, isolò e identificò gli agenti eziologici dell'alterazione, accertandone la natura fungina.

Dalla fine degli anni sessanta alla fine degli anni novanta, nei vigneti dell'area etnea e dell'agrigentino si è assistito a una progressiva recrudescenza della malattia, a carico sia di uve da vino che di uve da tavola (Grasso, 1969; Granata, 1980; Schilirò *et al.*, 1996) e, nel contempo, a un incremento costante dell'incidenza su piante giovani (Sidoti *et al.*, 2000).

Nel triennio 2004-2007, nell'ambito del Progetto interregionale MESVIT, si è ritenuto opportuno studiare l'evoluzione del mal dell'esca in vigneto durante la stagione estiva, isolare e identificare i microrganismi fungini costantemente associati alle alterazioni dello xilema, e individuare eventuali "limitatori naturali" dei funghi dell'esca. Per quanto riguarda i rilievi epidemiologici, condotti da fine giugno a fine agosto nel 2005 e da fine maggio a fine settembre negli anni successivi, è stata valutata l'incidenza della malattia e la severità dei sintomi (calcolata su 1000 piante), mediante rilievi cadenzati ogni 20 giorni sulle cv. Insolia e Catarratto — allevate a spalliera, in agro di Alcamo (PA) — e mensili su un tendone irrigato di uva Italia a Canicattì (AG).

Fig. 1 - Incidenza media annuale (manifesta) e cumulata (somma dell'incidenza dell'esca manifesta e dell'esca nascosta) rilevata sulle cultivar indagate nei tre anni di indagini



\* Università di Palermo email: santella@unipa.it

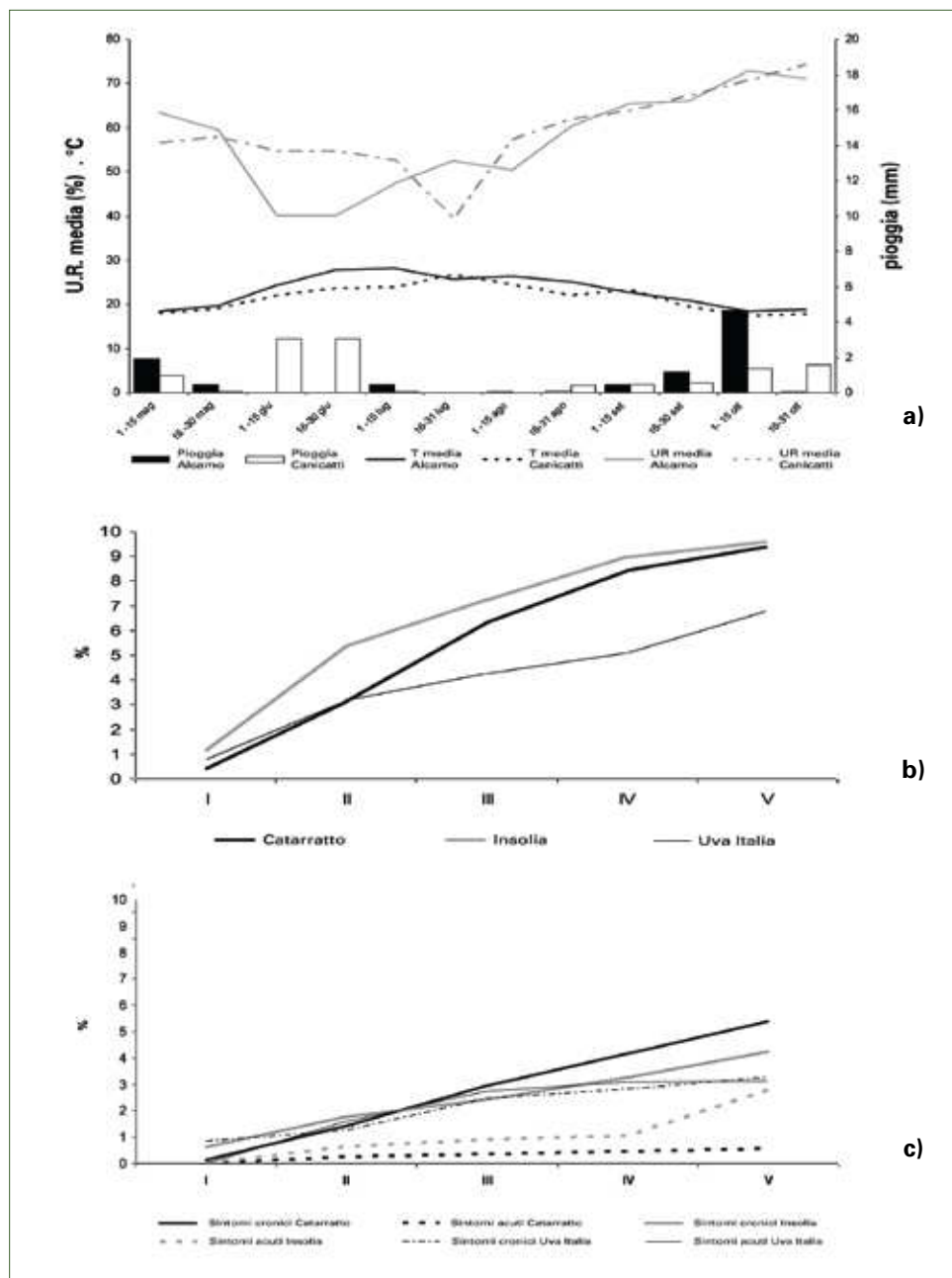


Fig. 2 - Andamento della temperatura, umidità e pioggia da maggio a settembre 2005 nelle località di Alcamo e Canicatti (a); andamento dell'incidenza del mal dell'esca rilevato sulle diverse cultivar da maggio a settembre 2005 (b) e dell'intensità dei sintomi nello stesso periodo (c)

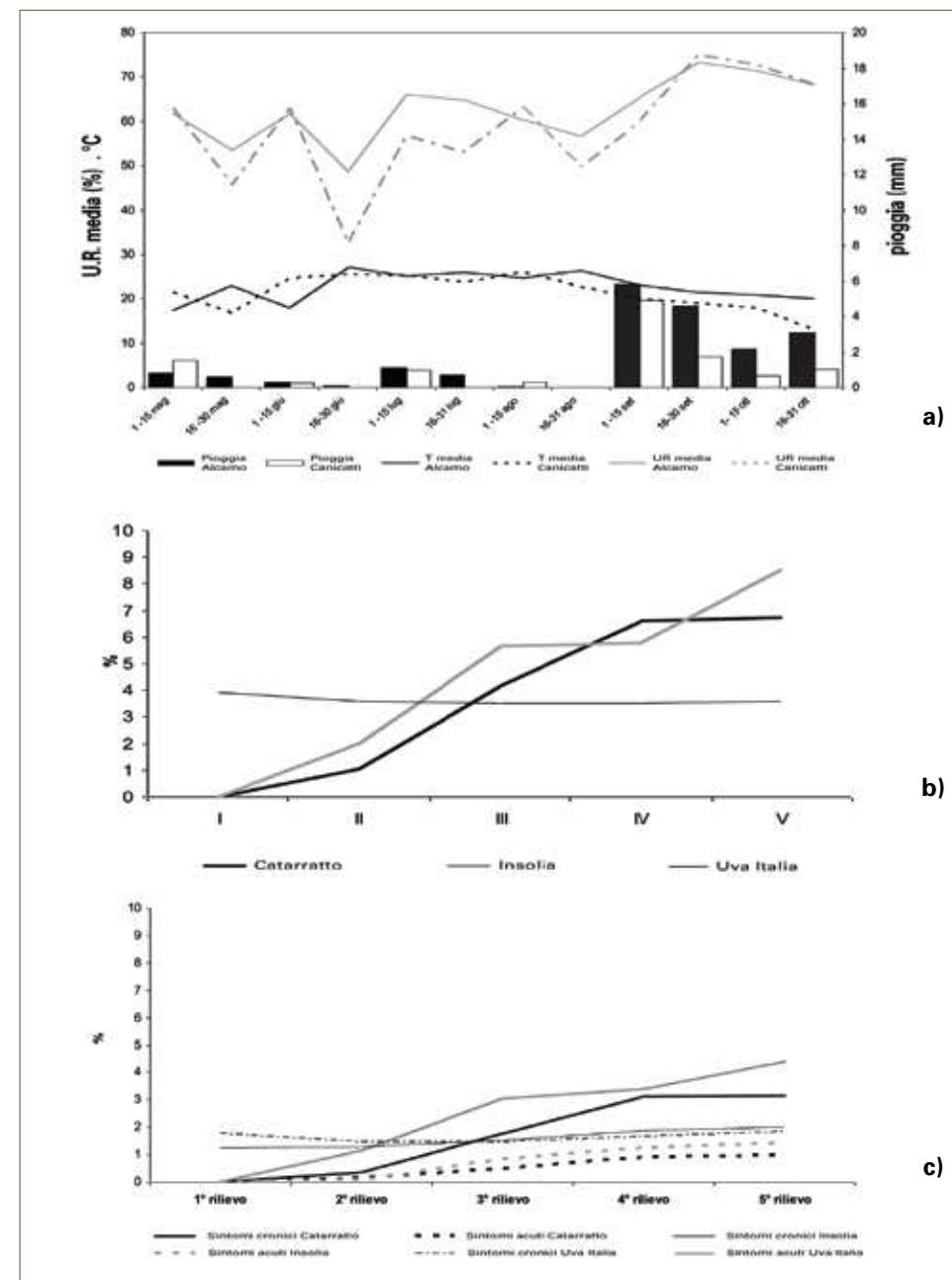


Fig. 3 - Andamento della temperatura, umidità e pioggia da maggio a settembre 2006 nelle località di Alcamo e Canicatti (a); andamento dell'incidenza del mal dell'esca rilevato sulle diverse cultivar da maggio a settembre 2006 (b) e dell'intensità dei sintomi nello stesso periodo (c)

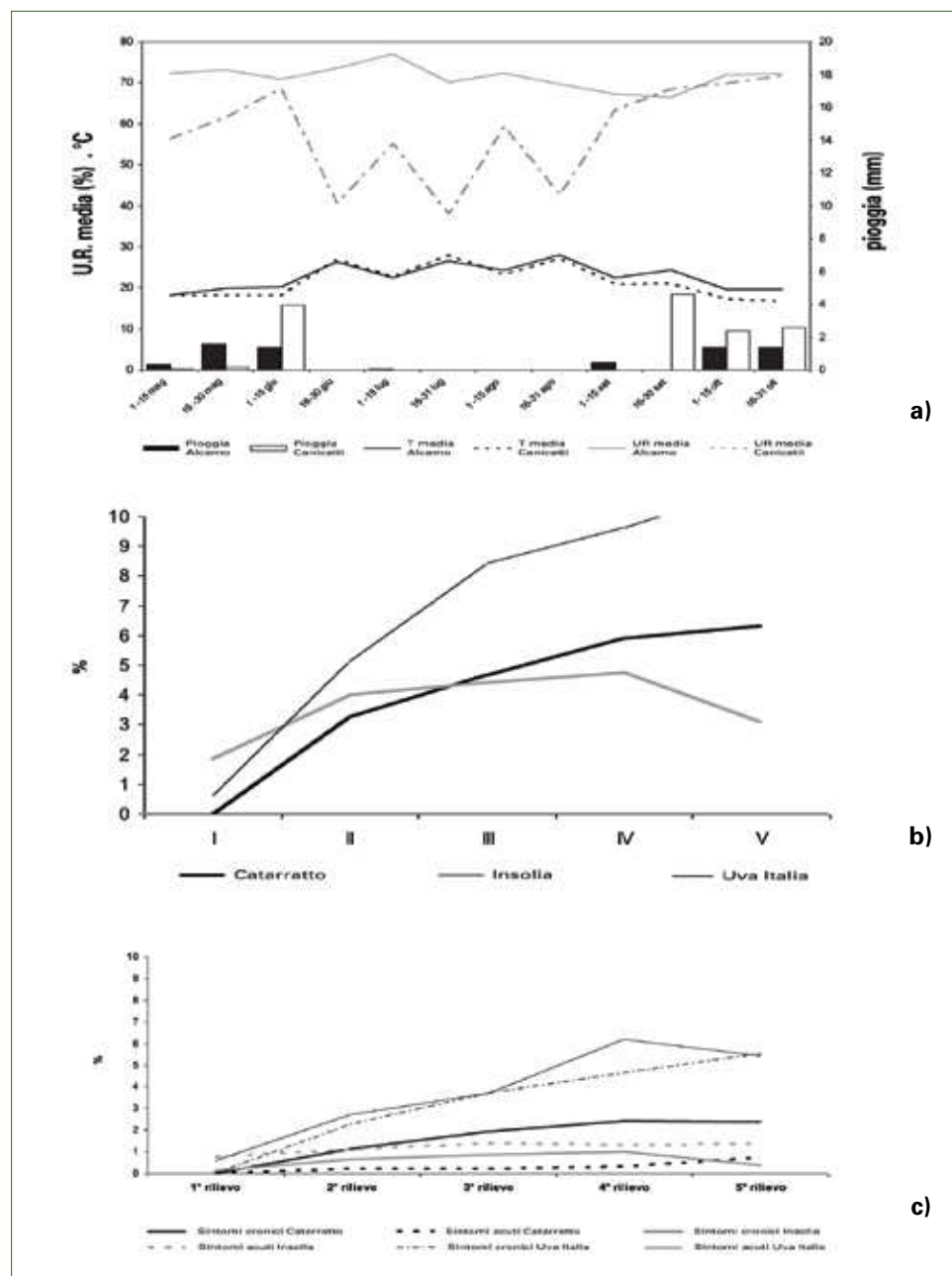


Fig. 4 - Andamento della temperatura, umidità e pioggia da maggio a settembre 2007 nelle località di Alcamo e Canicattì (a); andamento dell'incidenza del mal dell'esca rilevato sulle diverse cultivar da maggio a settembre 2007 (b) e dell'intensità dei sintomi nello stesso periodo (c)

Nel corso dei rilievi epidemiologici in località di Alcamo, mensilmente, sono state estirpate piante di una o, quando possibile, di entrambe le cultivar sintomatiche che, sezionate in più porzioni per la visualizzazione dei sintomi xilematici (zone cariogene e punteggiature e/o aree nere), sono state sottoposte alle usuali tecniche di isolamento.

Relativamente ai saggi d'antagonismo, mediante saggi diretti o/e indiretti, è stata accertata l'eventuale attività antagonistica di 4 ceppi del genere *Acremonium* e uno di *Bacillus subtilis* nei confronti dei microrganismi fungini, più frequentemente associati ai sintomi xilematici. In particolare, sono stati impiegati un isolato di *A. byssoides* (A20), ottenuto precedentemente da viti asintomatiche e del quale era stata dimostrata l'antibiosi e l'iperparasitismo verso *Plasmopara viticola*, tre isolati dello stesso genere fungino e uno di *Bacillus subtilis*, ottenuti da sintomi interni di piante infette da esca. I risultati dei rilievi epidemiologici, effettuati nel triennio, evidenziano un notevole incremento dell'incidenza dell'esca cumulata rispetto all'incidenza dell'esca manifesta, confermando l'elevata fluttuazione dei sintomi da una stagione vegetativa alla successiva (fig. 1).

Per quanto concerne le osservazioni sull'evoluzione del mal dell'esca in campo, è emerso che l'esca manifesta può comparire già a fine maggio e progredire durante la stagione estiva con una dinamica diversa, in relazione al tipo di cultivar e all'andamento climatico dell'area viticola considerata. In particolare, nel primo anno di indagine (2005), l'incidenza e la intensità dell'esca manifesta si sono incrementate, più o meno gradualmente, da giugno a settembre raggiungendo valori medi comunque contenuti (fig. 2). L'anno seguente (2006) è stato rilevato un decremento dei sintomi esterni, più accentuato in agro di Canicattì, dove i valori medi della diffusione e severità dei sintomi si sono dimezzati (fig. 3). In entrambi gli anni, a fine luglio, per ciascuna varietà sono stati individuati singoli casi di apoplessia, che hanno ripreso a vegetare successivamente.

Nel 2007, l'ingente e inusuale piovosità primaverile, verificatasi nel corso dell'indagine, avrebbe determinato, contrariamente a quanto rilevato in altri ambienti, una precocità di comparsa sia dei sintomi che dei casi di deperimento fulminante e un aumento di questi ultimi (27/5) in entrambe le località indagate, ma solo sulle cv. Insolia e Italia (fig. 4). Durante la stagione estiva, la diffusione della malattia e la gravità dei sintomi sono aumentate, più o meno gradualmente, raggiungendo i valori medi più elevati nel vigneto di Canicattì (11,1%).

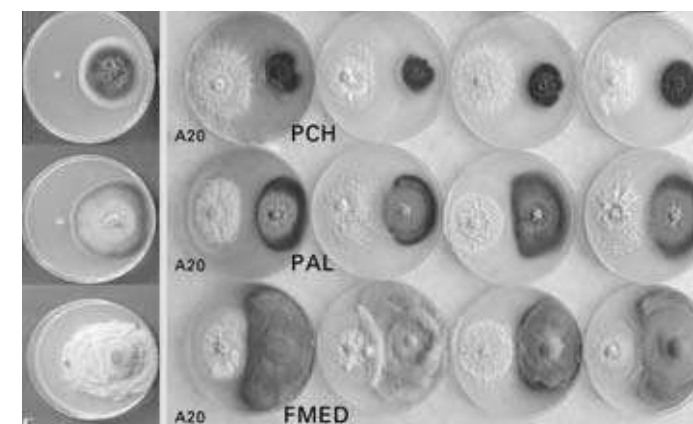


Fig. 5 - Metodo diretto: attività antagonistica di *Acremonium byssoides* (A20) nei confronti dei funghi agenti del mal dell'esca (C = testimone)



**Tab. 1 - Frequenza d'isolamento dei microrganismi fungini e batterici rilevata in relazione al tipo di sintomo xilematico e all'anno di indagine**

Cultivar	Anno	Punteggiatura	Legno rosa	Carie
Catarratto		n.r.	n.r.	n.r.
Insolia	2005*	48% <i>Pch</i> 2,2% <i>Hyalodendron</i> spp. 0,3% <i>Bacillus subtilis</i>	6,3% <i>Pch</i> 0,8% <i>Pal</i> 0,4% <i>Fmed</i> 0,4% <i>Hyalodendron</i> spp.	16% <i>Pch</i> 8,2% <i>Fmed</i> 0,8% <i>Acremonium</i> spp. 0,4% " <i>Botryosphaeria</i> " spp.
		19,5% <i>Pch</i> 3,5% <i>Fmed</i> 0,7% <i>Bacillus subtilis</i>	14,3% <i>Pch</i> 2,7% <i>Pal</i>	11,1% <i>Pch</i> 11,1% <i>Fmed</i> 3,6% <i>Acremonium</i> spp. 4,5% <i>Bacillus subtilis</i>
Insolia	2006*	43,7% <i>Pch</i> 4,5% <i>Pal</i> 8,2% <i>Fmed</i>	2% <i>Pch</i> 0,5% <i>Pal</i>	5,8% <i>Pch</i> 4,5% <i>Pal</i> 37,7% <i>Fmed</i>
		36% <i>Pch</i> 7,9% <i>Fmed</i> 1,6% " <i>Botryosphaeria</i> " spp. 0,6% <i>Pal</i> 0,6% <i>Hyalodendron</i> spp.	3,4% <i>Acremonium</i> spp. 0,4% <i>Pal</i>	36,3% <i>Fmed</i> 3,9% <i>Pch</i> 1,6% <i>Pal</i> 1,0% " <i>Botryosphaeria</i> " spp.
Insolia	2007	41,6% <i>Pch</i> 4,2% <i>Fmed</i> 2,5% " <i>Botryosphaeria</i> " spp. 0,8% <i>Pal</i> 0,8% <i>Hyalodendron</i> spp.	1,5% <i>Pal</i> 0,7% " <i>Botryosphaeria</i> " spp.	31,5% <i>Fmed</i> 4,0% <i>Pch</i> 1,5% " <i>Botryosphaeria</i> " spp. 0,3% <i>Hyalodendron</i> spp.

\* Alcamo è la località delle rilevazioni sulle cultivar Catarratto e Insolia, negli anni 2005-2006.

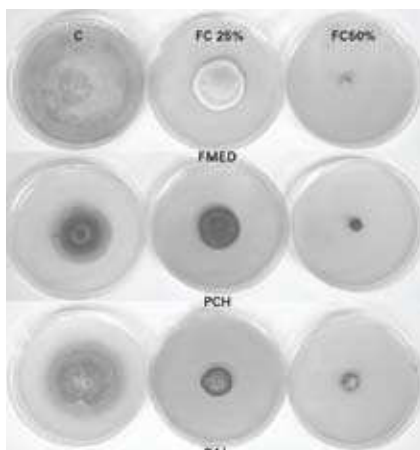


Fig. 6 - Metodo indiretto: attività antifungina del filtrato culturale di *Bacillus subtilis* a due differenti concentrazioni: 25% e 50% v/v (C = controllo; FC = filtrato culturale)

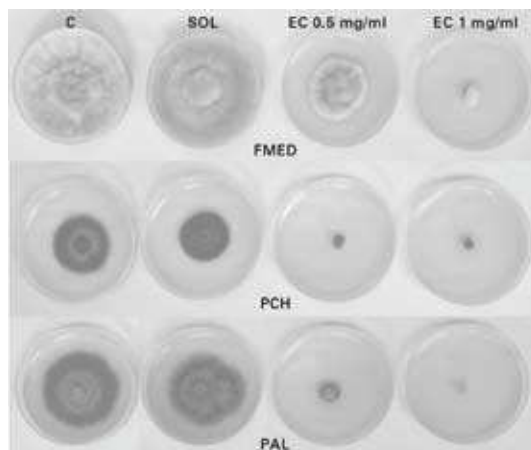


Fig. 7 - Metodo indiretto: Attività antifungina dell'estratto crudo di *Bacillus subtilis* AG1 a due differenti concentrazioni: 1 mg/ml e 0,5 mg/ml (C = controllo; Sol = controllo con solvente; EC = estratto crudo)

I risultati dei saggi d'isolamento, effettuati nel corso delle prove, dimostrano che anche negli areali viticoli siciliani i responsabili del "mal dell'esca" sono i due funghi vascolari *Pch* e *Pal* e il cariogeno *Fmed*, caratterizzati, comunque, da una diversa frequenza d'isolamento in relazione al tipo di sintomo xilematico e all'anno di indagine. Dai tessuti legnosi sintomatici, nel contempo, sono state isolate anche sporadiche colonie di altri microrganismi fungini e batterici appartenenti, rispettivamente ai generi *Acremonium*, *Botryosphaeria*, *Hyalodendron* e *Bacillus* (tab. 1).

Relativamente ai saggi d'antagonismo, i dati ottenuti, sebbene preliminari, indicano A20 e *B. subtilis* come possibili "limitatori naturali" di *Pch*, *Pal* e *Fmed*. Nel corso dei saggi diretti A20 ha contenuto, infatti, la crescita dei patogeni tracheomicotici, modificandone anche la morfologia; gli altri ceppi del genere *Acremonium*, hanno inibito lo sviluppo di *Pch*, mentre le loro colonie si sono sovrapposte a quelle di *Pal* e *Fmed* (fig. 5).

Una capacità di biocontrollo dei tre funghi dell'esca ancora più accentuata ha mostrato *B. subtilis* sia nei saggi diretti che indiretti, questi ultimi effettuati impiegando filtrati colturali, e estratti crudi del batterio in dosi diverse; gli estratti crudi in particolare hanno inibito la crescita dei patogeni tracheomicotici già alla dose d'impiego più bassa (0,5 mg/ml; figg. 6, 7 e 8).

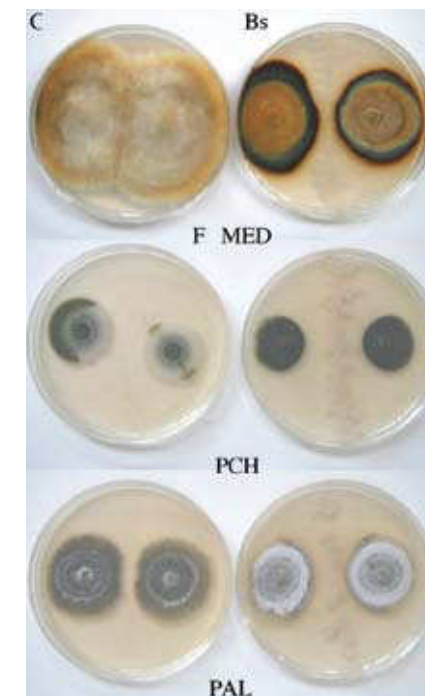


Fig. 8 - Metodo diretto: attività antagonistica di *Bacillus subtilis* (AG1) nei confronti dei funghi agenti del mal dell'esca (C = testimone; Bs = *Bacillus subtilis*)

### III.9 Il mal dell'esca della vite in Toscana

G. Marchi\*, G. Surico, L. Mugnai, P. Braccini

I primi rilievi sull'incidenza e la diffusione del mal dell'esca in Toscana sono iniziati nel 1992 in un vigneto a San Casciano Val di Pesa (FI) (dell'età di 21 anni nel 1992), presso l'azienda agraria Montepaldi. I rilievi, estesi per tre anni (fino al 1994), rilevarono un'incidenza annuale del 46,43% nel 1992; del 63,37% nel 1993 e del 19,62% nel 1994. L'incidenza cumulata (risultante dal conteggio di tutte le piante che avevano manifestato i sintomi fogliari in almeno uno degli anni delle osservazioni) risultò del 77,28% per il 1992-1993 e dell'82,25% nel 1992-1994. Questi primi dati suggerivano allora almeno tre importanti valutazioni di tipo epidemiologico:

- a) le piante ammalate non manifestavano i sintomi della malattia tutti gli anni;
- b) l'incidenza annuale della malattia, anche molto variabile, dipendeva, in parte, dall'andamento stagionale;
- c) la distribuzione spaziale delle piante nel vigneto era di tipo casuale senza alcuna aggregazione di piante ammalate lungo i filari (ciò escludeva che la malattia potesse diffondersi con gli strumenti di potatura).

Dal 1993 al 1998, in collaborazione con il personale tecnico della Regione, fu rilevato un secondo vigneto, questo a Gambassi Terme (FI) (*tab. 1*), dell'età di 23 anni all'inizio dei rilievi, e, dal 1995 al 1998, tre altri vigneti a Castelnuovo Berardenga (SI) (di 13 anni nel 1995), e a Laterina (AR), dell'età di 10 anni nel primo anno di rilievi (1997).

I risultati dei nuovi rilievi confermarono quanto emerso da quelli a San Casciano Val di Pesa e permisero ulteriori valutazioni epidemiologiche:

1. i colpi apoplettici potevano verificarsi anche presto nella stagione (giugno) e lontano da periodi di pioggia (si era sempre pensato che l'apoplessia potesse sopraggiungere solo nel pieno dell'estate dopo una giornata di pioggia seguita da venti caldi);
2. le piante sintomatiche, in un vigneto in forte pendio, tendevano a concentrarsi nelle zone più pianeggianti;
3. le piante ammalate tendevano a manifestare i sintomi, in maggiore percentuale, da metà giugno a metà luglio;
4. una pianta ammalata poteva non ripresentare i sintomi fogliari anche per 6 anni consecutivi;
5. un'annata piovosa era favorevole alla comparsa dei sintomi fogliari; invece, un'annata calda e asciutta era favorevole ai colpi apoplettici;

\* Università di Firenze email: guido.marchi@unifi.it

Anno	N. piante in piedi	Colpi apoplettici	Sintomi acuti e cronici	Sintomi cronici + apoplettici	
				Esca manifesta	Esca cumulata
1993	546	1,8	13,9	15,8	15,8
1994	535	2,8	13,3	16,1	24,7
1995	521	1,9	9,2	11,1	28,8
1996	514	3,1	14,6	17,7	33,7
1997	490	2,7	13,5	16,1	37,6
1998	483	2,9	13,3	16,1	42,0
1999	470	0,9	16,2	17,0	44,3
2000	452	5,5	19,9	25,4	50,7
2001	424	1,7	18,4	20,0	53,1
2002	401	4,0	19,2	23,2	57,9
2003	372	2,7	15,9	18,5	54,6
2004	356	2,0	17,4	19,4	54,8
2005	335	4,2	13,4	17,3	54,6
2006	326	4,3	11,7	17,5	54,9
2007	302	6,0	15,9	20,9	55,3

\* Tutti i dati sono calcolati in percentuale sul numero totale di piante in piedi nell'anno.

Anno	N. piante in piedi	Colpi apoplettici	Sintomi acuti e cronici	Sintomi cronici + apoplettici	
				Esca manifesta	Esca cumulata
1997	1859	0,0	2,0	2,0	2,0
1998	1859	0,0	3,1	2,9	4,7
1999	1859	0,0	5,4	4,4	9,0
2000	1857	0,3	10,9	11,1	17,3
2001	1845	0,0	15,9	22,0	26,9
2002	1844	0,0	18,9	27,0	36,8
2003	1833	0,3	16,9	24,5	42,4
2004	1807	0,2	17,2	24,3	50,1
2005	1800	0,2	31,6	31,2	57,5
2006	1792	0,2	35,0	35,8	65,7
2007	1789	0,0	35,5	36,5	72,6

\* Tutti i dati sono calcolati in percentuale sul numero totale di piante in piedi nell'anno.

6. per avere un'idea più realistica dell'effettiva incidenza dell'esca in un vigneto occorre rilevare la malattia per almeno 3-5 anni;
7. la ricerca di una relazione tra quantità di carie nel legno e gravità della malattia non aveva dato alcun risultato;
8. cultivar diverse di vite sembravano possedere una diversa predisposizione alla manifestazione dei sintomi fogliari dell'esca;
9. il tipo di portinnesto, così come il tipo di suolo, non influiva in maniera particolare sulla comparsa dei sintomi fogliari.

Dopo il 1998 i rilievi sull'incidenza del mal dell'esca sono proseguiti, negli stessi vigneti e in altri, scelti per posizione geografica, per tipo di impianto o per età delle viti. Nelle *tabb. 1-2* sono stati riportati i dati relativi ai vigneti di Gambassi Terme (FI) e Laterina (AR) raccolti nel corso degli anni, parte dei quali, analizzati anche con metodi statistici, hanno permesso di documentare le osservazioni epidemiologiche sopra citate (Surico *et al.* 2000a, 2000b; Marchi *et al.*, 2006). I dati evidenziano, fra l'altro, come aumenta negli anni il numero totale delle piante che hanno manifestato i sintomi almeno una volta (esca cumulata), rispetto al numero di piante che sono sintomatiche nell'anno (esca manifesta). Tuttavia, mentre a Laterina l'esca cumulata aumenta progressivamente dal 1997 al 2007 passando dal 2 (1997) al 72,6% (2007), a Gambassi Terme l'esca cumulata aumenta solo di poco (dal 50,7 al 55,3%) o addirittura sembra diminuire (nel 2002 è più alta che negli anni successivi) per il semplice fatto che in questo vigneto, rispetto a quello di Laterina, sono stati osservati molti più colpi apoplettici, con conseguente diminuzione del numero di piante in piedi su cui calcolare l'incidenza della malattia.

Fra gli altri vigneti monitorati, in località Carmignano (PO) è stato rilevato per tre anni consecutivi un vigneto binato (due viti nella stessa posta) di Cabernet Sauvignon di 18 anni e i rilievi hanno confermato, tra l'altro, che la malattia non si trasmette lungo i filari: su 450 coppie di viti rilevate, solo in una minima percentuale di coppie entrambe le viti hanno mostrato sintomi nei tre anni delle osservazioni. Nella stessa località è stato monitorato un giovane vigneto di Merlot nel quale sono stati osservati i primi sintomi della malattia già 4 anni dopo l'impianto. Vigneti giovani sono stati monitorati anche in altre località della Toscana (in particolare varie zone del Chianti, della zona di Montalcino, e in generale della provincia di Siena, Firenze e Arezzo) dove sono stati osservati i primi sintomi di esca anche dopo 3 anni.

Indagini accurate sono state svolte anche su barbatelle messe a dimora in Toscana (Montalcino e altre località) provenienti da vivai della stessa regione o da altre ragioni. In questo caso è stata effettuata un'analisi di tipo molecolare rivolta ad accertare e quantificare la presenza di infezioni latenti da parte degli agenti dell'esca fin dal momento dell'impianto. Sono stati effettuati, per controllo, anche isolamenti su substrato artificiale.

Nel corso del triennio 2006-2008, è stata ricercata la presenza di *Phaeomoniella chlamydospora* (*Pch*) (Edwards *et al.*, 2007) e di specie fungine appartenenti alla famiglia delle Botryosphaeriaceae (protocollo messo a punto nel corso di questa ricerca) nel materiale di propagazione della vite con metodi molecolari (*nested-PCR*). Il materiale esaminato, proveniente da 2 vivai (A e B) e destinato a essere messo a dimora anche sul territorio regionale, era costituito principalmente da tralci di piante madri di portainnesto e da barbatelle innesta-



Fig. 1 - Risultati dell'analisi molecolare (*nested-PCR*) per rilevare la presenza del DNA di *Pch* nel materiale prelevato in alcune delle fasi del processo di propagazione della combinazione cv/portainnesto Merlot/SO4

te frigoconservate pronte per essere commercializzate. Saltuariamente sono stati esaminati anche innesti talea in uscita dalla forzatura, al momento del trapianto in barbatellaio e su piante di vite in uscita dal barbatellaio. I risultati dei saggi molecolari sono stati messi a confronto con quelli ottenuti mediante isolamento diretto dei funghi presenti nei tessuti legnosi su substrato artificiale. I risultati hanno confermato l'attitudine endofitica sia di *Pch* che delle Botryosphaeriaceae il cui DNA è stato rinvenuto rispettivamente nel 52 e nel 79% dei campioni provenienti dal vivaio A e nel 17 e 37% dei campioni provenienti dal vivaio B, ed evidenziato l'utilità di queste metodologie di diagnosi per analizzare materiale di propagazione apparentemente sano dai cui tessuti non è sempre stato possibile isolare direttamente i funghi target.

Nella *fig. 1* si riportano i risultati dell'analisi molecolare (*nested-PCR*) per rilevare la presenza del DNA di *Pch* nel materiale prelevato in alcune delle fasi del processo di propagazione della combinazione cv/portainnesto Merlot/SO4 nel vivaio B. Corsia 1, controllo negativo della PCR; corsie 2-6, innesti talea in uscita dalla forzatura; corsie 7-11, innesti talea pronti per il trapianto in barbatellaio; corsie 12 e 13, barbatelle 2 mesi dopo il trasferimento in barbatellaio; corsie 14 e 15, barbatelle 5 mesi dopo il trasferimento in barbatellaio; corsia 16, controllo positivo *Pch* 52; corsia 17, controllo positivo *Pch* 139; 18, marcatore di peso molecolare MassRuler™ DNA Ladder, Low Range, Fermentas. La banda chiara nel gel di elettroforesi segnala la presenza del DNA di *Pch* nei campioni da 11 (innesti talea) a 15 (barbatelle, dopo 5 mesi dal trasferimento in barbatellaio).

### III.10 Il mal dell'esca della vite in Trentino

L. Michelon, C. Pellegrini, I. Pertot\*

Il mal dell'esca in Trentino è sempre stata considerata come una malattia antica e presente soprattutto su alcune varietà, ma che non ha mai destato seria preoccupazione in quanto rilevata prevalentemente in impianti vecchi e con incidenze piuttosto basse (Dal Rì, 1996). Non si hanno però dati storici sull'incidenza e diffusione della malattia nella Provincia di Trento ed è quindi difficile stimare se negli ultimi decenni vi sia stato o meno un incremento.

I dati raccolti dal 2005 al 2007 su un centinaio di vigneti sparsi su tutto il territorio provinciale (fig. 1) hanno evidenziato una bassa incidenza media annuale della malattia (esca manifesta). Un debole incremento di incidenza è stato osservato tra il 2006 e il 2007, ma non tra il 2005 e il 2006 (Test Chi-Quadro, P = 0,01). I valori di esca cumulata registrati nel 2006 e nel 2007, come prevedibile, risultano essere significativamente maggiori rispetto a quelli dell'incidenza manifesta (Test Chi-Quadro, P = 0,01). I maggiori valori di incidenza cumulata sono determinati dall'elevata fluttuazione nella manifestazione dei sintomi da un anno all'altro e quindi da un numero elevato di piante che non mostrano i sintomi ogni anno (esca nascosta); infatti ben l'87,5% delle piante ha manifestato la malattia in uno solo dei tre anni di monitoraggio.

Dalle osservazioni svolte nei tre anni di rilievo, due sembrano essere i fattori che, influenzano in maniera determinante la presenza della malattia: la varietà e l'età dei vigneti. Per quanto riguarda l'età, in generale, si osserva un incremento lineare dell'incidenza della malattia con l'aumento dell'età media dei vigneti (fig. 2) mentre gli impianti giovani (età inferiore ai 10 anni) risultano ancora poco colpiti o per nulla colpiti.

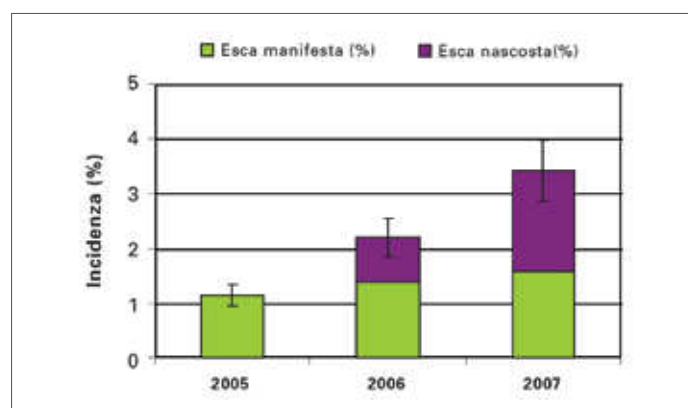
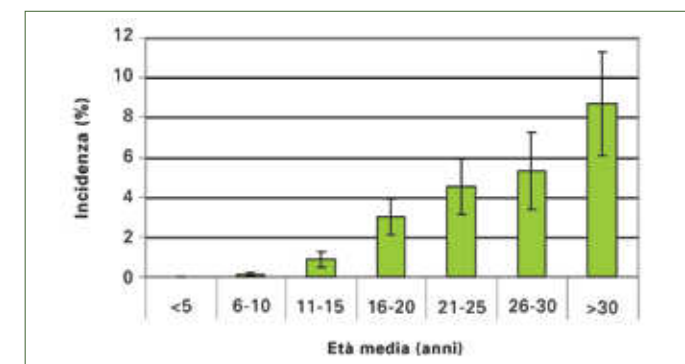


Fig. 1 - Incidenza media annuale (manifesta) e cumulata (somma dell'incidenza annuale con quella nascosta) nei tre anni di monitoraggio in provincia di Trento. Nel 2007 l'incidenza nascosta è risultata maggiore di quella manifesta, evidenziando l'elevata discontinuità nella manifestazione dei sintomi da un anno all'altro

\* Centro SafeCrop, IASMA email: ilaria.pertot@ismaa.it

Fig. 2 - Incidenza media cumulata (2007) in relazione alle diverse classi di età dei vigneti monitorati in Trentino; come si nota c'è un incremento lineare dell'incidenza della malattia con l'aumento dell'età media dei vigneti



Come rilevato in passato da osservazioni empiriche condotte nel territorio (Bottura e Aldrighetti, 2003), in Trentino alcune varietà possono essere considerate maggiormente sensibili rispetto ad altre: Cabernet Sauvignon e Marzemino per le varietà a bacca rossa, Nosiola, Traminer, Sauvignon blanc e Müller Thurgau per quelle a bacca bianca (tab. 1).

Osservando i valori riportati in tabella, si nota che in realtà non sempre le varietà più vecchie sono quelle più colpite, ne sono un esempio i vigneti coltivati a Teroldego dove, nonostante l'età elevata, non sono state rilevate piante sintomatiche all'infuori di una nell'annata 2006. Ciò fa presupporre che, se da un lato l'età dei vigneti può influenzare la presenza della malattia, è la varietà il fattore che maggiormente incide sulla sua manifestazione.

Tab. 1 - Incidenze annuali e cumulate (2007) in relazione alle diverse varietà monitorate in provincia di Trento al termine delle stagioni estive 2005, 2006 e 2007\*

Varietà	Incidenza (%)				Età media (anni)
	2005	2006	2007	Cumulata (2005-2007)	
Pinot Grigio	0,1	0,3	0,2	0,6	15
Traminer	2,3	2,0	3,8	6,6	17
Sauvignon Blanc	3,1	1,4	5,3	9,8	18
Cabernet Sauvignon	2,1	2,1	4,1	7,0	18
Pinot Nero	1,5	1,8	2,0	1,0*	19
Chardonnay	0,9	1,3	1,2	3,3	21
Merlot	0,8	0,9	0,8	1,8	21
Marzemino	1,8	2,1	1,7	4,9	21
Müller Thurgau	1,2	3,3	3,2	6,7	21
Lagrein	0,0	0,5	0,0	0,5	22
Nosiola	4,3	8,0	4,0	13,0	24
Teroldego	0,0	0,1	0,0	0,1	25
Schiava	0,8	0,8	0,8	2,2	28

\* L'incidenza cumulata nel 2007 su Pinot Nero è minore di quelle annuali a causa dell'estirpazione di un vigneto alla fine del 2006.

### III.11 Il mal dell'esca della vite in Umbria

G. Natalini, M. Quaglia\*

Rilevi eseguiti negli anni novanta dal Servizio Fitosanitario Regionale e dall'Università degli Studi di Perugia avevano già evidenziato la presenza del mal dell'esca in diversi vigneti Umbri. Più di recente (luglio 2007), allo scopo di avere una misura della situazione attuale, è stata valutata l'incidenza (numero di piante con sintomi di esca) e la gravità della malattia in 4 vigneti, 2 dei quali situati nella provincia di Perugia e 2 nella provincia di Terni. Le caratteristiche dei vigneti sono descritte in *tab. 1*.

Il rilievo della gravità della malattia è stato effettuato classificando le piante in tre categorie: piante con sintomi cronici (tigrature fogliari e/o punteggiature nere sugli acini); piante con sintomi acuti (disseccamenti dei tralci e/o dei grappoli), e piante con sintomi cronici e acuti.

I risultati delle osservazioni (*tab. 2*) hanno evidenziato un'incidenza variabile da un mi-

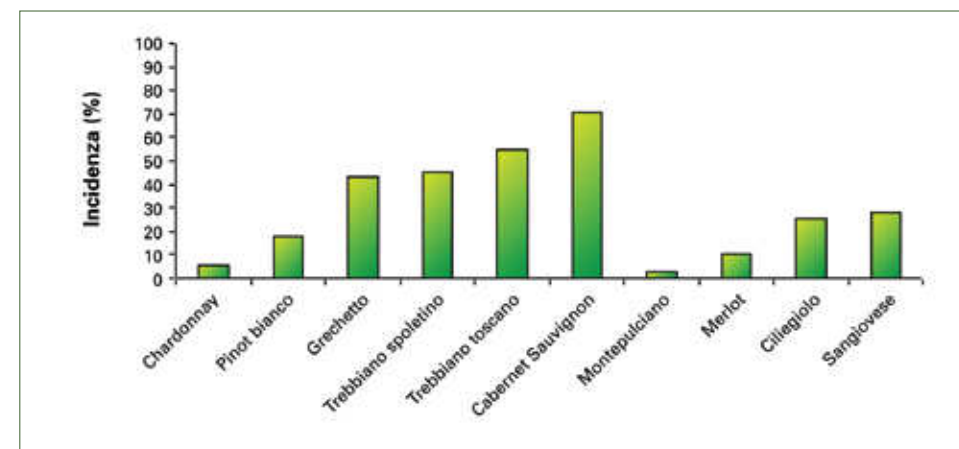


Fig. 1 - Incidenza del mal dell'esca rilevata nel luglio 2007 nelle 10 cultivar allevate nel vigneto sperimentale dell'Università degli Studi di Perugia, situato in località Sant'Apollinare (PG)

nimo del 16,2% (località Baschi) a un massimo del 30,8% (località Sant'Apollinare), in linea, sostanzialmente, con l'incidenza media nazionale, attestata intorno al 20% (Cesari *et al.*, 2008; Borgo *et al.*, 2008; Michelon *et al.*, 2008; Mugnai, 1999). I dati rilevati confermano anche la gravità del mal dell'esca nella Regione Umbria, gravità attestata anche dal fatto che nel legno del tronco di viti asintomatiche nel 2007, prelevate a caso e sezionate longitudinalmente, era ben evidente la presenza di striature brune, talora associate alla carie bianca. Ciò indica che l'incidenza della malattia è sicuramente superiore a quella risultata nei rilievi del 2007.

#### Confronto varietale

Allo scopo di valutare la suscettibilità di cultivar di vite nei confronti del mal dell'esca è stato monitorato un vigneto, situato in località Sant'Apollinare (PG), dove erano presenti 10 diversi vitigni (*tab. 1*). Fra tutti questi vitigni, il Cabernet Sauvignon è risultato il più suscettibile mentre Montepulciano e Merlot sono risultati i meno suscettibili. I dati relativi alle cultivar Cabernet Sauvignon e Montepulciano confermano quanto già osservato in altre località italiane (Borgo *et al.*, 2008).

**Tab. 1 - Descrizione dei vigneti oggetto delle indagini**

Località	Età (anni)	Superficie (ha)	Cultivar	Sistema di allevamento
Bettona (PG)	> 30	0,3	Sangiovese	Guyot
Sant'Apollinare (PG)	> 30	20	*	Cordone speronato
Orvieto (TR)	> 30	5,5	Trebbiano toscano	Guyot
Baschi (TR)	> 30	1	Trebbiano toscano	Cordone speronato

\* Nel vigneto di Sant'Apollinare sono presenti le cultivar Chardonnay, Pinot bianco, Grechetto, Trebbiano spoletino, Trebbiano toscano, Cabernet Sauvignon, Montepulciano, Merlot, Ciliegiole e Sangiovese.

**Tab. 2 - Incidenza e gravità del mal dell'esca nel 2007 in 4 vigneti umbri**

Località	Incidenza (%)	Piante con sintomi cronici (%)	Piante con sintomi acuti (%)	Piante con sintomi cronici e acuti (%)
Bettona (PG)	17,4	72,2	2,3	25,5
Sant'Apollinare (PG)	30,83	38,65	14,19	46,16
Orvieto (TR)	17,6	80,5	0,8	18,7
Baschi (TR)	16,2	67,4	1,2	31,4

\* Università di Perugia email: mara.quaglia@unipg.it

### III.12 Il mal dell'esca della vite in Veneto

Michele Borgo\*

Non è semplice poter definire con certezza come il mal dell'esca della vite possa essere una malattia di vecchia data per il Nord-Est dell'Italia. Sicuramente, anche per questi ambienti viticoli, le vicissitudini sulla presenza della mal dell'esca e sui danni causati dai deperimenti delle viti ammalate non si discostano da quanto avvenuto e osservato nel resto dell'Italia e nei Paesi d'Oltralpe con lunga tradizione viticola.

Senza voler risalire a dati molto remoti, Manzoni e Rui in una " rassegna dei principali casi fitopatologici osservati a Conegliano nel 1933" e riportata sulla *Rivista di Patologia Vegetale* del 1934, segnalano che "in questi ultimi anni furono constatati nella regione (Veneto) numerosi casi di mal dell'esca sulla vite, tanto su vecchie piante ancora franche di piede in cui la malattia si manifestava con tutti i sintomi della vera apoplezia, quanto su viti innestate, ancora giovani. Anche nelle giovani viti la malattia determina la morte più o meno improvvisa". La nota segue specificando che "la vera esca ... si forma di solito, nelle viti giovani, in quantità piccola attorno al midollo e in prossimità delle piaghe da cui si iniziò la infezione". La rassegna prosegue citando specifici casi di gravi danni registrati su "circa 600 viti selvatiche nel 1929 e innestate sul posto con Clinton [*vitigno Ibrido produttore diretto, ampiamente coltivato in quegli anni nel Veneto*] nel 1931, la malattia si sviluppò intensamente ancora nel 1932"; si legge poi che il vigneto venne subito spiantato. In aggiunta, gli Autori riferiscono che "a Breganze il mal dell'esca è frequente su viti franche molto vecchie e con ceppi aventi 20 centimetri e più di diametro"; proseguono poi affermando quanto segue: "crediamo anzi interessante citare il fatto che nella località era antica usanza fendere longitudinalmente i vecchi ceppi aventi il legno interno guasto, proprio come si praticava in Grecia e nell'Asia minore". A riprova della diffusione di questa antica pratica, in molte zone del Veneto centrale e occidentale il mal dell'esca della vite continua a essere ancora conosciuto come "mal dello spacco".

Gli Autori sopra citati fanno inoltre rilevare che "l'infezione nelle viti giovani parte dal punto di innesto o forse ancor più frequentemente dalle grosse ferite fatte per togliere i polloni o anche i grossi tralci sviluppati sotto l'innesto dal ceppo americano", ricordando comunque che si trattava di viti con innesti fatti a dimora. Gli stessi ritengono che "il propagarsi della malattia, anche su viti giovani, possa essere dovuto alla presenza, in vicinanza dei nuovi impianti, di vecchie viti e tutte ammalate, anche se ancora in produzione".

Quanto sopra descritto è meritevole di attenzione in quanto vengono evidenziati peculiari aspetti epidemiologici che, a distanza di molti decenni, vengono ora ripresi e riesamina-

ti. Viene fatto riferimento alla incidenza del mal dell'esca che può colpire viti vecchie e viti giovani, al ruolo esercitato dalle ferite, che si vengono a formare sul tronco con le comuni operazioni di innesto come pure da quelle provocate con i ricorrenti interventi colturali di potatura invernali e di spollonatura primaverile del tronco.

Anche nell'area viticola veneta e friulana il complesso del mal dell'esca per molti anni venne considerato come una comune avversità parassitaria della vite, da sopportare quasi con rassegnazione, tanto più che non erano disponibili mezzi diretti di difesa, al di fuori di qualche sperimentazione con l'uso di arsenito di sodio, già provato con risultati positivi fin dal 1932 da Manzoni e Rui, oppure di dinitro-ortocresolo (DNOC).

L'interesse per la malattia veniva riproposto allorché eventi climatici particolari si abbottavano in zona a vocazione viticola. Giusto a questo riguardo, memorabili furono i danni registrati su viti a seguito della forte e prolungata gelata che nel mese di gennaio del 1985 si abbatté in tutto il Nord-Est, interessando principalmente alcune aree viticole delle province di Padova, Vicenza e Verona. In conseguenza di questo eccezionale evento climatico, molte viti morirono e subirono gravi danni al tronco, comportando lo spianto di molti vigneti o arrecando irreparabili danni vascolari sulle piante rimaste.

In anni più recenti altre indagini e specifici studi micologici vennero condotti in alcuni ambienti viticoli del Veneto con le segnalazioni di mal dell'esca su vigneti vecchi ma anche su viti di soli 5-6 anni (Minervini e Bisiach, 1988); veniva anche messa in evidenza la contemporanea presenza di eutipiosi e di esca in vigneti monitorati nelle aree a DOC di Lugana e di Bianco di Custoza in provincia di Verona (Minervini e Bisiach, 1995).

#### *Incidenza del mal dell'esca*

Merita richiamare alcuni lavori condotti nel corso degli ultimi anni in provincia di Treviso presso il Centro di ricerca per la viticoltura di Conegliano. Per meglio comprendere quanto possa incidere direttamente e indirettamente la presenza della fitopatia dell'esca sulle viti adulte, si richiamano i risultati di una indagine condotta su alcuni vigneti di Merlot, innestati su Kober 5BB, allevati a sylvoz e con età di circa 20 anni, monitorati per sei anni consecutivi prima di essere spiantato e poi esaminato vite per vite (Serra *et al.*, 1998). L'incidenza cumulata di viti colpite da mal dell'esca è variata da un appezzamento all'altro, oscillando tra 35 e 60% delle piante esaminate, mentre le ispezioni al tronco, eseguite su tutte le piante al momento dell'espianto dei vigneti, hanno permesso di riscontrare alterazioni del legno sul 100% delle viti. Nelle sezioni trasversali effettuate alla base del ceppo e in vicinanza dell'inserzione delle branche, quasi tutte le viti mostravano necrosi brune mentre la carie del legno era presente su circa la metà di esse; tra queste ultime, il 52% non aveva mai manifestato sintomi della malattia nel corso dei sei anni di osservazioni in campo. È quindi possibile affermare che il mal dell'esca (qui nel senso, soprattutto, di carie del legno) è una fitopatia che il più delle volte rimane occulta per anni o che, addirittura, può anche non comparire mai.

Un ulteriore contributo sulla dinamica delle epidemie di mal dell'esca in territorio veneto riguarda gli studi condotti nell'ambito delle attività del progetto MESVIT per valutare la suscettibilità delle varietà e per monitorare l'evoluzione della malattia nel corso della vita del vigneto. La cv. Cabernet Sauvignon, rispetto a Merlot, ha dimostrato una maggiore suscettibilità a contrarre la malattia in tutti i vigneti monitorati (Borgo *et al.*, 2008). Da

\* CRA-Viticultura, Conegliano (TV) email: michele.borgo@entecra.it

uno studio effettuato su un vigneto plurivarietale, piantato alla fine degli anni ottanta in provincia di Verona, è stato possibile constatare una diversa incidenza dei sintomi della malattia in funzione dei vitigni (fig. 1): le varietà ad uva bianca Pinot bianco, Riesling italico, Verdicchio e Fiano sono apparse poco sensibili rispetto alle cv. Sauvignon bianco, Riesling renano e Manzoni bianco; invece, le varietà ad uva nera Teroldego, Malbech, Aglianico del Vulture hanno manifestato una scarsa incidenza di piante sintomatiche rispetto a Cabernet Sauvignon, Carmènere o, più ancora, a Primitivo e Dindarella. I vitigni ad uva bianca sono comunque risultati più colpiti rispetto a quelli a bacca nera in tutte le fasi dei rilievi (fig. 2).

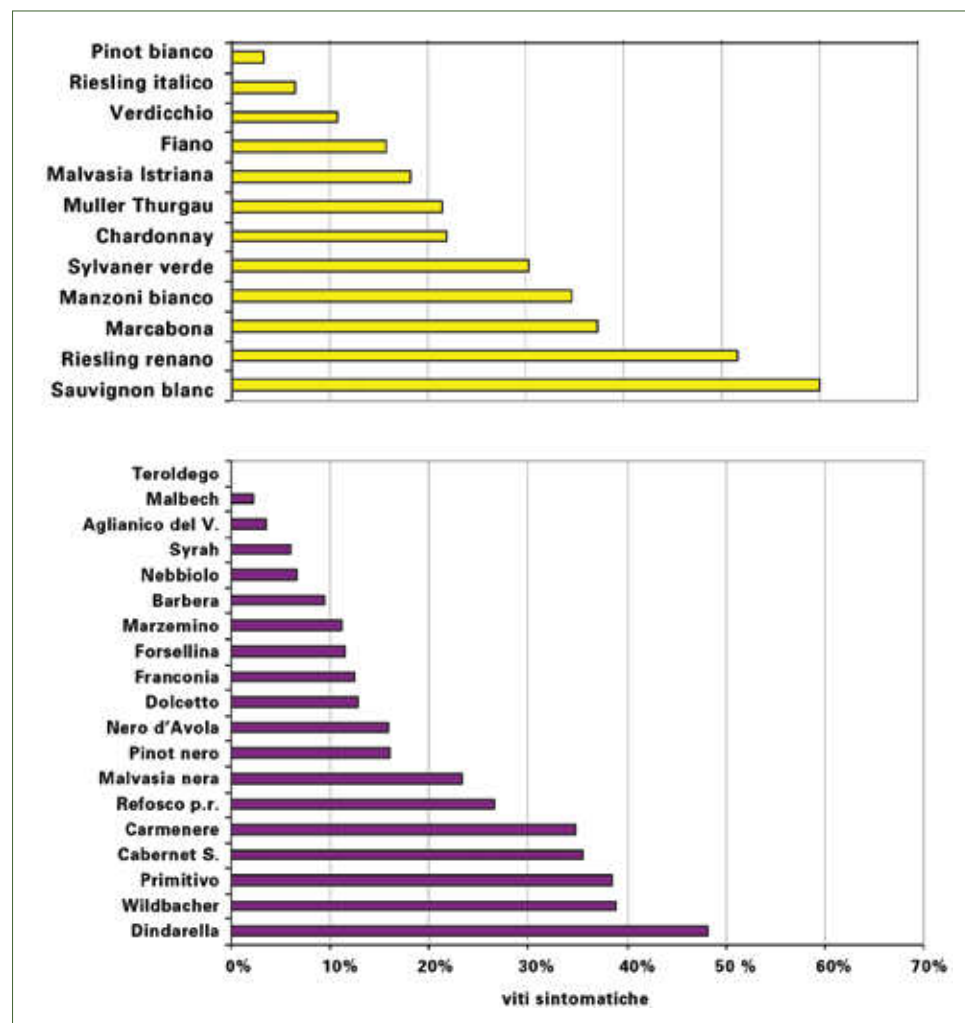


Fig. 1 - Suscettibilità al mal dell'esca dimostrata da vitigni ad uva bianca e nera in un vigneto sperimentale di confronto varietale di 18 anni (San Floriano - VR)

Fig. 2 - Viti sintomatiche per mal dell'esca in differenti momenti di rilievo e nel confronto tra gruppi di vitigni ad uva bianca rispetto a gruppi ad uva nera (San Floriano - VR, 2007)

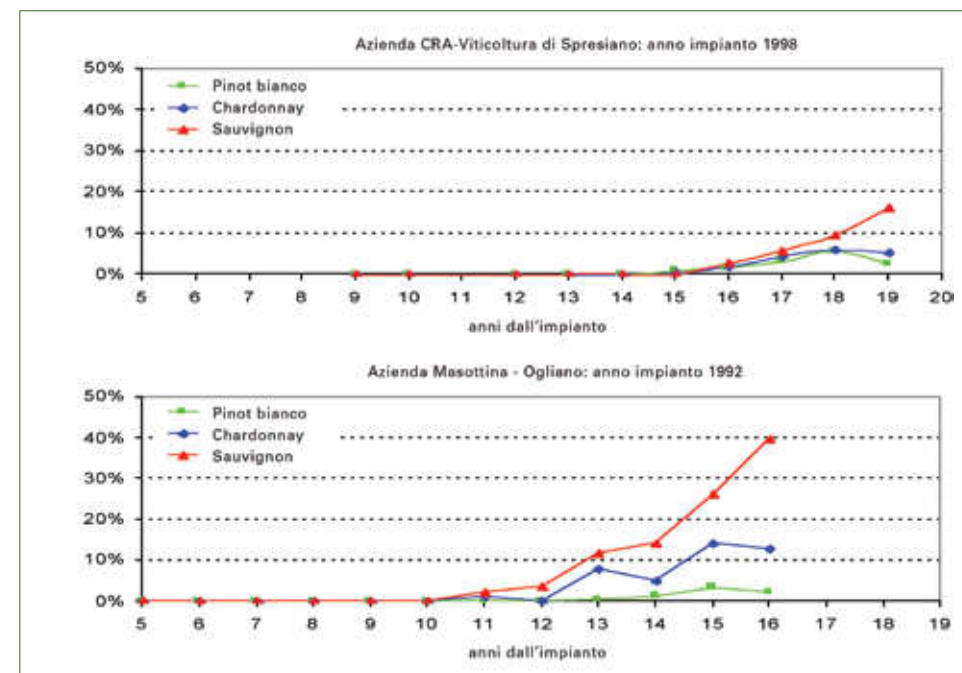
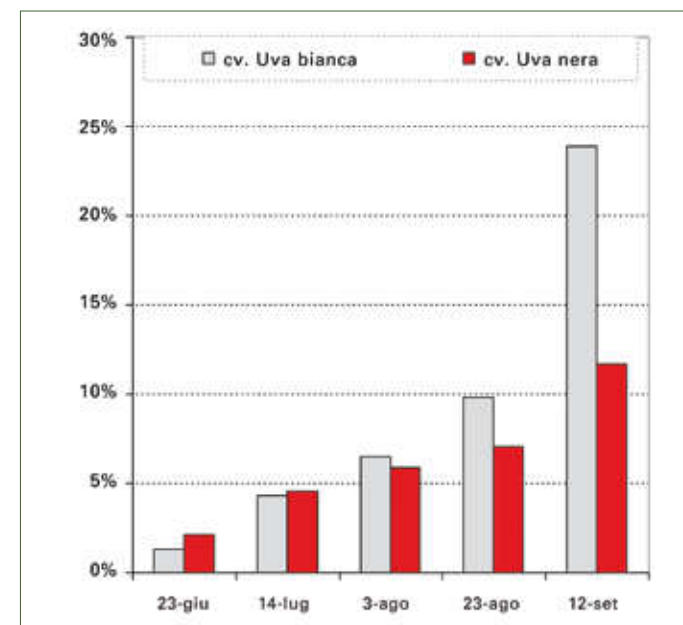


Fig. 3 - Evoluzione dell'incidenza di piante con sintomi di mal dell'esca su varietà diverse in funzione dell'età delle viti per un vigneto di pianura (Spresiano - TV) e per un vigneto di collina (Ogliono - TV)

Tra i vitigni più diffusi nell'area veronese del Valdadige e della Valpolicella, le cv. Corvina e Negrara trentina sono risultate più colpite da mal dell'esca rispetto a Molinara; è stata inoltre riscontrata una stretta relazione tra incidenza della malattia e diametro medio del tronco, dando quindi ragione a quanto già sottolineato da Manzoni e Rui nel 1934 e, in anni più recenti, da altri numerosi Autori (Borgo *et al.*, 2008).

Per quanto riguarda invece la dinamica di comparsa dei sintomi del mal dell'esca su vigneti monitorati vite per vite a partire dai primi anni d'impianto, è stato possibile rilevare che, nell'area di Conegliano, la malattia tendenzialmente inizia a manifestare i primi sintomi intorno al decimo anno dall'impianto (*fig. 3*), anche se il ruolo del vitigno e dell'ambiente costituiscono fattori di primaria importanza per favorire l'anticipo o il ritardo della comparsa dei sintomi, come pure sui livelli di incidenza della malattia (Borgo *et al.*, 2008).

### Conclusioni

Il mal dell'esca della vite rimane una avversità dannosa anche per la viticoltura del Nord-Est. I viticoltori conoscono bene i sintomi della malattia e, in qualche modo, sono preparati a fare fronte a una avversità associata, in genere, alla vecchiaia delle viti. Negli ultimi anni, anche in queste zone si sta diffondendo, ma senza alcun allarmismo, una maggiore attenzione per il mal dell'esca: la comparsa dei sintomi su alcune viti giovani, ora come una volta, aumenta ulteriormente le preoccupazioni dei viticoltori, i quali, per contenere l'incremento di piante che si potrebbero ammalare, sono alla ricerca di sistemi di prevenzione prima ancora che di cura e di lotta.

Per una buona profilassi contro il mal dell'esca, sicuramente deve essere data grande importanza alla filiera vivaistica ma anche al ruolo delle tecniche colturali in vigneto, a partire dai sistemi viticoli innovativi, che negli ultimi anni hanno favorito la diffusione di vitigni internazionali, la coltivazione della vite anche in aree viticole poco esplorate, nuove forme di allevamento e nuovi criteri di potatura, nonché il crescente ricorso dell'uso della meccanizzazione. Tante innovazioni sono state spesso accompagnate da molti altri fattori antropici, quali la scarsa professionalità in azienda, ai quali si possono aggiungere anche i mutamenti climatici di questi ultimi venti anni; tutto ciò può aver contribuito a incrementare le cause dell'insorgenza della malattia, la sua diffusione e la gravità delle epidemie.

## III.13 Analisi statistica della distribuzione spaziale del mal dell'esca della vite in alcuni vigneti italiani

G. Marchi\*, S. Burruano, S. Di Marco, F. Osti, I. Pertot, G. Surico

### III.13.1 Introduzione

In questi ultimi anni il mal dell'esca ha costituito una vera emergenza che ha stimolato l'avvio di numerose ricerche su questa malattia. I risultati finora ottenuti hanno, da un lato chiarito diversi aspetti legati all'eziologia, all'epidemiologia e alla fisiologia della malattia, dall'altro ne hanno evidenziato l'estrema complessità (Surico *et al.*, 2006). Tra gli aspetti che ancora attendono una più chiara dimostrazione vi sono, sia la prima introduzione della malattia in campo, sia la sua diffusione secondaria. Per quanto riguarda l'introduzione dell'inoculo primario, le conoscenze attuali sulla biologia e l'ecologia degli agenti causali ci consentono di formulare alcune ipotesi. La presenza di *Pch* e/o *Pal* all'interno dei tralci di piante madri e del materiale di propagazione da essi ottenuto (Surico *et al.*, 2006), nonché le numerose e accertate occasioni di infezione durante le operazioni di allestimento in vivaio delle barbatelle, sembrano ascrivere un ruolo importante alle barbatelle infette provenienti dai vivaai quale fonte d'inoculo primario. Inoltre, studi condotti in paesi diversi (Larignon e Dubos, 2000; Eskalen *et al.*, 2003) hanno accertato che i propaguli di *Pch* e di varie specie di *Phaeoacremonium* sono rinvenibili sulla superficie di tronchi e tralci, di acini di uva e perfino di vecchi viticci rimasti attaccati ai fili dell'impianto, e dunque non è possibile escludere a priori un ruolo, anche importante, giocato dall'inoculo aereo proveniente da vigneti vicini già attaccati. In quest'ultimo caso le prime infezioni prenderebbero avvio da ferite derivanti, soprattutto, da tagli di allevamento, di potatura invernale, da operazioni di spollonatura e potatura verde. Per quanto riguarda invece la diffusione secondaria della malattia è generalmente riportato nella letteratura fitopatologia più classica (Baldacci *et al.*, 1962; Contesini, 1991) che l'esca si propaga più facilmente lungo i filari con gli strumenti infetti di potatura, ma per quanto riportato in precedenza anche in questo caso non si può escludere l'importanza del ruolo giocato dall'inoculo rilasciato dalle superfici esterne delle viti infette. La comprensione di questi elementi, requisito fondamentale per comprendere l'epidemiologia di una malattia, nel caso dell'esca, è fortemente ostacolata da almeno tre fattori: *a*) attualmente non è possibile prevedere, se e quando una pianta si infetta; *b*) se e quando la pianta infetta comincerà effettivamente a manifestare i primi sintomi fogliari; *c*) le piante colpite dal mal dell'esca manifestano i sintomi fogliari con estrema irregolarità da un anno all'altro (Surico *et al.*, 2000a). Questo comportamento da parte delle piante malate, forse unico, almeno a tali livelli, nell'ambito della patologia vegetale, rende praticamente impossibile stimare correttamente l'incidenza negli impianti e complica enormemente lo studio dell'epidemiologia della malattia.

\* Università di Firenze email: guido.marchi@unifi.it



### III.13.2 Analisi della distribuzione spaziale di una malattia

La probabilità che ha il singolo suscetto (ospite vegetale) di contrarre una data malattia infettiva, dipende, in buona misura, dalla sua posizione nello spazio rispetto sia alle fonti di inoculo che agli altri individui suscettibili e dal fatto che sia o meno a dimora in microhabitat favorevoli per la malattia in questione (Real e McElhany, 1996). L'analisi della distribuzione nello spazio (spatial pattern) degli individui malati (o degli agenti causali della malattia) e delle sue variazioni temporali all'interno di una coltura, fornisce informazioni di tipo epidemiologico utili per capire, ad esempio, se l'infezione era già presente nel materiale di propagazione oppure se il patogeno proviene da fonti esterne all'impianto, se si diffonde o meno nello stesso impianto, quali sono i fattori che ne regolano la velocità di diffusione. Se poi le analisi sono estese su di un arco temporale sufficientemente lungo, possono fornire informazioni indispensabili per sviluppare modelli previsionali, programmi di campionamento e strategie di lotta (Campbell e Madden, 1990).

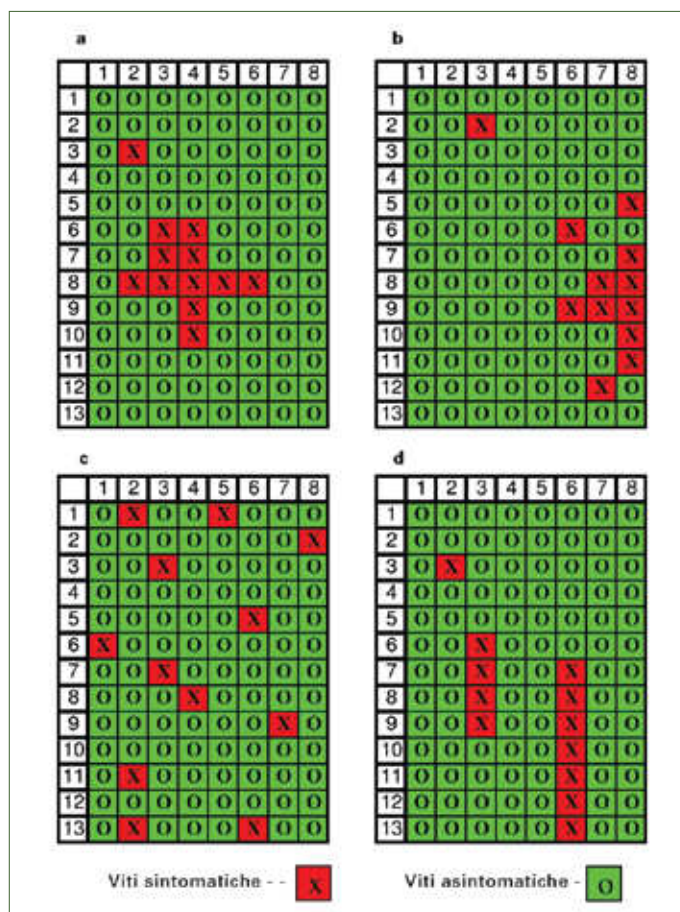


Fig. 1 - Ipotetiche distribuzioni dell'incidenza di una malattia in una parcella di 104 individui (8x13). Ogni maglia della griglia rappresenta una pianta la cui posizione è inequivocabilmente individuabile nello spazio bidimensionale (ad esempio, il primo individuo in alto a sinistra ha coordinate 1, 1 mentre l'ultimo in basso a destra ha coordinate 8, 13). Lo stato fitosanitario del singolo individuo, pianta sintomatica/asintomatica, è rappresentato da un colore, rosso/verde, e da una lettera, X/O, rispettivamente. Casi a) e b): distribuzione di tipo aggregata; c): distribuzione di tipo casuale; d): distribuzione aggregata e orientata lungo la fila

Le classificazioni adottate solitamente dai patologi vegetali per descrivere lo *spatial pattern* degli individui in una popolazione di patogeni o di piante malate sono tre: 1) regolare o uniforme; 2) casuale (random); 3) aggregato (*clustered*; Madden, 1989). L'attribuzione della distribuzione osservata a una o all'altra delle distribuzioni di riferimento consente di fare importanti inferenze inerenti l'epidemiologia della malattia. Ad esempio, la presenza di un *pattern* di tipo aggregato del tipo riportato in *fig. 1*, suggerisce l'esistenza di fonti di inoculo primario interne (*fig. 1a*) o così vicine (*fig. 1b*) all'impianto analizzato da aver generato un gradiente di diffusione della malattia. In entrambi i casi, infatti, partendo al limite da un unico focolaio, situato all'interno del vigneto (*fig. 1a*) o sul suo perimetro esterno (*fig. 1b*), la malattia si diffonde progressivamente dalla fonte di inoculo iniziale verso l'esterno (*fig. 1a*) o verso l'interno (*fig. 1b*). Viceversa, un *pattern* di tipo casuale (*fig. 1c*), è da ritenersi indicativo dell'esistenza di fonti d'inoculo esterne così distanti dall'impianto da non generare nessun tipo di gradiente. Nel caso della diffusione secondaria del mal dell'esca è stato spesso attribuito agli strumenti di potatura un importante ruolo come vettori d'inoculo (Baldacci *et al.*, 1962). Se ciò fosse vero si dovrebbe poter osservare nel tempo una tendenza da parte delle piante malate a distribuirsi lungo la direttrice dei filari nel vigneto, e cioè quella che segue l'operatore durante gli interventi di potatura (*fig. 1d*). In realtà le distribuzioni di riferimento sopra citate, sono solo tre tra quelle possibili in un *continuum* di *spatial pattern*, e quindi, in natura, l'identificazione della tipologia di *spatial pattern* osservato, sovente non è di così facile determinazione.

### III.13.3 Analisi statistica

Nella maggior parte dei casi è necessario ricorrere a un'analisi di tipo statistico per descrivere come è distribuita l'incidenza della malattia osservata, assimilandola, con un sufficiente margine di sicurezza, a un *pattern* di riferimento casuale, ad esempio, piuttosto che aggregato. A partire dagli anni ottanta, sono stati sviluppati numerosi strumenti statistici utili per quantificare e descrivere le relazioni spaziali tra piante malate in campo. Indicativamente i diversi tipi di analisi possono essere distinti in tre tipi di categorie generali a seconda del tipo di dato disponibile: 1) posizione relativa di piante sane e malate lungo i filari del campo agronomico; 2) il numero di piante sane e/o malate che ricadono nelle maglie di una griglia (per una coltura agraria in cui le piante sono messe a dimora secondo sestri ben precisi, il numero di postazioni che ricadono nella singola maglia costituiscono l'unità di campionamento) di dimensioni variabili sovrapposta alla mappa del campo agronomico; 3) misure della distanza tra singoli individui o tra unità di campionamento. Spesso, poi, è di aiuto esaminare i dati a livelli spaziali diversi ordinati gerarchicamente, ovvero, sempre relativamente per una coltura agraria: (A) tra piante immediatamente adiacenti sulla fila o tra le file; (B) tra gruppi (unità campionarie) di piante e (C) tra gruppi di piante che si trovano tra loro a distanze definibili (misurabili) nello spazio.

#### Ordinary runs

Una metodologia di analisi comunemente utilizzata per valutare il livello di aggregazione tra piante malate immediatamente adiacenti sul filare o tra i filari (primo livello gerarchico) è quella degli *ordinary runs* (Campbell e Madden, 1990). Per le sue caratteristiche intrin-

seche è ritenuta un'analisi molto utile per valutare la tendenza delle malattie a diffondersi unidirezionalmente, ad esempio lungo la direttrice dei filari. Un *run* è definito come una successione di uno o più simboli identici, seguita e preceduta da un simbolo diverso, in una sequenza ordinata di 2 tipi di simboli, ad esempio: sano e malato. La sequenza di piante malate (X) e sane (O) lungo la direttrice di un ipotetico filare X-X-X-O-O-X-O-O-X-X, contiene 5 *run*. Sia *m* il numero di piante malate su di un filare in cui sono a dimora *N* piante in totale e *U* il numero di *run* osservati, stante l'ipotesi nulla di una distribuzione casuale di piante malate lungo il filare e un'ipotesi alternativa di distribuzione aggregata, il valore atteso (*E*) di *U* sarà:  $E(U) = 1 + 2m(N-m)/N$ . La significatività dello scostamento tra osservato e atteso, ovvero l'esistenza di una distribuzione non casuale degli individui malati lungo il filare, viene valutata mediante un test di normalità (*Z*). Il filare di piante sarà contraddistinto da una sequenza non casuale di piante sintomatiche con una probabilità  $P > 95\%$ , se il valore standardizzato di *Z* è  $< -1,64$ .

**Distribuzione beta-binomiale**

Nel livello gerarchico successivo, l'eterogeneità spaziale dell'incidenza di una malattia in campo, può essere stimata valutando la bontà di adattamento (*fitting*) della distribuzione osservata delle frequenze delle piante malate (sintomatiche) per unità campionaria (o quadrato), alle distribuzioni di probabilità discrete e continue note come binomiale (BD) e beta-binomiale (BBD). La distribuzione binomiale è ritenuta la più appropriata per descrivere un *pattern* di distribuzione casuale (random) dell'incidenza della malattia, mentre un buon adattamento delle frequenze delle piante malate a quella beta-binomiale è ritenuto indicativo di un *pattern* di tipo aggregato (Hughes e Madden, 1993). In linea generale tanto maggiore è l'indice di dispersione ( $I_\beta$ ), misura della variabilità osservata nell'incidenza di malattia tra unità campionarie rispetto a quella teorica binomiale, tanto maggiore è la tendenza all'aggregazione delle piante malate. Valori di  $I_\beta$  maggiori, uguali o minori di 1 saranno indicativi di *pattern* tendenzialmente di tipo aggregato, casuale e uniforme, rispettivamente. La bontà dell'adattamento (*fig. 2*) dei dati a una o all'altra delle 2 distribuzioni di riferimento ( $H_0$ : distribuzione binomiale;  $H_1$ : distri-

buzione beta-binomiale) viene determinata mediante un test  $\chi^2$  (a due code) per l'omogeneità delle varianze o con il test a una coda  $C(\alpha)$  di Neyman (Madden e Hughes, 1994).

**Spatial Analysis by Distance Indices - SADIE**

Infine (terzo livello gerarchico dell'analisi) l'intensità e l'orientamento della tendenza all'aggregazione delle piante malate può essere valutato a livello dell'intera coltura utilizzando analisi come la SADIE (*Spatial Analysis by Distance Indices*; Perry, 1995 e 1998; Perry *et al.*, 1999), in grado di quantificare il *pattern* osservato della malattia utilizzando le coordinate delle unità campionarie e i conteggi del numero di individui malati che ricadono in ciascuna di esse. Il concetto alla base di questa analisi è la cosiddetta "distanza" per ottenere la massima uniformità (regolarità) possibile di distribuzione dell'incidenza (*distance to regularity*). Ad esempio, consideriamo otto unità campionarie regolarmente distanziate lungo la direttrice principale che possono al massimo contenere sei piante ciascuna (3 x 2) e sia nell'ordine, 5-5-2-1-1-2-0-0 il numero di piante malate osservate nelle unità campionarie. Obiettivo iniziale del SADIE, sarà quello di determinare il numero minimo di "spostamenti" degli individui malati così da ottenere la disposizione spaziale degli stessi il più regolare possibile, ovvero 2-2-2-2-2-2-2-2 (stesso numero di individui malati in tutte le unità campionarie o, più propriamente, varianza nell'eterogeneità dell'incidenza della malattia tra unità = 0). In questo esempio, la distanza per ottenere la regolarità ( $D_r$ ) sarà uguale a 30 (se ogni spostamento è considerato pari a un'unità di distanza). Per stabilire se il valore determinato di 30 è significativamente alto oppure no, il software di SADIE esegue un test di randomizzazione. I valori dell'incidenza osservata vengono casualmente assegnati (randomizzati) tra le otto unità campionarie disponibili (ad esempio, 1-5-2-0-5-2-0-1 e 5-5-2-2-1-1-0-0 sono i risultati di due delle possibili ri-distribuzioni) e la distanza per ottenere la regolarità calcolata per ogni combinazione (nell'esempio  $D_r = 12$  e  $D_r = 32$ , rispettivamente). La proporzione di randomizzazioni ( $P_a$ ) ottenute con una distanza per la regolarità uguale o maggiore a quella osservata, viene utilizzata in un test ad una coda per verificare l'attendibilità dell'ipotesi nulla ( $H_0$ ) di distribuzione delle piante ammalate di tipo casuale contro l'ipotesi alternativa ( $H_1$ ) di distribuzione aggregata. Viceversa se il valore  $D_r$  osservato è statisticamente sufficientemente piccolo allora l'ipotesi  $H_0$  verrà respinta in favore di un'ipotesi  $H_1$  di una distribuzione dell'incidenza di tipo uniforme. L'indice di aggregazione fondamentale del SADIE è  $I_a = D_r/E_a$  (nell'esempio  $I_a = 1,36$ ) dove  $E_a$  è la media aritmetica degli *n* valori di  $D_r$  ottenuti dalle *n* randomizzazioni eseguite (nell'esempio con 2 sole randomizzazioni,  $E_a = 22$ ). Valori di  $I_a$  maggiori, uguali o minori di 1 saranno indicativi di *pattern* tendenzialmente di tipo aggregato, casuale e uniforme. La proporzione ( $P_a$ ) delle *n* distribuzioni generate casualmente il cui  $D_r$  è superiore al valore osservato, può essere utilizzata in un test di aggregazione spaziale a una coda (livello di significatività del 5%). Il metodo SADIE, consente inoltre di quantificare il contributo relativo di ogni unità campionaria alla tipologia di *pattern* osservato, in termini di *patch* (raggruppamenti di unità campionarie spazialmente contigue con incidenza superiore alla media; nell'esempio superiori a 2) e di *gap* (raggruppamenti di unità campionarie spazialmente contigue con incidenza inferiore alla media), attraverso due indici standardizzati adimensionali:  $v_i$  (per convenzione assume valori positivi) e  $v_j$  (per convenzione assume valori negativi), rispettivamente. È inevitabile, infatti, che quando la distribuzione dell'incidenza non è casuale oppure uniforme, nella coltura oltre che a una o più

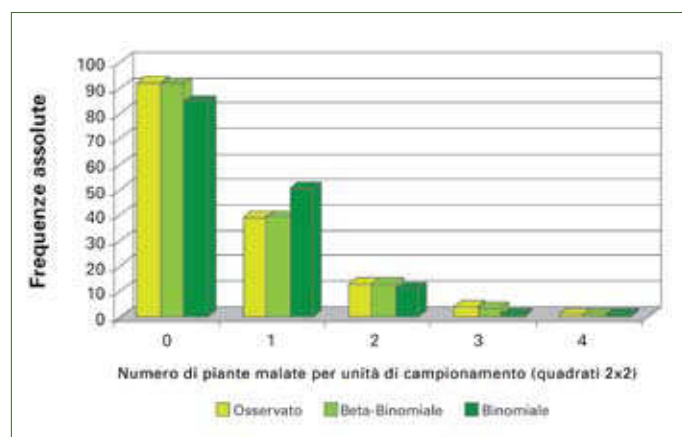


Fig. 2 - Adattamento delle distribuzioni binomiale e beta-binomiale ai dati dell'incidenza annuale di esca osservata in un vigneto di Cabernet Sauvignon nel settembre del 2000 in Toscana

“zone” ad alta incidenza di malattia (*patch*) ci devono essere anche una o più “zone” a bassa o nulla incidenza (*gap*). Il valore relativo di ogni singolo  $v_i$  o  $v_j$  (nell'esempio gli indici per le otto unità campionarie proprio perché poste spazialmente nell'ordine 5-5-2-1-1-2-0-0 sono: 1,925; 2,011; 0; -1,373; -1,513; 0; -2,150 e -2,508, rispettivamente) misura il grado con cui quella data unità campionaria contribuisce al raggruppamento generale come membro di un *patch* o di un *gap*, contributo che non dipende solo dal valore per se dell'incidenza dell'*iesima* unità campionaria, ma anche dal valore dell'incidenza delle unità campionarie spazialmente limitrofe. Immaginiamo che la distribuzione dell'incidenza osservate nelle unità campionarie spazialmente ordinate non sia 5-5-2-1-1-2-0-0, ma invece 5-2-5-1-1-2-0-0. Anche se l'incidenza di malattia continua a essere concentrata nelle prime unità campionarie orientate lungo un'ipotetica direttrice che va da sinistra verso destra, il fatto che le 2 unità con incidenza 5 siano ora separate da un'unità con incidenza 2 porta i relativi valori di  $v_i$  da 1,925 e 2,011 del primo arrangiamento spaziale a 1,861 e 1,650 nel secondo. Analogamente, il fatto che ora le ultime due unità campionarie che hanno un'incidenza osservata pari a 0, siano nel secondo arrangiamento spaziale più vicine a una unità ad alta incidenza, ne fa diminuire in valore assoluto i valori dei relativi indici  $v_j$  (da -2,150 e -2,508 del primo arrangiamento a -1,723 e -2,462, rispettivamente). In altre parole passando dal primo al secondo arrangiamento spaziale delle otto unità campionarie, l'eterogeneità della distribuzione della malattia nella coltura è di fatto diminuita. Entrambi gli indici dunque, consentendo di visualizzare le posizioni relative tra i diversi *gap* e i diversi *patch* e le loro variazioni temporali, sono ugualmente necessari per descrivere computamente le modalità di diffusione della malattia nello spazio e nel tempo.

### III.13.4 Distribuzione spaziale del mal dell'esca della vite in alcuni vigneti italiani

#### Materiali e metodi

La distribuzione in campo delle piante ammalate di esca è già stata studiata verso la fine degli anni novanta in quattro vigneti della Toscana (uno a Gambassi Terme e tre a Castelnuovo Berardenga). Nell'occasione sono stati utilizzati diversi strumenti statistici: indice di Lloyd, indice di Morisita, *variance-to-mean ratio*, *ordinary runs*, 2DCLASS e 2DCORR (Surico *et al.*, 2000b). I risultati ottenuti avevano portato a concludere che: 1) la diffusione della malattia dipende eminentemente dalla produzione di spore aeree provenienti da fonti sia interne che esterne al vigneto; 2) gli strumenti di potatura hanno solo un ruolo marginale come vettori d'inoculo; 3) la distribuzione delle piante sintomatiche è di tipo casuale quando l'incidenza è bassa e diviene, tendenzialmente, di tipo aggregato quando l'incidenza cresce (> 50%). Alle stesse conclusioni era giunto anche uno studio condotto in Spagna da Redondo e collaboratori (2001). Invece, Abbatecola e collaboratori (2000), in uno studio preliminare in Puglia, avevano rilevato una certa tendenza all'aggregazione, specialmente in vigneti giovani ( nel caso studiato, vigneto di sei anni, con una percentuale di piante infette del 5% nel 1997 e del 2% nel 1998). Nel corso del progetto interregionale si è ritornati a studiare la distribuzione spaziale delle viti infette prendendo in considerazione questa volta sei diversi vigneti (in Sicilia, Toscana, Emilia e Romagna e Trentino) (*tab. 1*), scelti come idealmente rappresentativi dell'eterogeneo panorama nazionale.

Tab. 1 - Principali caratteristiche dei 6 vigneti monitorati						
Caratteristiche del vigneto	Provincia					
	Agrigento	Trapani	Trapani	Siena	Ravenna	Trento
Anno di impianto	1992	1990	1990	1987	1991	1985
Cultivar	Italia	Insolia	Catarratto	C. Sauvignon	Albana	Chardonnay
Anno di inizio dei rilievi epidemiologici	2005	2005	2005	1995	1991	2005
Anni rilevati (n.)	3	3	3	12	17	3
Piante analizzate (n.)	972	968	979	581	1423	862

Con cadenza annuale durante la prima decade del mese di settembre, la diffusione della malattia è stata monitorata in una parcella di piante in ognuno dei vigneti monitorati. Durante ogni rilievo tutte le piante della parcella sono state esaminate per stabilire la presenza/ assenza di manifestazioni esterne di malattia senza distinguere tra sintomi di esca cronica e sintomi di esca acuta. Di ogni parcella sperimentale, e per ogni anno di indagine, è stata disegnata una mappa bi-dimensionale (*fig. 3*) in cui, relativamente alle manifestazioni di esca, è stato riportato lo stato di ogni pianta (incidenza annuale). Inoltre, data la forte discontinu-

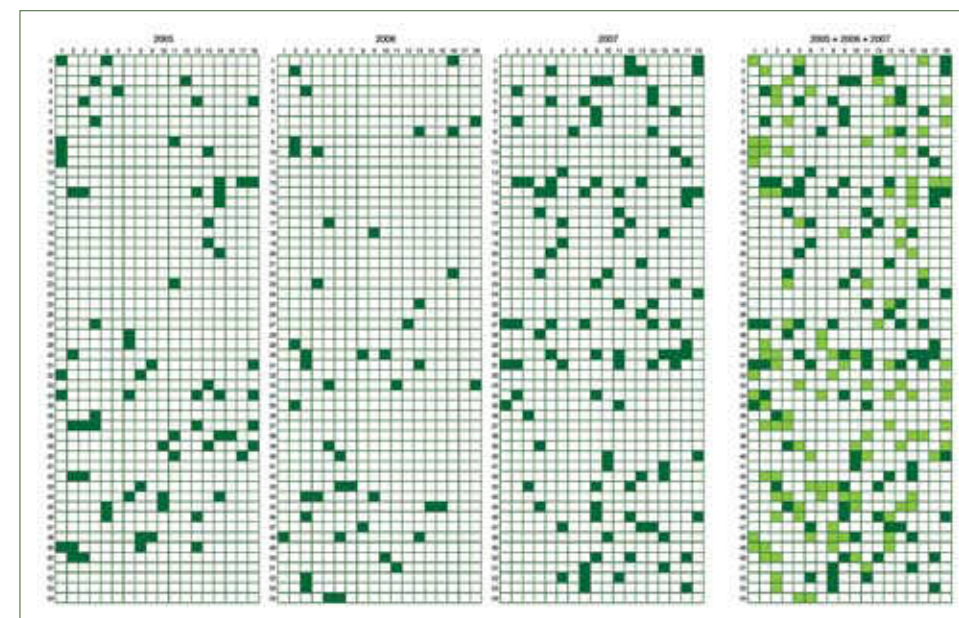


Fig. 3 - Mappa della distribuzione spaziale dell'incidenza annuale (stagioni vegetative 2005, 2006 e 2007) e di quella cumulata (triennio 2005-2006-2007) dell'esca in un vigneto di cv. Italia in provincia di Agrigento. Quadrati verde scuro, piante sintomatiche nell'anno; quadrati verde chiaro, piante sintomatiche nell'anno o in almeno uno degli anni precedenti; quadrati bianchi, piante asintomatiche

ità di espressione dei sintomi esterni in annate agrarie successive, registrata in tutti gli agroecosistemi analizzati, dopo il primo anno di rilievi e per ognuno degli anni successivi, sono state disegnate delle mappe in cui, oltre alle piante sintomatiche in un dato anno, venivano evidenziati quegli individui che, seppur asintomatici nell'anno, avevano però manifestato sintomi esterni di esca in almeno uno degli anni precedenti (incidenza cumulata). I rilievi sono stati condotti da un minimo di tre fino ad un massimo di 17 anni. Applicando i tre strumenti di analisi prima descritti (*Ordinary runs*, *Beta-Binomial Analysis*, SADIE), sia sui dati relativi all'incidenza annuale, sia su quelli relativi all'incidenza cumulata, è stata analizzata la tendenza delle piante ammalate ad aggregarsi: 1) unidirezionalmente lungo la direttrice dei filari (*ordinary runs*) e, 2) a livello di tutta la parcella monitorata senza una direzione preferenziale (*Beta-Binomial Analysis*). Eseguendo l'analisi SADIE infine è stata quantificata la tendenza all'aggregazione delle piante malate in zone (sottoaree) diverse di ogni vigneto.

**Risultati**

In tutti gli ambienti monitorati il fenomeno della fluttuazione dei sintomi ha portato inevitabilmente a delle consistenti variazioni dei valori dell'incidenza annuale da una stagione alla successiva, complicando considerevolmente l'analisi dei fattori coinvolti nella diffusione secondaria della malattia. Tuttavia, considerando tutti i dati raccolti relativi, sia alla distribuzione dell'incidenza annuale, sia di quella cumulata, il quadro relativo all'epidemiologia della malattia che ne emerge, appare abbastanza omogeneo nelle sei diverse realtà viticole considerate. Per quanto riguarda la tendenza all'aggregazione delle piante sintomatiche lungo la direttrice dei filari (aggregazione unidirezionale), in tutti i vigneti e in tutti gli anni di indagine è stata rilevata aggregazione significativa delle piante sintomatiche lungo la direttrice di alcuni dei filari analizzati. Tuttavia, nel complesso, la frazione di filari che manifesta il fenomeno è risultata variabile sia temporalmente che spazialmente e, generalmente, bassa (fig. 4). Estendendo l'analisi a considerare tutta la parcella monitorata (eterogeneità nella distribuzione dell'incidenza della malattia nelle unità campionarie) i risultati sono stati analoghi in quanto la proporzione di annate o di serie temporali cumulate, caratterizzate

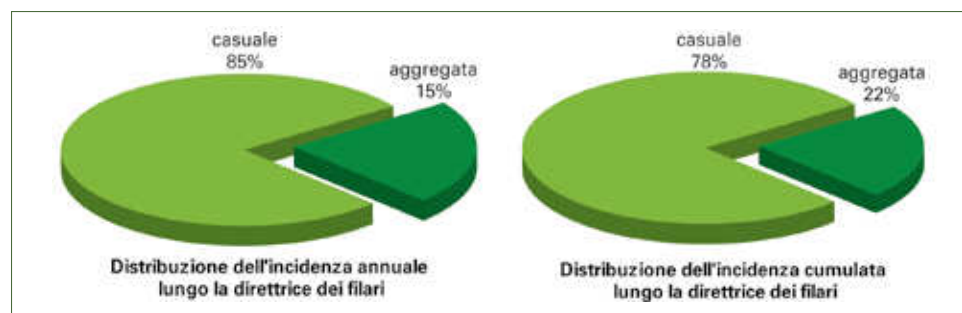


Fig. 4 - Valutazione della tendenza all'aggregazione dell'incidenza della malattia lungo la direttrice del filare mediante impiego dell'analisi degli ordinary runs. Considerando all'unisono il pattern presentato nei diversi anni di indagine da tutti i filari dei 6 vigneti monitorati, è stata calcolata la frequenza dei filari in cui la distribuzione dell'incidenza annuale e dell'incidenza cumulata delle piante sintomatiche è risultata aggregata o casuale

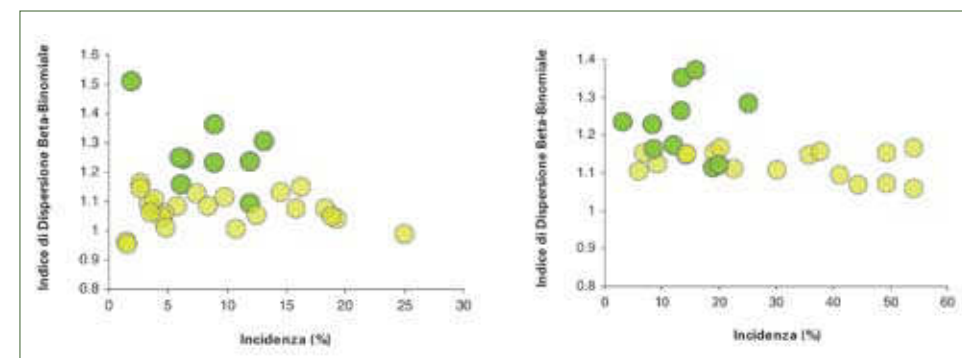


Fig. 5 - Relazione tra l'indice di dispersione beta-binomiale e l'incidenza, cumulata o annuale, dell'esca. I cerchi verde scuro e i cerchi verde chiaro rappresentano i valori dell'incidenza di malattia i cui pattern di distribuzione, in base ai risultati dell'analisi BBD (quadrati 2x2), possono definirsi come casuale o aggregato, rispettivamente

da una distribuzione dell'incidenza definibile statisticamente come di tipo aggregato, non ha superato il 40%. Inoltre, con l'eccezione del vigneto di cv. Insolia le relazioni tra entità dell'incidenza e tendenza all'aggregazione delle piante malate (fig. 5), rappresentata dal valore dell'indice  $I_{\beta}$ , appaiono irrilevanti ( $R^2 = 0,01$ ), anche quando si considera la distribuzione dell'incidenza cumulata ( $R^2 = 0,18$ ). Entrambi i livelli di analisi sembrano indicare, nel complesso, l'esistenza di stagioni vegetative in cui le piante che manifestano i sintomi di esca sono tendenzialmente vicine le une alle altre (distribuzione dell'incidenza di tipo aggregato) e annate in cui le piante sintomatiche appaiono, statisticamente, distribuite in maniera casuale. Queste osservazioni sono supportate dai risultati dell'analisi SADIE condotta nei sei vigneti oggetto di indagine e possono essere esemplificate dai risultati dall'analisi della distribuzione dell'incidenza della malattia all'interno della parcella di Chardonnay monitorata in Trentino nel triennio 2005-2007 (fig. 6). In questo vigneto l'incidenza annuale di malattia è stata del 5,81% nel 2005, è scesa a 3,94% nel 2006 ed è risalita al 4,74% nel 2007. I valori dell'incidenza cumulata sono passati dal 9,28% del biennio 2005-2006 al 13,34% del triennio 2005-2007. Considerando i valori dell' $I_a$  calcolati dal SADIE sui dati relativi all'incidenza cumulata, la distribuzione dell'esca risulta casuale ( $I_a = 1,384$ ,  $P_a = 0,128$ ) per il biennio 2005-2006 e aggregata per i dati relativi al triennio 2005-2007 ( $I_a = 2,025$ ,  $P_a = 0,014$ ). Sulla base di queste indicazioni, si potrebbe concludere che, similmente a quanto avviene di sovente per le malattie delle colture arboree di tipo *soil-borne* (Navas-Cortés *et al.*, 2008) o anche di origine virale (Dallot *et al.*, 2003), lo stato sanitario del singolo individuo influenza quello degli individui spazialmente vicini e che esiste una certa relazione positiva, seppur di modesta entità, visto che non risulta evidente con valori dell'incidenza di circa il 10%, tra tendenza all'aggregazione e incidenza della malattia.

L'analisi della distribuzione annuale però suggerisce che le cose non stanno esattamente così: sebbene i valori dell' $I_a$  calcolati dal SADIE, per il 2005 ( $I_a = 0,995$ ,  $P_a = 0,403$ ) e il 2006 ( $I_a = 0,968$ ,  $P_a = 0,428$ ) indichino chiaramente una distribuzione di tipo casuale, nel 2007 la distribuzione della malattia è da considerarsi di tipo aggregato ( $I_a = 2,558$ ,  $P_a = 0,001$ ). L'analisi del numero di *patch* e *gap cluster*, della loro dimensione e della loro posizione relativa all'interno

della parcella, indica che la distribuzione dell'incidenza è stata molto simile nel 2005 e nel 2006 (fig. 6). Infatti, in entrambe le stagioni vegetative la tendenza all'aggregazione delle piante sintomatiche e asintomatiche in *patch* e *gap* è stata relativamente modesta (i valori medi di  $v_i$  sono stati pari a 1,038 e 1,150 nel 2005 e nel 2006, rispettivamente, mentre quelli di  $v_j$  sono stati pari a -0,989 e -0,931 nel 2005 e nel 2006, rispettivamente) tanto che sull' 81,5% (2005) e sull' 83,2 % (2006) della superficie della parcella monitorata la distribuzione della malattia risultava di tipo casuale. Viceversa, nel 2007, il 44,8% della parcella poteva essere statisticamente rappresentato sotto forma di *gap clusters*, un *gap* principale esteso sul 33% della superficie e cinque secondari ben separati dal primo, il 12% sotto forma di *patch clusters* e solo sul 43,2% della superficie la malattia appariva distribuita in maniera casuale. In pratica, visto il significato epidemiologico dei *gap clusters* e il fenomeno della fluttuazione dei sintomi caratterizzante il mal dell'esca, è come se in quasi il 45% della parcella non si fossero realizzate le condizioni necessarie per l'espressione dei sintomi fogliari da parte degli individui malati.

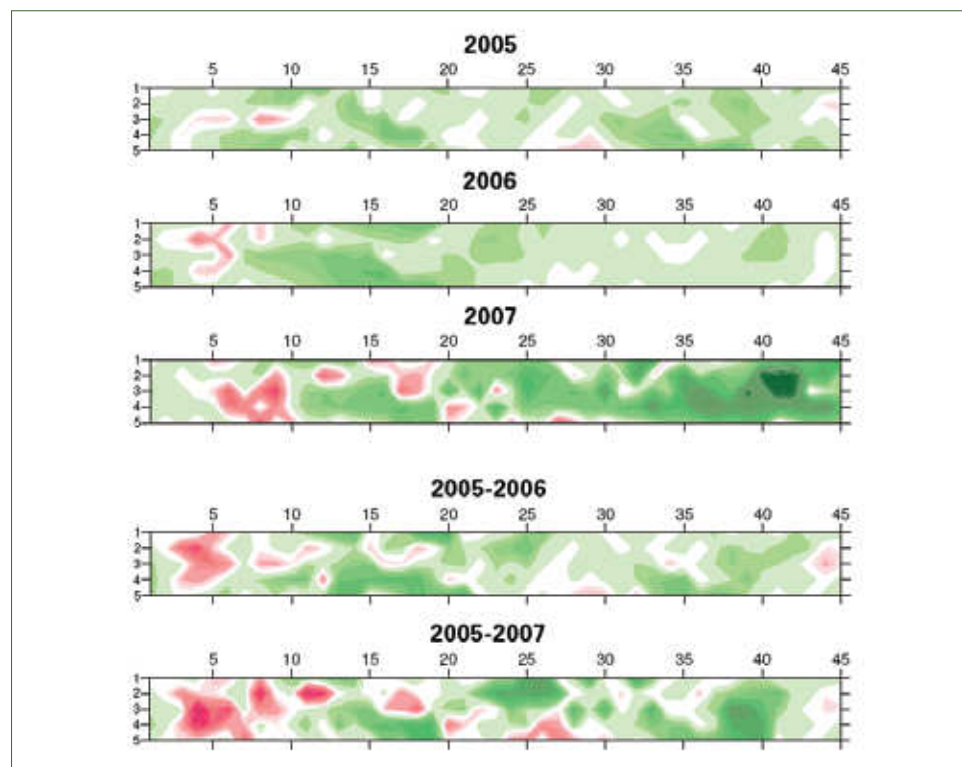


Fig. 6 - Mappa degli indici di raggruppamento ( $v_i$  e  $v_j$ ) ottenuta analizzando la distribuzione dell'incidenza annuale e cumulata dell'esca in un vigneto di Chardonnay in Trentino con il software SADIE = Spatial Analysis by Distance Indices). Gli assi indicano le unità distanza in termini di quadrati di piante 2 x 2, con l'asse maggiore orientato lungo la direttrice del filare. In ogni mappa è rappresentato il numero di patch (rosso) e il numero di gap (verde), la loro localizzazione nello spazio e le loro dimensioni. L'intensità delle 2 colorazioni è proporzionale al valore assoluto di  $v_i$  e  $v_j$ , rispettivamente

### III.13.5 Conclusioni

I risultati ottenuti dalle analisi qui descritte confermano i precedenti (Surico *et al.*, 2000b) e arricchiscono le nostre conoscenze epidemiologiche di due nuovi aspetti: 1) la distribuzione della malattia può essere di tipo aggregato (almeno in certe annate agrarie) anche con valori dell'incidenza annuale relativamente bassi (1,9-2,5%); 2) ogni anno nei vigneti si individuano "zone" a maggiore e "zone" a minore (o nulla) tendenza all'espressione dei sintomi, la cui localizzazione nello spazio però non è legata in maniera specifica a nessuna porzione del vigneto (localizzazione fluttuante). Il fenomeno non è di facile interpretazione, ma non sembrerebbe essere legato a fattori peculiari di un sito specifico del vigneto (esempio: variazioni delle caratteristiche chimico-fisiche del terreno passando da una zona all'altra della parcella). In questo caso infatti l'andamento dell'incidenza seppur variabile nello spazio all'interno della parcella, dovrebbe essere tendenzialmente costante nel tempo nelle sotto aree della stessa. Più verosimilmente il fenomeno evidenziato dal SADIE appare essere il risultato di fattori che agiscono in maniera più generale su tutta la popolazione di piante e la cui intensità varia da un'annata all'altra. Studi condotti in patosistemi diversi (Surico *et al.*, 2000a; Redondo *et al.*, 2001; Gubler *et al.*, 2004; Marchi *et al.*, 2006), hanno evidenziato che sul fenomeno della fluttuazione dei sintomi nel tempo da parte delle piante affette dal mal dell'esca, e quindi sull'andamento dell'incidenza annuale della malattia, un ruolo significativo può essere svolto dalla quantità di pioggia caduta in determinati momenti della stagione vegetativa. Se e come la pioggia e gli altri parametri climatici siano coinvolti nelle fluttuazioni di tipologia dello spatial pattern osservabili da una stagione alla successiva, costituisce al momento oggetto di indagini, ma appare evidente ormai che i sintomi esterni di questa malattia, difficilmente riproducibili artificialmente, siano il risultato di una complessa interazione in cui sono imprescindibilmente coinvolti oltre a fattori biotici anche fattori abiotici.

Riguardo, poi, alle indicazioni che si possono trarre da uno studio del tipo qui descritto e riassunte nell'introduzione si ribadisce che nel caso dell'esca la sorgente iniziale dell'inoculo può essere rappresentata o da barbatelle infette e/o da spore aeree provenienti dall'esterno. In effetti, le prime piante ammalate sono distribuite nella quasi generalità dei casi osservati, da noi o da altri, in maniera randomizzata e ciò è compatibile con l'ipotesi delle barbatelle infette e/o delle spore aeree provenienti dall'esterno. D'altro canto, se si parte dal presupposto che barbatelle colonizzate da *Phaeo-omycelium chlamydospora*, specie di *Phaeo-omycelium* (più frequentemente *P. aleophilum*) e, in qualche raro caso anche da *Fomitiporia mediterranea*, possano dare origine in campo a piante che manifesteranno poi, inizialmente con un'incidenza molto bassa, i sintomi fogliari dell'esca non possiamo non avere che una distribuzione di tipo casuale (è lo stesso caso di una malattia che ha origine da seme infetto). Poiché però si è dimostrato (questo lavoro e i rilievi di Abbatecola e collaboratori) che anche con valori relativamente bassi si può avere aggregazione di piante sintomatiche ciò evidentemente dipende, piuttosto o oltre che da una diffusione della malattia da pianta a pianta per autoinfezione, dalla manifestazione stessa della malattia (che sappiamo essere fluttuante) che risponde a fattori non ancora del tutto noti. Supponiamo, che la parcella disegnata in figura 7 sia stata realizzata con 14 barbatelle infette su 36 messe a dimora (incidenza totale = 38%) distribuite casualmente nella parcella. Nel caso di una malattia "normale" tutte le

piante infette mostrerebbero nello stesso anno, per esempio nella stagione vegetativa successiva (anno 1) a quella di impianto (anno 0), i sintomi dell'affezione. Avremmo così, sia visivamente che statisticamente, una distribuzione del tutto uniforme ( $I_{\beta} = 0,818$ ;  $P = 0,586$ ). Invece, allo stato delle attuali conoscenze le piante infette manifesteranno i sintomi in maniera variabile, in dipendenza di fattori stagionali (pioggia e temperatura dell'aria) e, probabilmente, anche di fattori dipendenti dall'interazione fra pianta e patogeni. Immaginando che le condizioni favorevoli all'espressione dei sintomi si realizzino solo in alcuni punti della parcella esaminata, si verificheranno così situazioni del tipo descritto nelle mappe disegnate in *fig. 7* (casi *1a-1i*).

Ipotizzando, del tutto arbitrariamente, che le condizioni necessarie per l'espressione dei sintomi si realizzino su circa il 20% della superficie vitata (due unità di campionamento su nove rilevate) e in punti diversi della parcella da una stagione alla successiva, l'incidenza

osservata fluttua da un minimo del 2,7% (*1i*) a un massimo di 13,8% (*1e*). In virtù del fenomeno, la distribuzione dell'incidenza di malattia può variare da casuale (esempio: *1i*;  $I_{\beta} = 1,028$ ;  $P = 0,411$ ) ad aggregata (esempio: *1e*;  $I_{\beta} = 2,670$ ;  $P = 0,006$ ).

Casi di distribuzione dell'incidenza di tipo aggregato, come quelli rappresentati, evidentemente, non sono la segnalazione di alcuna diffusione della malattia da pianta a pianta ma solo della predisposizione della pianta a manifestare, in un dato momento, i sintomi fogliari. Nel caso in cui le barbatelle fossero sane e la malattia fosse iniziata da inoculo esterno al vigneto la situazione non cambierebbe. Si potrebbero infettare già nel corso del primo anno dell'impianto ugualmente 14 piante su 36, ma negli anni successivi solo una frazione delle 14 piante mostrerà sintomi fogliari. Diversamente dalla situazione precedente, potremmo solo ipotizzare una più lenta manifestazione della malattia a causa del presunto lungo periodo di incubazione della malattia. Purtroppo, ad oggi, non siamo ancora in grado di prevedere quando una pianta proveniente da una barbatella infetta potrà mostrare i sintomi fogliari dell'esca (questo fatto tende a far sottovalutare il rischio delle infezioni in vivaio) e non possiamo neanche prevedere come si distribuiranno nel vigneto, in un dato anno, le piante sintomatiche. Possiamo solo affermare, basandoci su altri studi, che nel caso di un'annata piovosa l'incidenza della malattia sarà più alta che in un'annata più asciutta perché più piante ammalate tenderanno a mostrare i sintomi sulle foglie.

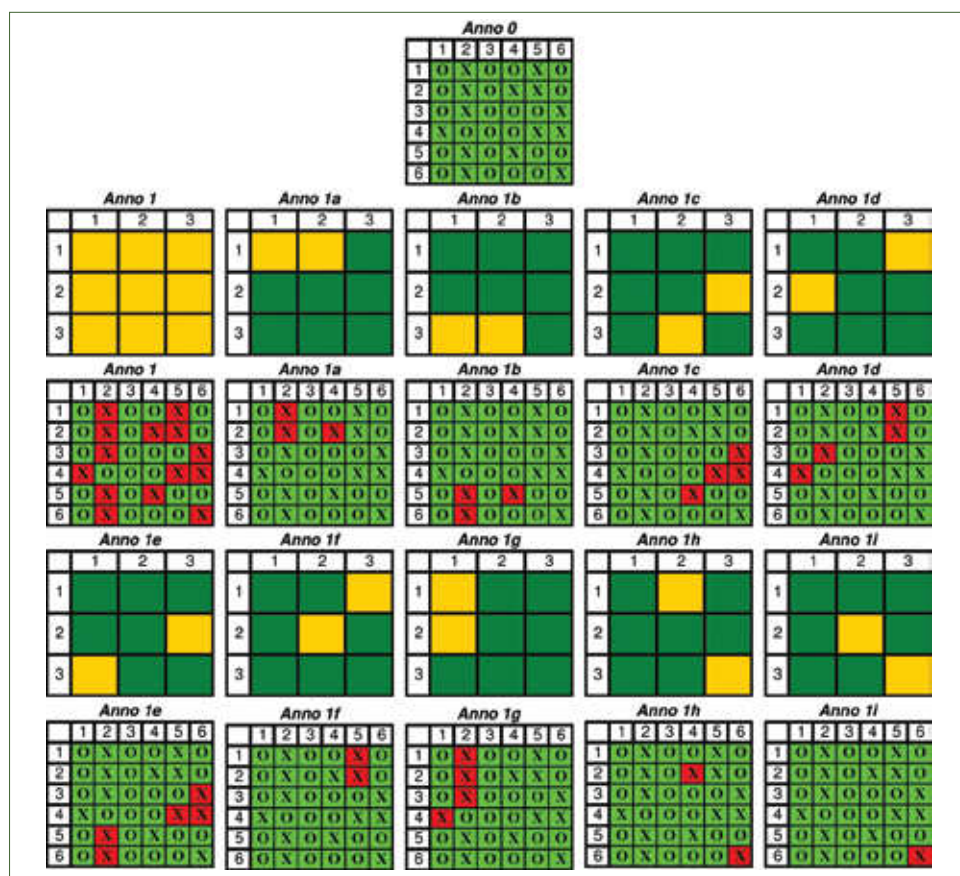


Fig. 7 - Variazioni nel valore assoluto e nella distribuzione spaziale dell'incidenza osservata della malattia in relazione al realizzarsi (giallo) o meno (verde scuro) delle condizioni favorevoli all'espressione dei sintomi esterni di esca da parte degli individui malati (X = pianta malata; O = pianta sana)

## **IV. Interazione pianta-patogeni-ambiente**



## IV.1 Fattori di virulenza dei funghi dell'esca. Enzimi esocellulari e crescita dei funghi dell'esca in presenza di fenoli

G. Marchi\*, L. Mugnai, G. Surico

### IV.1.1 Introduzione

In generale e semplificando, si può affermare che un patogeno, una volta superate le barriere difensive dell'ospite, attive e passive, tenta innanzitutto di colonizzare la pianta ospite per trovarvi ricovero e ricavarne nutrimento. Nella fase di colonizzazione, che può durare anche anni (ad esempio, in una pianta arborea), il microrganismo rilascia nell'ambiente in cui si trova (i tessuti della pianta) i prodotti del suo metabolismo secondario. Quando fra questi prodotti si trovano fitotossine, e/o fitormoni e/o enzimi pectinolitici (e normalmente è così nel caso di un microrganismo fitopatogeno) la pianta ne soffre e subisce un danno. Per questo motivo, quando si studia un qualsivoglia patogeno una delle prime verifiche che si usa effettuare per comprendere il meccanismo di formazione dei sintomi che quel patogeno è in grado di causare è quella relativa all'accertamento della capacità di produrre *in vitro* (e poi in pianta), una o più delle sostanze (fattori di virulenza) prima elencate. Naturalmente la ricerca è orientata dal tipo di sintomo che è manifestato dalla pianta: fitoormoni nel caso di alterazioni della crescita; fitotossine, legate a fenomeni di avvizzimento, clorosi, necrosi, ecc.; enzimi pectinolitici per i marciumi molli ma anche, indirettamente, per la progressione nell'ospite. In assenza di uno o l'altro di questi fattori si passa ad altre analisi.

Anche nel caso dell'esca sono state svolte indagini rivolte alla individuazione dei fattori di virulenza posseduti dai funghi che sono stati associati alla malattia: *Fomitiporia mediterranea* (Fmed), *Phaeoacremonium aleophilum* (Pal) e *Phaeoconiella chlamydospora* (Pcb). In questi studi, un modello di riferimento è stato quello della malattia di Pierce, una malattia della vite per alcuni aspetti simile all'esca sebbene causata non da funghi, ma da un batterio: *Xylella fastidiosa*.

Nelle piante già infette da *X. fastidiosa* il risveglio vegetativo è ritardato di 1-2 settimane; i tralci sono di scarso vigore; gli internodi raccorciati; si hanno emissioni di succhioni dal portinnesto. Sulle foglie i sintomi compaiono verso la metà di luglio: macchie clorotiche che si allargano con il tempo e disseccano. Verso i margini fogliari compaiono aree di secco, talvolta circondate da aloni clorotici (fig. 1). Questi sintomi somigliano a quelli dell'esca per come cominciano, per come si evolvono e, in qualche caso, anche per come si distribuiscono sulla pagina fogliare. Inoltre, nella malattia di Pierce così come nell'esca, i grappoli avvizziscono rimanendo attaccati ai tralci. Verso la fine dell'estate si può vedere: 1. il distacco della

\* Università di Firenze email: guido.marchi@unifi.it





Fig. 1 - Sintomi fogliari della malattia di Pierce, causata da *Xylella fastidiosa*

lamina fogliare (il picciolo resta sulla pianta, ma continua a disseccare; nell'esca, invece, cade anche il picciolo fogliare); 2. il disseccamento progressivo dei tralci a partire dall'apice; 3. la formazione di isole verdi sui tralci già lignificati.

Le piante muoiono dopo 1-4/5 anni dall'infezione. Nel legno, diversamente dall'esca, non compaiono sintomi particolari.

*Xylella fastidiosa* colonizza i vasi xilematici della pianta ospite ed è trasmesso da insetti con apparato boccale pungente/succhiante.

Il meccanismo di formazione dei sintomi fogliari della malattia di Pierce non è stato ancora completamente chiarito. Le ipotesi formulate al riguardo possono così essere riassunte: ostruzione dei vasi da parte delle masse batteriche che hanno invaso lo xilema (Hopkins, 1981; Tyson *et al.*, 1985); fitotossine prodotte dal batterio, mai, tuttavia, individuate (Lee *et al.*, 1982; Goodwin *et al.*, 1988); gomme e tille prodotte dalla pianta in risposta all'infezione con conseguente ridotto trasporto di acqua e nutrienti (Esau, 1948; Mollenhauer e Hopkins, 1976; Fry e Milholland, 1990); morte cellulare programmata (Gilchrist in Stevenson *et al.*, 2004); oppure una combinazione di due o più di questi fattori. Più recentemente la comparsa dei sintomi è stata associata all'accumulo di batteri e gomme nelle foglie e rispettivi piccioli (Stevenson *et al.*, 2004).

Nelle incertezze sollevate da una o l'altra di queste ipotesi ci sono alcuni fenomeni fisiologici e biochimici che sono stati accertati nelle piante affette dalla malattia di Pierce: ridotta traspirazione e fotosintesi, elevata concentrazione nelle foglie di acido abscissico, fruttosio, glucosio, Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>, bassa concentrazione di K<sup>+</sup>. Inoltre, modificazioni fisiologiche riconducibili ad anticipata senescenza delle foglie: clorosi, elevati livelli di prolina e di acido abscissico, aumentata resistenza stomatica.

Più recentemente è stata anche studiata la risposta fotosintetica di piante di arancio all'infezione di *X. fastidiosa*. I risultati ottenuti hanno messo in evidenza: bassa conducibilità stomatica; alterazioni biochimiche dell'apparato fotosintetico; aumento dei siti di accumulo degli elettroni (attività ribulosio bifosfato carbossilasi/ossigenasi - Rubisco).

Nel caso dell'esca, il tipo di sintomo sulle foglie, che non vengono invase da *Pcb*, *Pal* o *Fmed*, suggerisce innanzitutto il possibile coinvolgimento di fitotossine. Non si esclude poi che possano

essere coinvolti anche fenomeni di stress idrico dovuti all'occlusione di un numero significativo di vasi xilematici, non ancora compromessi dalla carie, per l'accumulo in essi di masse microbiche e/o per la produzione da parte della pianta di tille e gomme. Il fatto poi che, spesso, i primi sintomi a comparire sulle foglie siano rappresentati da fenomeni clorotici suggerisce un'alterazione dell'apparato fotosintetico e, quindi, del metabolismo dei carboidrati.

Allo scopo di verificare queste ipotesi sono state svolte varie indagini (*riferite in questo capitolo e successivi*), anche nell'ambito del progetto interregionale, alcune delle quali hanno avuto anche lo scopo di studiare la diversa capacità dei funghi dell'esca di invadere i tessuti legnosi della vite, in concomitanza o in successione fra di loro, e di produrvi sintomi attraverso la produzione di fitotossine. Queste indagini hanno riguardato, fra l'altro: la produzione di enzimi esocellulari degradativi e ossidativi; la produzione di enzimi pectinolitici e di fitotossine; la misura della concentrazione nelle foglie di zuccheri, amminoacidi e acido abscissico; la perossidazione dei lipidi di parete; la perdita di elettroliti da parte di tessuti di vite; la misura degli scambi gassosi in piante ammalate.

#### IV.1.2 Produzione di enzimi esocellulari

Ottantanove isolati fungini ottenuti dal legno alterato di piante di vite colpite dall'esca, inclusi *F. mediterranea*, *P. chlamydospora* e *P. aleophilum* (i primi due ancora noti, al tempo delle prove con i nomi, rispettivamente, di *Phellinus igniarius* e *Phaeoacremonium chlamydosporum*), sono stati esaminati per la produzione di enzimi esocellulari coinvolti nella degradazione del legno o nella trasformazione di sostanze fenoliche. Nelle prove sono stati utilizzati diversi substrati (Mugnai *et al.*, 1995; 1997).

Buona parte degli isolati saggiati ha mostrato di produrre beta-glucosidasi (ca. il 50% degli isolati) ed endo-glucanasi (ca. il 95% degli isolati), due enzimi coinvolti nella degradazione della cellulosa (*tab. 1*). Solo *F. mediterranea* e alcuni "Deuteromiceti" celomiceti, "Deuteromiceti" ifali e Basidiomiceti non identificati hanno prodotto laccasi, enzima direttamente coinvolto nella degradazione del legno. Relativamente diffusa è apparsa la produzione di perossidasi (nella degradazione della lignina sono normalmente coinvolti 4

Tab. 1 - Produzione di alcuni enzimi degradativi-ossidativi da parte dei funghi dell'esca

Enzima	<i>F. mediterranea</i>	<i>P. chlamydospora</i>	<i>P. aleophilum</i>
Fenolossidasi	++++	-	+/-
Laccasi	++++	-	-
Perossidasi	++++	+	+
Endo-1,4-β-glucanasi	++++	++++	++++
Eso-cellobioidrolasi	+/-	-	-
β-glucosidasi	++++	++++	++++
Amilasi	debole	elevata	elevata

Il numero di segni + è esemplificativo della capacità di produzione dell'enzima da parte di un numero più o meno elevato di isolati saggiati.

famiglie di enzimi ossidativi: perossidasi della lignina, laccasi, perossidasi manganese dipendente e perossidasi manganese indipendente) e fenolossidasi; più sporadica quella degli altri enzimi indagati (amilasi, esterasi, fosfatasi acida, eso-cellobioidrolasi, tirosinasi, ramnosidasi, idrolasi dell'acido ferulico, della vanillina e della rutina).

I risultati ottenuti hanno confermato la capacità di *F. mediterranea* di degradare il legno. Infatti, tutti gli isolati utilizzati nelle prove hanno mostrato di produrre laccasi, perossidasi, fenolossidasi, ramnosidasi, endo-1,4- $\beta$ -glucanasi, eso-cellobioidrolasi, fosfatasi acida; solo alcuni di essi hanno idrolizzato l'acido ferulico, la rutina e la vanillina. Non hanno invece prodotto esterasi e tirosinasi.

Gli isolati di *Phaeoacremonium* e *Phaeoconiella* hanno prodotto solo alcuni enzimi e con molta variabilità, con riferimento sia all'isolato sia al tipo di substrato impiegato: occasionalmente e su specifici substrati hanno mostrato di produrre perossidasi, fosfatasi, esterasi, fenolossidasi. In quest'ultimo caso è stato utilizzato un substrato a base di estratto di malto contenente lo 0,5% di acido tannico. La reazione positiva è stata evidenziata dalla comparsa di un alone bruno intorno alla colonia. Quattro/4 isolati di *F. mediterranea*; 0/7 isolati di *Pch* e 4/8 isolati di *Pal* hanno mostrato di idrolizzare l'acido tannico. Più regolare è apparsa la produzione di endo-1,4- $\beta$ -glucanasi, eso-cellobioidrolasi e amilasi.

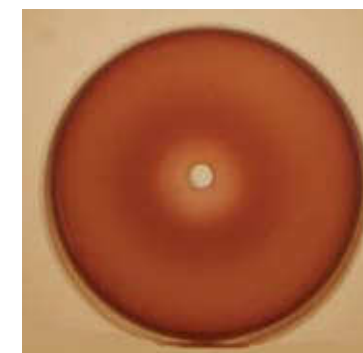
La variabilità nella produzione di enzimi ossidativi da parte dei funghi associati all'esca è stata confermata da alcuni recenti studi di Overton *et al.* (2006) i quali hanno potuto accertare che alcuni isolati di specie di *Phaeoacremonium* (*angustius* e *viticola*) sono capaci, diversamente da un isolato di *P. chlamydospora* e da alcuni isolati di altre specie di *Phaeoacremonium*, di ossidare il Mn bivalente a Mn trivalente, indice della produzione di perossidasi manganese dipendente. Anche Bruno e Sparapano (2005) hanno svolto, fra l'altro, prove di degradazione dell'acido tannico in condizioni diverse da quelle impiegate da Mugnai *et al.* (*loc. cit.*). I due autori hanno confermato la produzione di fenolossidasi (tannasi) in *Pal* e *Fmed*.

Uno studio accurato sulla produzione di enzimi esocellulari è stato svolto anche da Santos *et al.* (2006b). In questo caso gli enzimi indagati nei liquidi colturali di *Pch* (8 isolati), *P. angustius* (3 isolati), *P. aleophilum* (1 isolato) e *P. viticola* (2 isolati) sono stati i seguenti: proteasi, lipasi, amilasi, cellulasi, xilanasi, chitinasi, ureasi, laccasi, lignina perossidasi e manganese perossidasi. Nessuno dei ceppi indagati ha mostrato di produrre chitinasi, lignina e manganese perossidasi. Tutti i ceppi hanno invece prodotto proteasi, lipasi, amilasi, cellulasi, xilanasi, e ureasi. Attività della laccasi è stata osservata solo nei liquidi colturali delle specie di *Phaeoacremonium*.

Le osservazioni di Mugnai *et al.* (1995, 1997); Santos *et al.* (2006b), Bruno e Sparapano (2005), Overton *et al.* (2006) confermano la capacità di *Pch* e *Pal* di vivere all'interno di una pianta (nessuno dei funghi, ad esempio, ha prodotto chitinasi, un enzima proprio dei funghi entomopatogeni) risultando in grado di produrre enzimi capaci di aggredire diverse componenti della parete cellulare e di procurare ai due funghi, nello stesso tempo, molecole assimilabili necessarie per la loro crescita. Santos *et al.* hanno anche accertato, diversamente da Mugnai *et al.* e come Bruno e Sparapano, che le specie di *Phaeoacremonium* possono produrre laccasi. Ciò significa che questi funghi (o quanto meno i ceppi che producono l'enzima) possono partecipare, insieme a *F. mediterranea*, anche alla degradazione del legno.

Infine, dagli studi di Mugnai *et al.* è apparso interessante il fatto, comunque atteso, che molti dei funghi che si isolano normalmente, insieme a quelli ritenuti responsabili dell'esca, dal

Fig. 2 - Saggio (cup plate assay) per rilevare la produzione di enzimi pectici di tipo idrolitico da parte di *Phaeoconiella chlamydospora* ceppo 16 cresciuto su di un mezzo liquido contenente pectina come unica fonte di carbonio. La zona chiara intorno al pozzetto centrale in cui è stato caricato il liquido colturale del fungo, è indicativa della capacità di *P. chlamydospora* di produrre poligalatturonasi. L'anello rosso scuro è indicativo della capacità di produrre pectin esterasi



legno alterato di vite hanno mostrato di produrre numerosi degli enzimi indagati, incluso la laccasi. Anche questi funghi potrebbero dunque contribuire, con maggiore o minore efficienza, a una o l'altra delle fasi che segnano l'alterazione del legno nelle piante ammalate di esca.

Alcune indagini hanno anche riguardato la produzione di enzimi pectinolitici da parte di *Pch* e di *Pal*. Questi enzimi sono generalmente utilizzati dal patogeno per macerare i tessuti e anche per invadere la pianta, seguendo una via parenchimatosa o vascolare. Essi sono inclusi in due principali gruppi: pectin-esterasi (la pectina viene demetilata) e depolimerasi (viene rotta la catena di acido D-galatturonico: endo- ed eso-poligalatturonasi, endo ed eso-polimetilgalatturonasi, pectina e pectato liasi). L'attività degli enzimi pectinolitici è condizionata dalla concentrazione nel substrato di ioni  $Ca^{2+}$  e dal pH. Per alcuni enzimi l'ottimo è in ambiente acido, per altri è a pH intorno a 8,5. Tenendo conto di queste limitazioni sono state svolte alcune prove rivolte ad accertare la capacità di produrre enzimi pectinolitici da parte di alcuni isolati di *Pch* e *Pal* (Marchi *et al.*, 2001).

I risultati ottenuti hanno indicato che *Pch* e alcune specie di *Phaeoacremonium* (*aleophilum*, *inflatipes* e *rubrigenum*) producono, in ambiente acido e a bassa concentrazione di ioni calcio, quanto meno poligalatturonasi e polimetilgalatturonasi (fig. 2); che la produzione di questi enzimi varia da isolato a isolato e, infine, variabile è risultata anche la capacità dei funghi saggati di utilizzare come fonte di carbonio i prodotti della demolizione delle sostanze pectiche. Al contrario, dalle prove non è emersa alcuna capacità di produrre pectin liasi in ambiente alcalino.

La produzione di poligalatturonasi in *Pch* e *Pal* (ma anche in *P. angustius* e *P. viticola*) è stata confermata da Santos *et al.* (2005). Gli stessi autori hanno accertato anche la produzione di pectato liasi in *Pal*, *P. angustius* e *P. viticola*.

#### IV.1.3 Accrescimento dei funghi dell'esca in presenza di sostanze fenoliche

In questo caso, allo scopo di verificare la capacità dei funghi dell'esca di agire in concomitanza o in successione (siamo al tempo delle prime fasi del nuovo corso di studi sul mal dell'esca), è stata seguita la capacità di *Fmed*, *Pch* e *Pal* (in confronto a *Stereum hirsutum*, *Acremonium berkeleyanum* ed

**Tab. 2 - Effetto di tre fenoli sull'accrescimento di 4 funghi patogeni per la vite**

Specie fungina	Accrescimento percentuale rispetto al controllo (%)		
	Acido gallico*	Acido caffeico§	Acido vanillico°
<i>Fomitiporia mediterranea</i>	- 8	- 22	- 100
<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	+ 15	- 6	- 71
<i>Phaeoconiella chlamydospora</i>	+ 39	- 66	- 100
<i>Eutypa lata</i>	+ 192	+ 119	n.d.

Legenda: \* 0,5 g/l; § 0,5 g/l; °1 g/l.

*Eutypa lata*) di crescere in presenza di sei diverse sostanze fenoliche: acido caffeico, acido gallico, acido siringico, acido vanillico, catechina e quercetina, a diversa concentrazione (da 0,1 a 10 g/l).

I risultati ottenuti (Mugnai *et al.*, 1995, 1997) non hanno evidenziato una particolare differenziazione dei funghi saggiati (tab. 2). Tuttavia, la crescita di *F. mediterranea* è stata, in generale, rispetto a quella degli altri funghi, maggiormente inibita dai fenoli impiegati nelle prove. I fenoli più attivi a questo riguardo sono stati, nell'ordine: acido vanillico, siringico e caffeico, quercetina e acido gallico. La catechina ha inibito leggermente il fungo solo alle concentrazioni più alte (5 e 10 g/l). Inoltre, quando in un substrato liquido contenente acido gallico (1 e 8,1 g/l) sono stati fatti crescere prima *P. chlamydospora* o *P. aleophilum* e poi *F. mediterranea*, quest'ultimo fungo si è accresciuto meglio nel liquido di coltura. Ciò suggerisce che *P. chlamydospora* e *P. aleophilum* potrebbero trasformare un ambiente sfavorevole alla crescita di *F. mediterranea* in un ambiente in cui il fungo può crescere in maniera più rapida e rigogliosa. In effetti *Phaeoconiella chlamydospora* e *Phaeoacremonium aleophilum* sono stati inibiti, a tutte le concentrazioni saggiate, solo dall'acido vanillico. Quercetina, catechina e acido caffeico hanno causato riduzione della crescita alle concentrazioni più alte. Acido siringico e, soprattutto, acido gallico hanno stimolato l'accrescimento dei due funghi.

Infine, quando *F. mediterranea* è stata posta in presenza di acido gallico la sua crescita, come detto prima, è stata inibita variamente a seconda della concentrazione del fenolo; nel frattempo il substrato ha acquisito un intenso colore bruno. È probabile, in questo caso, che l'inibizione della crescita del fungo sia stata determinata dai prodotti di ossidazione del fenolo in conseguenza di

**Tab. 3 - Contenuto in polifenoli totali, tannini totali e resveratrolo in radici del portainnesto SO4 variamente infette\*\***

Radici	Composto attivo		
	Polifenoli totali*	Tannini totali§	Resveratrolo°
Non infette	12 ± 3	5 ± 0,8	0,17 ± 0,06
Infette	26 ± 6	16 ± 2	0,35 ± 0,1
Molto infette	34 ± 8	31 ± 6	0,44 ± 0,1

\* Polifenoli totali: g di acido gallico/100 g di tessuto fresco; § Tannini condensati e idrolizzabili: g di catechina equivalente e g di acido gallico, rispettivamente, per 100 g di tessuto fresco); ° Resveratrolo (g/100 g di tessuto fresco).

\*\* Fonte: Del Rio *et al.*, 2001.

reazioni catalizzate dalle fenolossidasi del fungo. I prodotti finali di queste reazioni sarebbero pigmenti di colore bruno (polimeri di chinoni) che si accumulano nel substrato di coltura. In pianta, il processo descritto potrebbe essere responsabile dell'imbrunimento/annerimento dei tessuti di vite. Invece, Bruno e Sparapano (2005), avendo osservato un annerimento del substrato di coltura per una ipotizzata trasformazione dell'acido tannico presente nel substrato in tannino complesso di colore nero, hanno ipotizzato che ciò potrebbe determinare la formazione delle "venature brune" che si osservano in alcune delle sindromi del complesso dell'esca.

I due ultimi autori citati hanno anche seguito l'andamento della crescita di *Pch*, *Pal* e *Fmed* in presenza di resveratrolo (50 µg/ml): la crescita di tutti e tre i funghi è stata in generale inibita (con *Fmed* più sensibile di *Pch* e *Pal*) in coltura agarizzata e, soprattutto, in coltura liquida (in quest'ultima condizione, la crescita di *Pch* è stata addirittura leggermente stimolata); inoltre, *Pch*, *Pal* e *Fmed* hanno mostrato di degradare il resveratrolo, utilizzandolo come unica fonte di carbonio nel substrato.

Prove di inibizione della crescita di *Pch*, *Pal* e *P. inflatipes* sono state svolte anche utilizzando estratti di radici da piante colpite dalla malattia di Petri. Tali estratti contenevano elevate concentrazioni di polifenoli, tannini e anche resveratrolo (tab. 3).

Tutti e tre i funghi sono stati variamente inibiti dagli estratti saggiati, inclusi quelli da radici sane, e tale inibizione ha raggiunto una percentuale dell'89% nel caso di *Pch*, dell'88% nel caso di *Pal* e del 43% nel caso di *P. inflatipes* accresciuta in presenza (12, 14 e 8%, rispettivamente, nel caso di estratti da radici sane) (Del Rio *et al.*, 2001).

#### IV.1.4 Conclusioni

I due funghi dell'esca, *Pch* e *Pal*, sono dunque risultati in grado di produrre *in vitro*, e forse anche *in vivo*, enzimi pectinolitici i quali potrebbero essere utilizzati dai due patogeni, oltre che per procurarsi molecole assimilabili, anche per progredire nella pianta ospite. Inoltre, i composti a più alto peso molecolare, prodotti nelle fasi intermedie del processo di demolizione delle pectine, potrebbero contribuire, ad esempio con le tille, alla occlusione dei vasi xilematici.

*Pch* e *Pal* sono anche risultati in grado di produrre diversi altri enzimi ossidativi, capaci di aggredire le sostanze fenoliche che si accumulano nel legno di vite. Un indizio, questo, della capacità dei due funghi di colonizzare il legno di vite, cioè di comportarsi come parassiti nella pianta ospite. Questa loro azione demolitoria dei fenoli della vite potrebbe anche riuscire utile per l'accrescimento di *Fmed*, il quale è apparso soffrire la presenza di fenoli nel substrato di accrescimento.

Nel complesso, si può affermare che *Pch* e *Pal*, al di là dell'uso che ne potrebbero fare, possiedono fattori identificabili come fattori di virulenza e ciò li qualifica, in via presuntiva, come patogeni.

## IV.2 Fattori di virulenza dei funghi dell'esca. Fitotossine di *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum* e *Fomitiporia mediterranea*: produzione e attività biologica

A. Evidente\*, F. Peduto, A. Andolfi, G. Marchi, L. Mugnai, G. Surico

### IV.2.1 Naftochinoni

Diversi metaboliti, appartenenti a differenti classi di composti naturali, sono stati isolati da colture di *Phaeomoniella chlamydospora* (*Pch*) e *Phaeoacremonium aleophilum* (*Pal*). In particolare dai liquidi di accrescimento di *Pal* sono stati isolati: lo scitalone, l'isosclerone e la 4-idrossibenzenalide (Evidente *et al.*, 2000, Tabacchi *et al.*, 2000), il *cis*-4-idrossiscitalone, 2,4,8-triidrossitetralone (2,4,8-THT), 3,4,8-triidrossitetralone (3,4,8-THT), 1,3,8-triidrossinaftalene (1,3,8-THN) e flaviolina (Tabacchi *et al.*, 2000) (fig. 1, tab. 1).

Da colture liquide di *Pch* sono stati invece isolati, oltre a tre dei metaboliti già identificati per *Pal* (scitalone, isosclerone e 4-idrossibenzenalide), il tirosolo, l'1-*O*-metilemodina, il 3-idrossi-5-decanolide, l'acido (*S*)-4-idrossifenilattico e l'acido 3-(3-metil-2-butenilossi)-4-idrossibenzoico (Tabacchi *et al.*, 2000) (fig. 2, tab. 2).

Infine, studi preliminari su *Fmed* hanno evidenziato la presenza nei suoi filtrati colturali

**Tab. 1 - Metaboliti isolati da *Phaeoacremonium aleophilum* e relativa fitotossicità**

Metabolita	Matrice vegetale utilizzata per i saggi di fitotossicità	Letteratura
Scitalone	Foglie di vite Calli e protoplasti di vite <i>Arabidopsis thaliana</i>	Evidente <i>et al.</i> , 2000 Tabacchi <i>et al.</i> , 2000 Abou-Mansour <i>et al.</i> , 2004
Isosclerone	Foglie di vite Calli e protoplasti di vite <i>Arabidopsis thaliana</i>	Evidente <i>et al.</i> , 2000 Tabacchi <i>et al.</i> , 2000 Abou-Mansour <i>et al.</i> , 2004
4-idrossibenzenalide	Calli e protoplasti di vite	Tabacchi <i>et al.</i> , 2000
<i>cis</i> -4-idrossiscitalone	Calli e protoplasti di vite	Abou-Mansour <i>et al.</i> , 2004
2,4,8-triidrossitetralone	Calli di vite <i>Arabidopsis thaliana</i>	Abou-Mansour <i>et al.</i> , 2004
3,4,8-triidrossitetralone	Calli di vite <i>Arabidopsis thaliana</i>	Abou-Mansour <i>et al.</i> , 2004
1,3,8-triidrossinaftalene	Calli di vite	Abou-Mansour <i>et al.</i> , 2004
Flaviolina	Calli di vite <i>Arabidopsis thaliana</i>	Abou-Mansour <i>et al.</i> , 2004

\* Università di Napoli "Federico II" email: evidente@unina.it

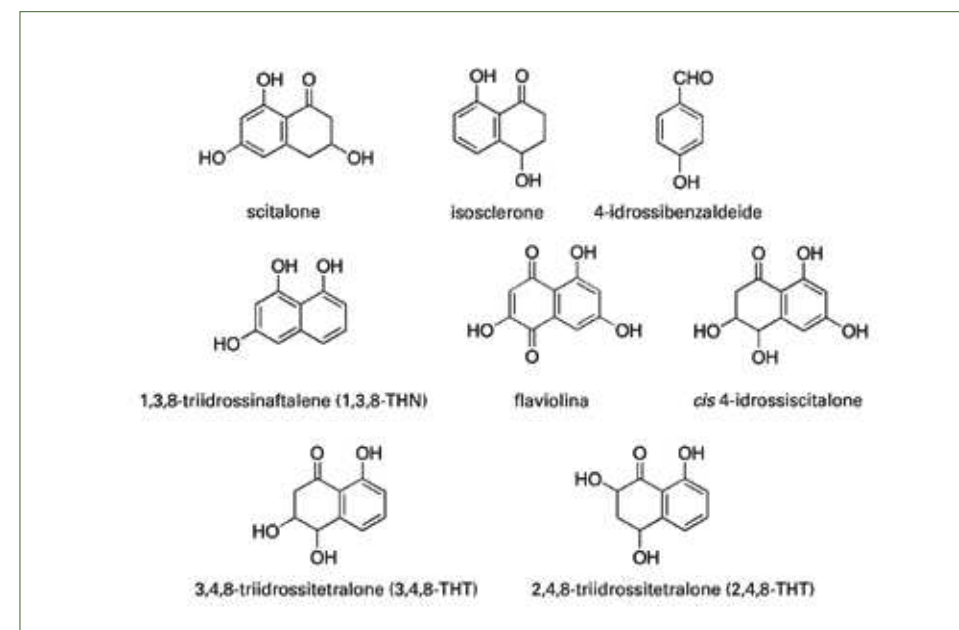


Fig. 1 - Struttura chimica dei metaboliti isolati da *Phaeoacremonium aleophilum*

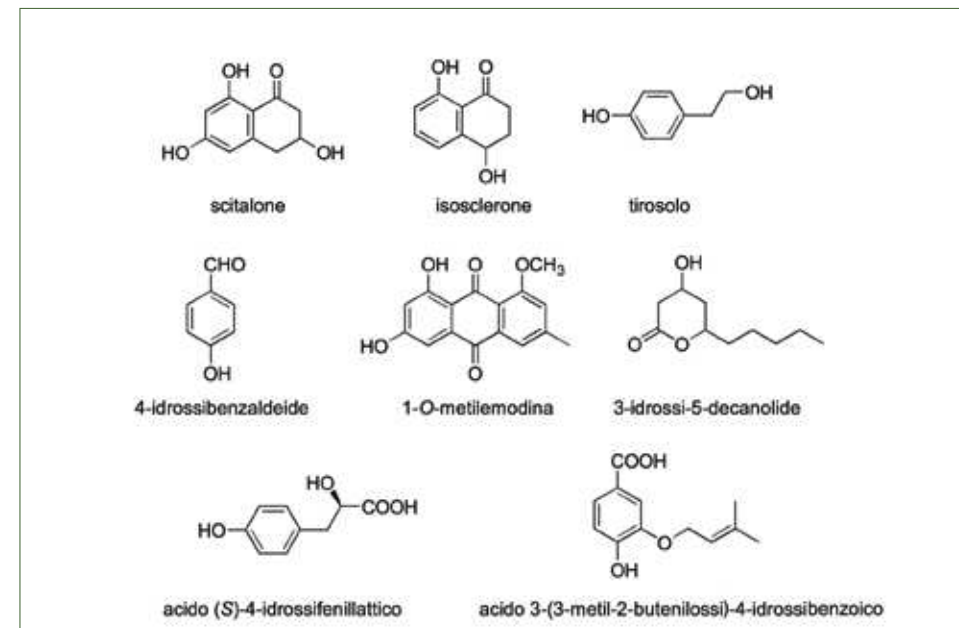


Fig. 2 - Struttura chimica dei metaboliti isolati da *Phaeomoniella chlamydospora*

Tab. 2 - Metaboliti isolati da <i>Phaeoconiella chlamydospora</i> e relativa fitotossicità		
Metabolita	Matrice vegetale utilizzata per i saggi di fitotossicità	Letteratura
Scitalone	Protoplasti e calli di vite <i>Arabidopsis thaliana</i>	Tabacchi <i>et al.</i> , 2000 Abou-Mansour <i>et al.</i> , 2004
Isosclerone	Protoplasti e calli di vite <i>Arabidopsis thaliana</i>	Tabacchi <i>et al.</i> , 2000 Abou-Mansour <i>et al.</i> , 2004
4-idrossibenzaldeide	Protoplasti e calli di vite	Tabacchi <i>et al.</i> , 2000
Tirosolo	n.t.	Tabacchi <i>et al.</i> , 2000
1-O-metilemodina	n.t.	Tabacchi <i>et al.</i> , 2000
3-idrossi-5-decanolide	n.t.	Tabacchi <i>et al.</i> , 2000
acido (S)-4-idrossifenillattico	Protoplasti e calli di vite	Tabacchi <i>et al.</i> , 2000
acido 3-(3-metil-2-butenilossi)-4-idrossibenzoico	Protoplasti e calli di vite	Tabacchi <i>et al.</i> , 2000

n.t. = non testato.

della 4-idrossibenzaldeide, del diidroactinolide e del 6-formil-2,2-dimetil-4-cromanone, un nuovo cromanone biogeneticamente correlato all'eutipina (Tabacchi *et al.*, 2000) (fig. 3, tab. 3).

Diversi studi sono stati condotti per stabilire il ruolo di tali metaboliti nel mal dell'esca. Innanzitutto ne è stata indagata l'attività fitotossica. Lo scitalone saggio su foglie di vite Italia, ha causato la comparsa di macchie clorotiche irregolari, marginali o internervali; l'isosclerone ha causato invece macchie più estese, dapprima clorotiche, poi coalescenti e

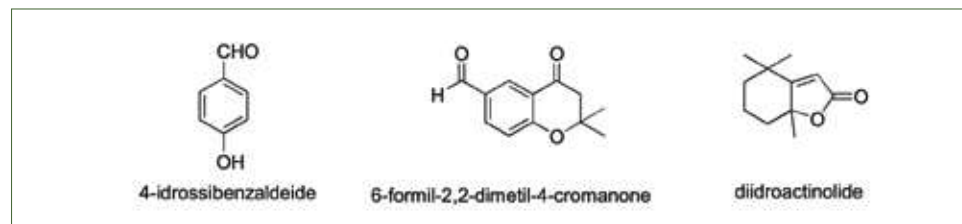


Fig. 3 - Struttura chimica dei metaboliti isolati da *Fomitiporia mediterranea*

Tab. 3 - Metaboliti isolati da <i>Fomitiporia mediterranea</i> e relativa fitotossicità		
Metabolita	Matrice vegetale utilizzata per i saggi di fitotossicità	Letteratura
4-idrossibenzaldeide	Calli e protoplasti di vite	Tabacchi <i>et al.</i> , 2000
Diidroactinolide	n.t.	Tabacchi <i>et al.</i> , 2000
6-formil-2,2-dimetil-4-cromanone	n.t.	Tabacchi <i>et al.</i> , 2000

n.t. = non testato.

necrotiche, cui si è accompagnata la distorsione della lamina fogliare (Evidente *et al.*, 2000; Sparapano *et al.*, 2000b, 2001; Bruno *et al.*, 2006).

Ulteriori studi sono stati condotti su protoplasti e calli di vite. In particolare, l'attività della 4-idrossibenzaldeide, e degli acidi (S)-4-idrossifenillattico e 3-(3-metil-2-butenilossi)-4-idrossibenzoico è stata saggata su protoplasti di *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon, o Ugni blanc calcolando la percentuale di protoplasti sopravvissuti dopo 24 ore in presenza di soluzioni dei composti ( $10^{-5}$ - $10^{-6}$  M). In particolare la 4-idrossibenzaldeide ha mostrato un'inibizione del 20% alla concentrazione di 100 mM e del 100% a 1 mM (Tabacchi *et al.*, 2000).

Calli di *Vitis vinifera* cv. Gamay sono stati accresciuti in condizioni standard in presenza delle tre tossine alle concentrazioni di 100  $\mu$ M, 250  $\mu$ M e 500 mM per 28 giorni. L'attività è stata calcolata con variazione del peso del callo (%) rispetto al controllo accresciuto in assenza dei metaboliti. I due acidi, (S)-4-idrossifenillattico e 3-(3-metil-2-butenilossi)-4-idrossibenzoico, sono risultati attivi sui protoplasti alla concentrazione di 1 mM (Tabacchi *et al.*, 2000).

Studi successivi condotti dagli stessi autori (Abou-Mansour *et al.*, 2004) hanno evidenziato per lo scitalone, l'isosclerone, il 2,4,8-triidrossitetralone (2,4,8-THT), il 3,4,8-triidrossitetralone (3,4,8-THT) e la flaviolina una capacità di interferire con la crescita dei calli. In particolare, lo scitalone e il 2,4,8-THT hanno mostrato un effetto inibente a concentrazioni di 0,5 mM. È stato invece osservato un incremento dell'accrescimento indotto dallo scitalone e dal 3,4,8-THT a concentrazioni più basse (0,1 mM) e dall'isosclerone a 0,25 mM. Un analogo effetto promotore dell'accrescimento è stato osservato sia per lo scitalone, sia per il 3,4,8-THT su semi di *Arabidopsis thaliana*. I due polifenoli hanno stimolato la crescita delle radici a concentrazione di 0,3, 0,01 e 0,01 mM rispettivamente.

Naftochinoni strutturalmente generati dalla stessa via biosintetica dei metaboliti isolati da *Pal* e *Pch*, come lo juglone, 2-HJ (2-idrossijuglone) e il 3-HJ (3-idrossijuglone) saggati nelle stesse condizioni sono risultati inibitori dell'accrescimento dei calli di vite a concentrazioni di 0,1 mM. La flaviolina ha prodotto lo stesso effetto a concentrazione di 0,25 mM. Un analogo effetto inibente è stato osservato sulla crescita delle radici di *A. thaliana* saggando il 2-HJ, il 3-HJ e la flaviolina (Abou-Mansour *et al.*, 2004). Sulla base di tali risultati i metaboliti possono essere divisi in due classi: tetraloni come lo scitalone, l'isosclerone, 2,4,8-THT e 3,4,8-THT quali promotori della crescita dei calli; i naftochinoni come lo juglone, 2-HJ, 3-HJ e la flaviolina quali inibitori della crescita (Abou-Mansour *et al.*, 2004).

### IV.2.2 Polisaccaridi fitotossici

Alcune osservazioni sperimentali hanno evidenziato che *Pch* e *Pal*, coltivati in substrati liquidi nutritivi contenenti glucosio e alcuni fattori di crescita, sono in grado di produrre esopolisaccaridi (EPSs) (Sparapano *et al.*, 2000b).

Negli ultimi anni è stata determinata la struttura degli EPSs prodotti da numerosi funghi e batteri fitopatogeni. Alcuni EPSs presentano una struttura molto complessa, caratterizzata non solo da unità monosaccaridiche, risultando essere, pertanto, degli eteropolimeri. Tali studi hanno anche permesso di evidenziare le notevoli differenze strutturali esistenti tra gli EPSs prodotti da microrganismi fitopatogeni diversi (Evidente e Motta, 2002).

Diverse ipotesi sono state formulate in merito al coinvolgimento degli esopolisaccaridi nel

processo di patogenesi (Hodgson *et al.*, 1949; Harborne, 1983; van Alfen, 1989; Denny, 1995), ma il loro ruolo nella malattia non è stato ancora del tutto chiarito (van Alfen, 1989; Denny, 1995).

In alcuni casi è stato messo in evidenza il ruolo degli EPSs quali molecole segnale per l'attivazione dei meccanismi di difesa della pianta (elicitori) o il loro contributo significativo nella virulenza del patogeno. Infatti, in molti batteri fitopatogeni appartenenti ai generi *Agrobacterium*, *Clavibacter*, *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas*, la produzione di polisaccaridi sembra associata ai sintomi di appassimento e/o ingiallimento e ai meccanismi di colonizzazione del patogeno nella pianta ospite (Denny, 1995).

La produzione di polisaccaridi fitotossici è stata anche riportata per alcune specie fungine fitopatogene come: *Cephalosporium* (Spalding *et al.*, 1961), *Ceratocystis fagacearum* (McWain e Gregory, 1972), *Ophiostoma ulmi* (Strobel *et al.*, 1978), *Fusarium solani* (Thomas, 1949) e da diverse specie di *Phytophthora* (Keen *et al.*, 1975).

Diversi studi sono rivolti attualmente a stabilire il meccanismo d'azione di tali macromolecole. Gli EPSs potrebbero interferire con il movimento dell'acqua attraverso il sistema vascolare della pianta determinando i fenomeni di appassimento. Tale azione potrebbe essere legata alle loro caratteristiche fisiche quali l'elevato peso molecolare e/o alla loro influenza sulla viscosità dell'acqua (Harborne, 1983), come osservato su alcune piante (McWain e Gregory, 1972; Rudolph *et al.*, 1989).

La determinazione strutturale degli EPSs prodotti da *Pch* e *Pal* in coltura liquida è stata eseguita essenzialmente mediante l'uso di tecniche cromatografiche HPLC (cromatografia a esclusione molecolare), analisi elementare e spettroscopia infrarossa (IR) (Sparapano *et al.*, 2000b). Tali esopolisaccaridi sono stati pertanto classificati come pullulani con pesi molecolari compresi tra 10 e 2500 kDa. Tale famiglia è costituita da omopolisaccaridi lineari di glucosio descritti come polimeri di maltotriosio caratterizzati da legami  $\alpha(1\rightarrow6)$  glucosidici (Sparapano *et al.*, 2000b).

I pullulani per le loro particolari proprietà hanno suscitato un grande interesse per le possibili applicazioni industriali (Leathers, 2002). Inoltre, sono già noti metaboliti fungini prodotti in grandi quantità dal fungo non patogeno *Aureobasidium pullulans* che mostra pertanto una grande potenzialità applicativa (Shingel, 2004).

Diverse indagini sono state condotte pertanto per stabilire il loro ruolo nelle complesse fasi dell'interazione vite-funghi del complesso esca.

Nei saggi condotti utilizzando sia pullulani isolati dalle colture di *Pch* e *Pal* che con campioni commerciali standard ottenuti da *A. pullulans*, tali pullulani sono risultati fitotossici (Sparapano *et al.*, 2000; Bruno e Sparapano, 2006a, 2006b).

Infatti, in soluzione acquosa questi composti, nonostante le dimensioni molecolari relativamente elevate, sono in grado di essere traslocati per via vascolare nelle piante in virtù della loro conformazione spaziale, conseguenza dei legami  $\alpha(1\rightarrow4)$  e  $\alpha(1\rightarrow6)$  glucosidici. Risultano essere pertanto molto flessibili e dotati di singolari proprietà reologiche (Leathers, 2002). Assorbiti in minime concentrazioni (20-50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) da foglie o germogli di vite recisi, oppure iniettati direttamente nel fusto di viti, questi composti non causano occlusioni vascolari, ma sono traslocati (non si sa ancora se integri o parzialmente degradati) fino ai parenchimi fogliari. In questa sede, dopo aver raggiunta una concentrazione bioattiva, gli EPSs causano la comparsa di aree internerali inizialmente clorotiche, brune o rosse, poi necrotiche, ricordanti le manifestazioni del mal dell'esca sulle foglie (Sparapano *et al.*, 2000; Bruno e Sparapano, 2006a; 2006b).

### IV.2.3 Presenza nella pianta di metaboliti fitotossici

La presenza di uno o l'altro o di tutti i metaboliti fitotossici di *Pch*, *Pal* e *Fmed* è stata evidenziata in porzioni di legno con venature brune (Sparapano *et al.*, 2000c), in foglie e nel fluido ("pianto") emesso attraverso i tagli di potatura di branche di viti Sangiovese adulte (30 anni) naturalmente infette, mostranti gravi sintomi di venature brune e carie del legno (Bruno e Sparapano, 2006a). La loro presenza è stata inoltre rilevata, sempre dagli stessi Autori, in calli di vite infettati da *Pch* e *Pal* (Bruno e Sparapano, 2006b). Più di recente Bruno e collaboratori (2006b) hanno misurato la concentrazione di scitalone, isosclerone, EPSs e pullulani nel pianto, nelle foglie, nella rachide del grappolo e negli acini di piante di vite colpite da esca o da esca propria (tab. 4). Interessante, nel lavoro di Bruno e collaboratori è apparsa la dinamica dell'accumulo delle tossine fungine nei tessuti di vite in relazione al volume di pianto emesso dalle piante e allo stadio fenologico delle viti (tabb. 4-5).

**Tab. 4 - Presenza di metaboliti fitotossici nel pianto e in vari organi di piante di vite\***

Pianta malata	Pianto** ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Foglie con sintomi ( $\mu\text{g}/\text{g}$ peso fresco)		Rachide ( $\mu\text{g}/\text{g}$ peso fresco)	Acini ( $\mu\text{g}/\text{g}$ peso fresco)
		Fase chiusura del grappolo	Fase maturazione del grappolo		
ESCA					
- scitalone	5,5	2,3	3,0	0,6	0,6
- isosclerone	25,2	2,7	2,5	0,6	0,7
- EPS	1,3	—	—	—	—
- pullulani	0,9	—	—	—	—
ESCA PROPRIA					
- scitalone	4,2	1,1	1,2	0,5	0,3
- isosclerone	18,2	1,1	1,4	0,3	0,4
- EPS	1,3	—	—	—	—
- pullulani	1,0	—	—	—	—

\* Adattamento da Bruno e Sparapano, 2006b. \*\* Misura del 22 marzo.

**Tab. 5 - Accumulo di fitotossine nel pianto e in vari organi di piante di vite\***

Pianta malata	22-28 marzo 22 marzo	29 marzo-4 aprile 29 marzo	5-11 aprile 5 aprile	2-18 aprile 12 aprile
ESCA				
- pianto**	192,8	364,3	284,3	67,1
- scitalone	5,5	1,5	0,1	n.d.
- isosclerone	25,2	7,5	0,2	n.d.
- EPS	1,3	0,9	0,8	0,4
- pullulani	0,9	0,6	0,5	0,2
ESCA PROPRIA				
- pianto**	168,6	384,3	242,8	95,7
- scitalone	4,2	1,0	n.d.	n.d.
- isosclerone	18,2	3,0	0,6	n.d.
- EPS	1,3	1,1	0,8	0,3
- pullulani	1,0	0,8	0,5	0,2

\* Adattamento da Bruno e Sparapano, 2006b. \*\* ml raccolti per giorno.

### IV.2.4 Saggi di fitotossicità

Con lo scopo di approfondire la natura fitotossica dei metaboliti di *Pch* e *Pal* e il loro ruolo nella genesi dei sintomi fogliari del mal dell'esca sono stati effettuati, nel corso del progetto, ulteriori saggi di attività biologica su recisi di foglie e su calli di vite. In particolare, tali saggi hanno riguardato il grado di perossidazione dei lipidi di membrana, la perdita di elettroliti da parte di dischetti fogliari di vite, l'effetto dei liquidi colturali dei due funghi sulla crescita di calli di vite ecc. Nelle prove sono stati utilizzati liquidi colturali, estratti parzialmente purificati dei liquidi colturali, campioni puri di isosclerone, scitalone e pullulano.

#### Perossidazione dei lipidi di membrana

L'aspetto assunto dai sintomi fogliari dell'esca suggerisce, in qualche modo, il coinvolgimento di fenomeni associati alla senescenza, in questo caso anticipata. La senescenza, diversamente dall'invecchiamento, è un processo metabolico attivo (che richiede, quindi, energia) spesso innescato da cause naturali esterne, quali variazioni stagionali, stress di vario genere (biotici e abiotici), stimoli ormonali. Per questi motivi la senescenza può essere definita come un fenomeno di degenerazione controllata dipendente dall'attivazione di un insieme di vie metaboliche specifiche e selettive, tra loro concatenate, che portano alla perdita dell'integrità della membrana citoplasmatica e, di conseguenza, della stessa cellula. In effetti, uno dei sintomi precoci della senescenza è rappresentato dal deterioramento della struttura e delle proprietà della membrana, in particolare dal deterioramento delle sue componenti lipidiche. Fra i principali responsabili della degradazione dei lipidi sono da considerarsi le lipossigenasi, enzimi in grado di catalizzare la perossidazione di acidi grassi a lunga catena in derivati *cis*, *trans*-idroperossidienici coniugati (idroperossidi). C'è da aggiungere che la destabilizzazione delle membrane cellulari fino alla morte della cellula viene anche vista come parte del meccanismo più generale di difesa attiva della pianta (reazione di ipersensibilità).

Per la determinazione del grado di perossidazione dei lipidi nelle membrane è stato uti-

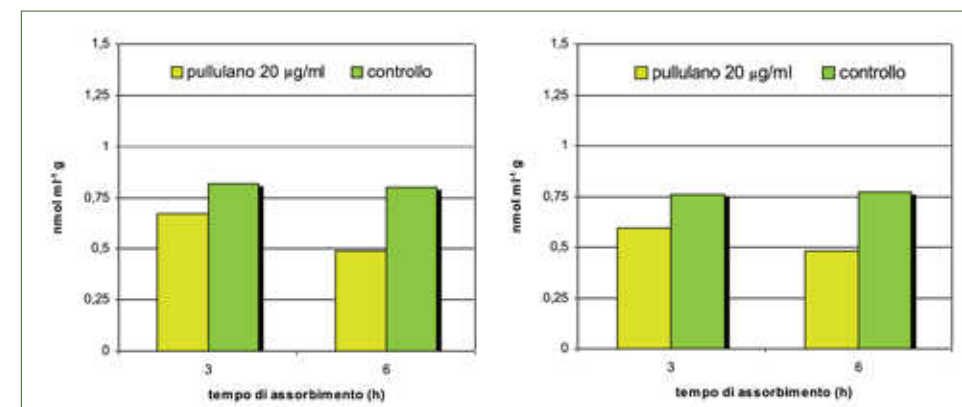


Fig. 6 - Perossidazione dei lipidi con pullulano a 20 µg/ml

lizzato, nelle prove qui riportate, il saggio della malonil-dialdeide (MDA) o metodo dell'acido tiobarbiturico secondo il protocollo messo a punto da Hodges (Hodges *et al.*, 1999).

Nella prima prova effettuata è stata saggiata l'attività del filtrato colturale in concentrazione tal quale (fig. 4). La concentrazione di malonil-dialdeide dopo 1,5, 3 e 6 ore di assorbimento è risultata più alta, sia pure di poco, nei campioni trattati con il filtrato colturale tal quale (TQ) rispetto al controllo.

Nel caso delle prove eseguite con scitalone la concentrazione di malonil-dialdeide è apparsa più alta nel trattato rispetto al controllo, dopo 0,5 ore di incubazione (fig. 5). Invece, dopo 6 e 24 ore i valori della concentrazione della malonil-daldeide sono risultati pressoché uguali nelle due tesi.

I risultati ottenuti con il liquido colturale e con scitalone sembrano dunque indicare, per ora, l'assenza di un effetto eclatante sulla perossidazione dei lipidi di membrana da parte delle tossine prodotte da *Pal* o *Pch*.

Infine, quando è stato saggiato il pullulano i valori di perossidazione nelle tesi trattate con i polisaccaridi sono risultati inferiori ai valori del controllo (fig. 6). Ciò potrebbe significare che il pullulano non ha effetti sulla perossidazione dei lipidi o che l'effetto è esplicito in tempi più brevi di quelli impiegati nelle prove.

#### Perdita di elettroliti

La perdita di elettroliti attraverso la membrana citoplasmatica è un indice dello stato di funzionalità della membrana stessa. In effetti molte tossine microbiche, così come diversi anticrittogamici, agiscono sulla pianta o sul microrganismo, rispettivamente, con un meccanismo alterativo delle caratteristiche di semipermeabilità della membrana citoplasmatica. Per verificare, quindi, l'ipotesi che i sintomi fogliari di mal dell'esca possano essere correlati a una situazione di danno delle membrane citoplasmatiche operata dalle fitotossine di *Pal* e *Pch*, è stata determinata, mediante misura della conducibilità elettrica, la perdita di elettroliti da parte di dischetti di foglie di vite trattate con soluzioni contenenti tossine a varie concentrazioni: scitalone, 0,05 µg/ml; pullulano, 20 e 50 µg/ml.

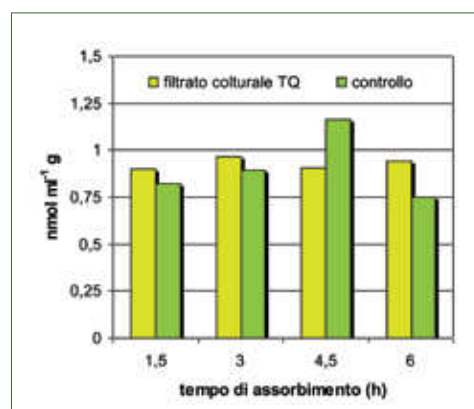


Fig. 4 - Perossidazione dei lipidi con filtrato colturale

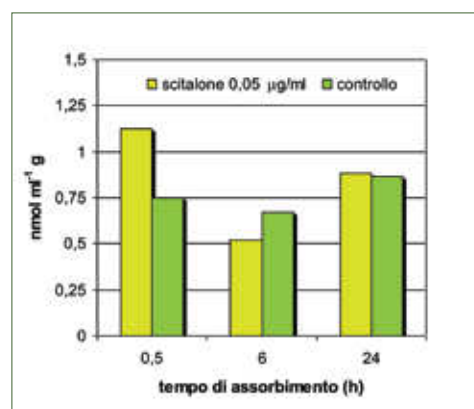


Fig. 5 - Perossidazione dei lipidi con scitalone a 0,05 mg/ml

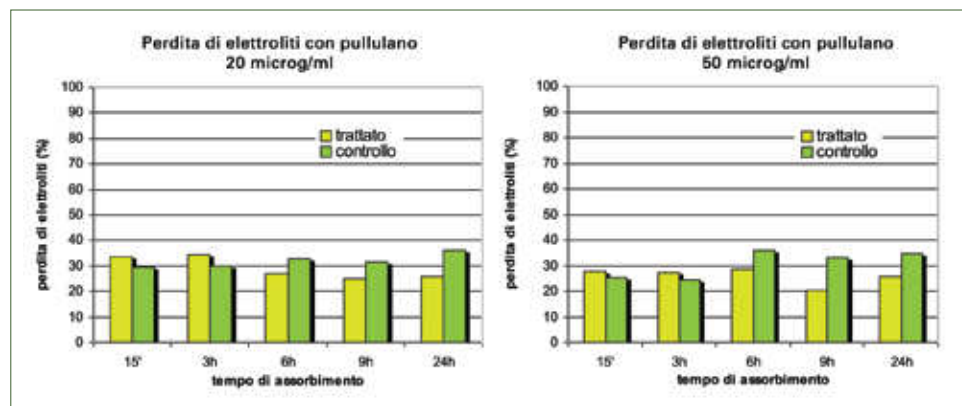


Fig. 7 - Perdita di elettroliti indotte da pullulano a 20 e 50 µg/ml

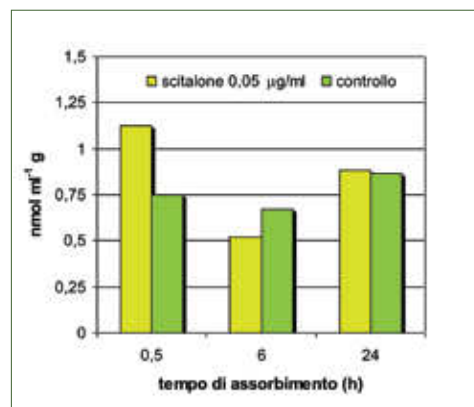


Fig. 8 - Perdita di elettroliti indotta dallo scitalone

I risultati ottenuti con il pullulano, a entrambe le concentrazioni utilizzate nelle prove, hanno evidenziato una certa attività del metabolita solo nelle prime tre ore di assorbimento (fig. 7). Dopo le prime tre ore i valori relativi ai controlli sono risultati superiori a quelli delle foglie trattate.

Per quanto riguarda invece il saggio effettuato con lo scitalone, si può osservare un aumento della perdita di elettroliti nei tessuti trattati fin dopo i primi 15 minuti di contatto con la sostanza. Questa attività, rispetto al controllo, rimane stabile nelle prime nove ore di assorbimento per poi aumentare ulteriormente a 24 ore dall'inizio della prova

(fig. 8). I valori registrati nel controllo sono rimasti invece pressoché invariati. Il danno provocato alla integrità della membrana citoplasmatica si aggrava dunque nel tempo.

Con lo scopo di completare le informazioni riguardanti l'attività biologica dei metaboliti fitotossici estratti dai liquidi colturali di *Pch* e *Pal*, sono stati effettuati, nel corso del 2006, saggi di attività biologica su calli e foglie di vite, su foglie di tabacco e su semi di alcune specie vegetali. Anche in queste prove sono stati utilizzati gli estratti parzialmente purificati del liquido colturale di *Pal* e i metaboliti fitotossici puri scitalone e isosclerone.

**Saggio di crescita su calli di vite**

Al terreno di coltura MS, normalmente utilizzato per allevare i calli di vite, versato in piastre a 24 pozzetti, sono stati aggiunti il filtrato colturale del fungo in proporzioni variabili tra lo 0,5 e il 20% e i metaboliti purificati scitalone e isosclerone in concentrazioni di 0,02, 0,05 e 0,1 mg/ml. In ogni pozzetto, contenente un volume finale di 1,5 ml di substrato, sono

stati posizionati piccoli pezzetti di callo provenienti da colture delle varietà Thompson e Cabernet. Le piastre sono poi state incubate in cella di crescita al buio a 26-29°C e osservate ogni sette giorni per tre settimane.

Ogni esperimento, condotto con sei repliche per tesi e per varietà testata, è stato replicato tre volte e i risultati sono stati espressi come media delle repliche. Come controlli sono stati utilizzati: MS standard, MS contenente le stesse quantità di MeOH utilizzate per solubilizzare i metaboliti purificati, e infine MS contenente il substrato di accrescimento del fungo (CMY) nelle stesse percentuali testate con il filtrato colturale.

A ogni rilievo è stato registrato l'effetto della presenza del filtrato colturale o del metabolita assegnando a ogni campione un valore compreso tra 1 e 5 secondo la seguente scala (fig. 9):

- 1 = nessun imbrunimento
- 2 = superficie del tessuto leggermente imbrunita
- 3 = intero tessuto imbrunito
- 4 = tessuto molto imbrunito con ridotta crescita
- 5 = tessuto molto imbrunito con nessuna crescita.

Inizialmente è stata effettuata una prova preliminare volta a individuare la concentrazione di filtrato colturale (FC) a cui le diverse varietà saggiate manifestassero un certo imbrunimento dei tessuti (0,5, 10, 20%). Successivamente, sulla base dei risultati ottenuti, si è proceduto a osservare intervalli di concentrazioni più piccoli e differenti per le due varietà che sono risultate da subito diversamente sensibili. Per la varietà Thompson infatti, l'imbrunimento dei tessuti nella prova preliminare è stato osservato a partire dalla concentrazione 10% mentre per il Cabernet soltanto al 20%. È stato quindi deciso di approfondire l'indagine saggiando per la varietà Thompson, intervalli di concentrazione tra lo 0,5 e il 10%, mentre per il Cabernet tra il 10 e il 20%.

In linea generale si osserva come il comportamento della cv. Thompson (tab. 6) è risultato mediamente più netto rispetto alla cv. Cabernet (tab. 7). Mentre nella prima non si osservano infatti imbrunimenti di sorta alle basse concentrazioni, bensì un netto imbrunimento dei tessuti a partire dalla concentrazione 10% fino all'arresto completo della crescita nella concentrazione 20%, per la seconda si è registrato un leggero rumore di fondo presente fino alla concentrazione 10% e poi un graduale aumento del livello di imbrunimento dei tessuti che non ha mai portato tuttavia al completo arresto della crescita del callo.

Quando è stato testato lo scitalone, le due varietà non hanno evidenziato differenze di

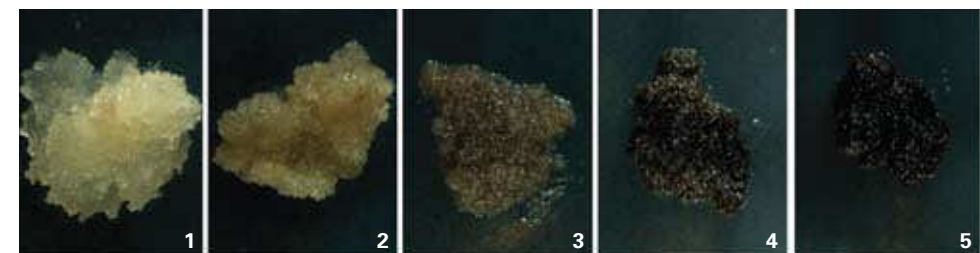


Fig. 9 - Intensità dell'imbrunimento di calli di vite secondo una scala empirica di valori da 1 a 5: 1 = nessun imbrunimento 2 = superficie del tessuto leggermente imbrunita 3 = intero tessuto imbrunito 4 = tessuto molto imbrunito con ridotta crescita 5 = tessuto molto imbrunito con nessuna crescita



**Tab. 6 - Livello di imbrunimento dei tessuti della var. Thompson trattati con il filtrato colturale (FC) di *P. aleophilum***

FC (%)	Livello di imbrunimento dei tessuti
0,5	1,0
2,5	1,0
5,0	1,0
7,5	1,7
10,0	3,8
12,5	4,3
15,0	4,5
20,0	5,0
controllo	1,0

**Tab. 7 - Livello di imbrunimento dei tessuti della var. Cabernet trattati con il filtrato colturale (FC) di *P. aleophilum***

FC (%)	Livello di imbrunimento dei tessuti
0,5	1,2
2,5	1,3
5,0	1,3
7,5	non saggiato
10,0	1,2
12,5	3,2
15,0	3,8
17,5	3,8
20,0	4,0
controllo	1,0

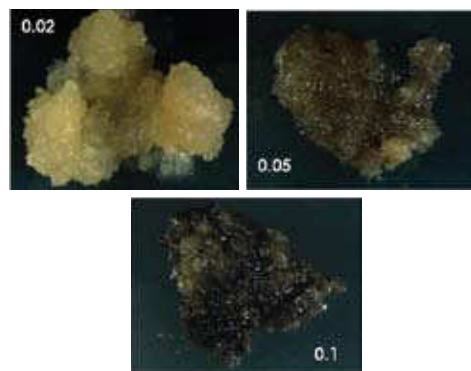
**Tab. 8 - Livello di imbrunimento dei tessuti della var. Thompson trattati con scitalone**

Scitalone (mg/ml)	Livello di imbrunimento dei tessuti
0,02	1,3
0,05	1,9
0,10	3,0
controllo	1,0



**Tab. 9 - Livello di imbrunimento dei tessuti della var. Cabernet trattati con scitalone**

Scitalone (mg/ml)	Livello di imbrunimento dei tessuti
0,02	1,2
0,05	1,7
0,10	3,4
controllo	1,0



**Tab. 10 - Livello di imbrunimento dei tessuti della var. Thompson trattati con isosclerone**

Isosclerone (mg/ml)	Livello di imbrunimento dei tessuti
0,01	1,0
0,05	1,3
0,10	3,0
controllo	1,0

comportamento (tabb. 8-9). Per entrambe, infatti, l'imbrunimento più consistente è stato registrato alla concentrazione più alta del metabolita, alla quale tuttavia, non è stata mediamente osservata né ridotta crescita del callo, né tantomeno un suo arresto.

I dati riportati in tab. 10 si riferiscono a un singolo esperimento condotto con l'isosclerone sulla sola varietà Thompson. Si può comunque osservare che, anche in questo caso, la concentrazione a cui è stato registrato un certo effetto imbrunente, è risultata essere la stessa osservata nelle prove con lo scitalone (0,1 mg/ml).

**Prove di assorbimento su foglie di vite**

Al fine di riprodurre *in vitro* la sintomatologia fogliare osservata *in planta* su piante malate di mal dell'esca, sono stati fatti assorbire, a foglioline recise da piantine micropropagate di vite della varietà Thompson, 200 µl di soluzione acquosa contenente le stesse concentrazioni di scitalone testate negli esperimenti con i calli, e il liquido colturale del fungo tal quale, concentrato 2 e 10 volte e diluito 1 volta. Le foglie, mantenute in camera di crescita a 25°C e fotoperiodo di

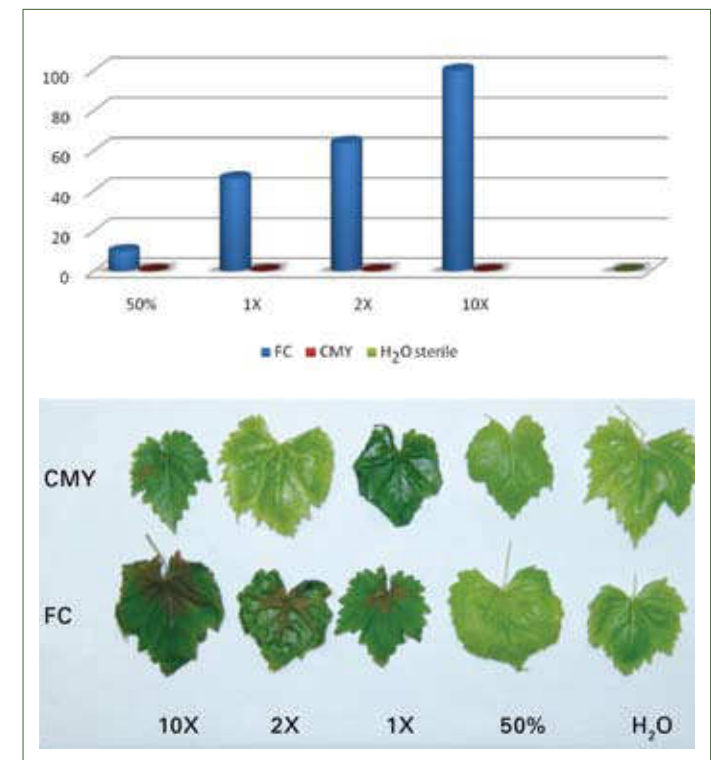


Fig. 10 - Percentuale di foglie recise da piante micropropagate che hanno presentato alterazioni dopo trattamento con il filtrato colturale di *P. aleophilum*

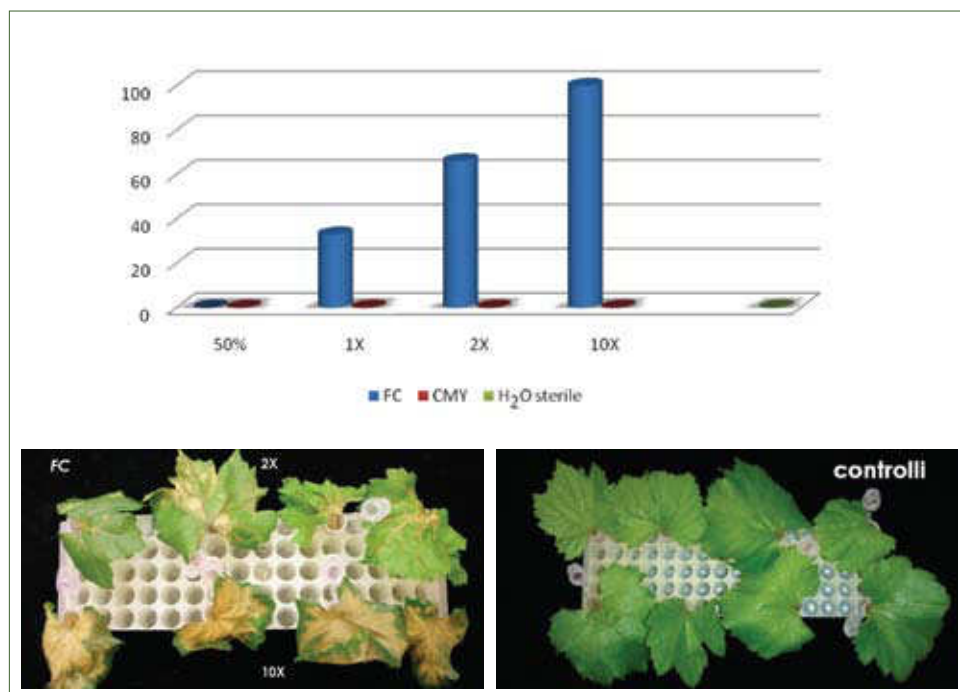


Fig. 11 - Percentuale di foglie recise da piante in vaso che hanno presentato alterazioni dopo trattamento con il filtrato culturale di *P. aleophilum*

16h, sono state osservate dopo 48 ore registrando la eventuale comparsa di macchie clorotiche e/o necrotiche sulla lamina fogliare.

Il filtrato culturale è stato inoltre saggio su foglie recise da piante di cv. Chardonnay mantenute in serra a cui è stato fatto assorbire 1 ml delle singole soluzioni.

I controlli utilizzati nei suddetti esperimenti sono stati: acqua distillata sterile, substrato CMY nelle stesse concentrazioni testate per il filtrato culturale e soluzione acquosa contenente MeOH nelle stesse quantità utilizzate per i metaboliti purificati.

I risultati ottenuti nelle prove di assorbimento del filtrato culturale da parte di foglioline micropropagate di vite e di foglie recise da piante in vaso mantenute in serra, hanno mostrato risultati comparabili (figg. 10-11). In entrambe le foglie infatti, si è registrato un collasso dei tessuti e necrosi delle aree internervali in percentuale via via crescente con l'aumentare della concentrazione del filtrato culturale presente. Alla massima concentrazione (10x) il 100% delle foglie, sia micropropagate che recise dalle piante in vaso, ha manifestato la suddetta sintomatologia; la percentuale scende intorno al 60% nella concentrazione 2x per poi diventare differente nelle due tipologie di foglia quando viene testata la concentrazione tal quale. Solo il 33% delle foglie recise dalle piante in vaso ha infatti mostrato i sintomi a tale concentrazione contro il 46% delle foglioline micropropagate. Quando il filtrato è stato diluito, il 10% delle sole foglioline micropropagate ha fatto registrare alterazioni.

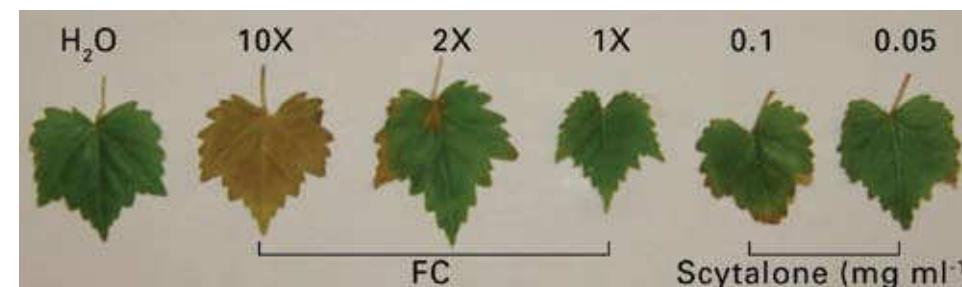


Fig. 12 - Foglie recise da piante micropropagate trattate con scitalone o con filtrato culturale

Quando è stato saggio lo scitalone (fig. 12) alla concentrazione di 0,1 mg/ml, il 50% delle foglioline micropropagate ha manifestato alterazioni al margine della lamina.

#### Infiltrazioni su foglie di tabacco

Nella pagina inferiore delle foglie di *Nicotiana bentamiana* cv. Havana, sono stati iniettati 300 µl di filtrato culturale alle stesse concentrazioni e diluizioni testate nei precedenti esperimenti. Ogni foglia è stata suddivisa ipoteticamente in quattro quadranti e ogni campione è stato iniettato su tre foglie diverse e in posizioni diverse nei quattro quadranti. Dopo 24 e 48 ore dall'infiltrazione si è provveduto all'osservazione dei risultati. Anche in questo caso i controlli sono risultati gli stessi dei precedenti esperimenti.

Le infiltrazioni sulle foglie di tabacco hanno fatto registrare la comparsa di una zona collassata sulla lamina fogliare in corrispondenza dell'alone di soluzione iniettata. Le concentrazioni 10x e 2x hanno dato esito positivo nel 100% delle infiltrazioni, mentre non si è osservata alcuna alterazione per tutte le altre concentrazioni.

#### Saggi di germinazione su semi

Al fine di verificare un'eventuale effetto fitotossico del filtrato culturale del fungo, rilevabile attraverso l'inibizione della germinazione di semi e del successivo sviluppo radicale, semi di pomodoro (cv. Red Cherry), peperone (cv. California wonder), spinacio (cv. Bloomsdale), fava (cv. Black beauty) e vite (cv. Chardonnay) sono stati messi a germinare, in presenza dei liquidi colturali di *P. aleophilum*. I semi sono stati disinfettati superficialmente, risciacquati con acqua distillata sterile e depositati in piastre Petri contenenti un disco di carta da filtro sterile imbevuto con 2 ml di filtrato culturale tal quale, concentrato 2 e 10 volte e diluito 1 volta. Ogni campione è stato costituito da 100 semi suddivisi in tre piastre. Le piastre sono state incubate in cella di crescita a 26°C e fotoperiodo di 16 ore sotto lampade fluorescenti e, trascorsi sette giorni, si è provveduto a rilevare la percentuale di germinazione e la lunghezza della radichetta emessa.

I risultati ottenuti non hanno evidenziato alcun effetto dei filtrati colturali sulla germinazione dei semi impiegati nelle prove.

**IV.2.5 Meccanismo d'azione dei metaboliti naftochinonici e degli EPSs e conclusioni**

Diversi studi hanno consentito di ipotizzare i possibili meccanismi d'azione dei metaboliti naftochinonici isolati dai funghi associati al mal dell'esca.

In particolare, la produzione di scitalone potrebbe essere messa in relazione alla colorazione bruno-nerastra che assumono le parti alterate del legno nelle viti colpite dalla malattia, nonché ai depositi di materiale bruno nei vasi legnosi (Pascoe e Cottal, 2000). In effetti, lo scitalone è un metabolita intermedio della biosintesi delle melanine (DHN-melanine) attraverso la via metabolica dei pentacetidi; l'isosclerone potrebbe invece essere accumulato nei tessuti quando subentra l'ossidazione dell'intermedio "chiave" 1,3,8-triidrossinaftalene. Come riportato infatti nello schema biosintetico (fig. 13) i diversi metaboliti naftochinonici isolati sia da *Pal* che da *Pcb* sono parte integrante di tale processo.

Le melanine sono pigmenti di natura fenolica, colorati dal marrone al nero, e a elevato peso molecolare, presenti in tessuti animali, vegetali e in microrganismi. Esse si formano in seguito a reazioni di polimerizzazione di substrati *orto*-chinonici derivanti dall'ossidazione enzimatica di fenoli. Oltre ai DHN anche la tirosina rappresenta un precursore della loro biosintesi, come tale o dopo ulteriore ossidazione a 5,6-diidrossifenilalanina (DOPA-melanina).

Questi pigmenti, la cui esatta struttura non è nota, non sembrano necessari per la vita degli organismi produttori, ma sembrano aumentarne la capacità di sopravvivenza e di competitività in particolari condizioni. Ad esempio, la localizzazione delle melanine nella parete fungina di specie produttrici (Know-Chung e Polacheck, 1982; Geis *et al.*, 1984; Dixon *et al.*, 1991) fornirebbe una maggiore resistenza verso agenti fisici come le radiazioni UV (Durrell, 1964; Butler *et al.*, 1989; Dixon *et al.*, 1991; Wang e Casadevall, 1995).

L'azione delle melanine fungine sulla virulenza sembra dovuta a diversi fattori.

In particolare Burki *et al.*, 2003, riportano che i naftochinoni sono tossici e che la loro attività è da attribuirsi alla formazione di legami covalenti (addizione di Michael 1-4) tra il chinone e i gruppi tiolici o amminici di residui amminoacidici di proteine (Oberth *et al.*, 1992). L'azione dello scitalone, del vermelone e dei metaboliti biosintetici della via del 2-HJ non sono chiari. Tra questi, lo juglone è il composto più studiato perché è altamente tossico per le piante e gli animali (Harborne, 1982). È stato osservato come lo juglone, nelle cellule fungine, sia in grado di indurre la formazione di anione superossido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> riducendo il *pool* di nucleotidi piridinici necessari alle cellule per le difese dagli stress ossidativi.

È noto che la prima risposta delle piante all'attacco di agenti fitopatogeni è la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) che porta all'attivazione degli altri meccanismi difensivi poiché i ROS fungono da molecole segnale (Wojtaszek, 1997; Mittler, 2002), attivano i processi di lignificazione e possono direttamente danneggiare l'agente patogeno (Sutherland, 1991). Tali specie che comprendono oltre l'anione superossido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) e l'acqua ossigenata (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), l'ossigeno singoletto O<sub>2</sub><sup>1</sup> e il radicale idrossilico (HO•) sono specie altamente reattive in grado di ossidare praticamente tutte le molecole biologiche causando in alcuni casi la completa distruzione ossidativa della cellula. Tra le loro principali azioni ricordiamo la perossidazione dei lipidi di membrana, l'ossidazione delle proteine, l'inibizione di enzimi e i danni al DNA o all'RNA (Wojtaszek, 1997; Mittler, 2002).

I ROS sono comunque prodotti durante lo svolgimento delle normali attività metaboliche delle cellule come la fotorespirazione, la fotosintesi e la respirazione mitocondriale, ma la loro concentrazione è costantemente mantenuta bassa dai sistemi antiossidanti della pianta come la superossido dismutasi (SOD), l'ascorbato perossidasi (APX), la catalasi (CAT) e la glutatione perossidasi (GPX), ma anche da altre molecole ad azione antiossidante come l'acido ascorbico, il glutatione, i tocoferoli e i polifenoli (Aroca *et al.*, 2002; Mittler, 2002).

Alcune piante possono anche produrre chinoni auto-ossidabili che ossidano il NAD(P)H nelle cellule della pianta con formazione di O<sub>2</sub><sup>-</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Thomson, 1971) e attivano i mec-

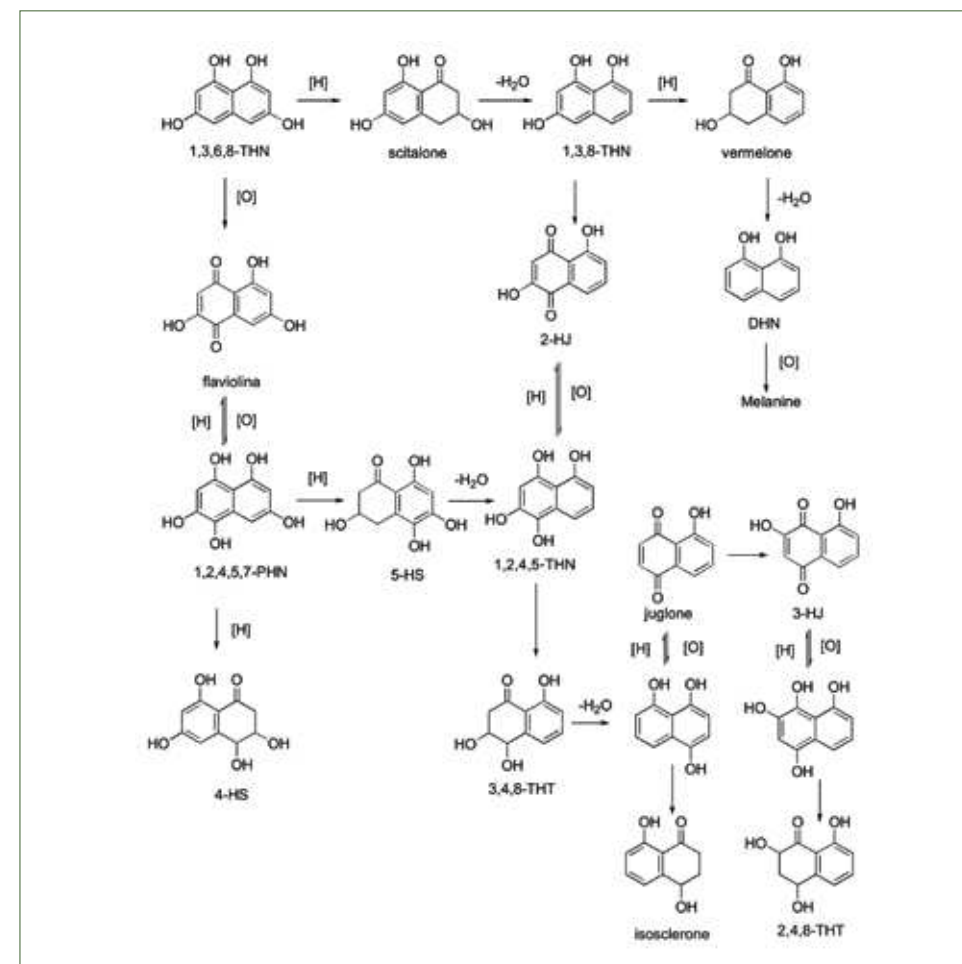


Fig. 13 - Via biosintetica delle melanine con le vie della flaviolina e 2-idrossijuglone (2-HJ). 1,3,6,8-tetraidrossinaftalene (1,3,6,8-THN); 1,3,8-triidrossinaftalene (1,3,8-THN); 1,2,4,5,7-pentaidrossinaftalene (1,2,4,5,7-PHN); 5-idrossiscitalone (5-HS); cis-4-idrossiscitalone (4-HS); 1,2,4,5-tetraidrossinaftalene (1,2,4,5-THN); 3,4,8-triidrossitetralone (3,4,8-THT); 2,4,8-triidrossitetralone (2,4,8-THT)

canismi difensivi. In risposta a tali difese i funghi fitopatogeni possono sopprimere la formazione delle specie reattive dell'ossigeno attraverso, ad esempio, la formazione di chinoni che riducendo il *pool* dei nucleotidi piridinici ridurrebbero a ridurre la formazione dei ROS sopprimendo le reazioni di difesa (Medentsev e Akimenko, 1998).

Pertanto i naftochinoni, oltre a un'azione fitotossica diretta, possono ridurre la resistenza delle piante al patogeno aumentando la virulenza di quest'ultimo.

Inoltre, la biosintesi delle melanine sembra direttamente coinvolta nei processi di colonizzazione di alcuni patogeni. Infatti, i meccanismi di penetrazione della parete cellulare della pianta ospite da parte di diversi funghi fitopatogeni è accompagnata dalla formazione di particolari strutture cellulari, gli appressori. Esse, generandosi sui tubi germinativi o sulle ife, favoriscono l'adesione del patogeno all'ospite negli stadi preliminari della colonizzazione. La biosintesi delle DHN-melanine sembra coinvolta nell'attività di tali strutture. Infatti, una loro elevata concentrazione consentirebbe, in seguito all'aumento della porosità delle membrane degli appressori, di generare una forte pressione osmotica sulla parete dell'ospite, danneggiandola. Tale attività è stata osservata, ad esempio, nell'ascomicete *Magnaporthe grisea* (De Jong *et al.*, 1997), mentre in suoi mutanti albini, non produttori di melanine, la capacità di generare un'adeguata pressione da parte degli appressori è del tutto insufficiente a consentire la colonizzazione dei tessuti dell'ospite (Howard e Ferrari, 1989).

Tali osservazioni sono anche confermate dall'effetto che inibitori della biosintesi delle DHN-melanine, come il triciclazone, ftalide, pyroquilon, hanno nell'inibire la diffusione di alcuni funghi patogeni nella pianta ospite (Wheeler e Bell, 1988).

Per quanto riguarda invece l'attività fitotossica dei metaboliti naftochinonici, diversi saggi hanno messo in evidenza la loro capacità di danneggiare in qualche misura i tessuti di vite e di riprodurre, sia pure parzialmente, i sintomi fogliari dell'esca. La situazione non è però del tutto chiara perché i dati raccolti finora sono in qualche maniera fra loro contrastanti o, comunque, non tali da spiegare efficacemente la dinamica della comparsa dei sintomi fogliari di esca e la loro fluttuazione nel tempo.

C'è innanzitutto da osservare che i risultati dei saggi effettuati nel corso del progetto hanno spesso messo in evidenza una maggiore attività dei liquidi colturali di *Pch* e *Pal* piuttosto che dei metaboliti purificati. Il riferimento è, in particolare, allo scitalone e all'isosclerone. È quindi possibile che nei liquidi colturali dei due funghi sia presente un miscuglio di metaboliti fitotossici (soprattutto, c'è da considerare la presenza di EPS) che va ad accumularsi nelle foglie di vite dove esplica il suo effetto fitotossico. D'altro canto, diversamente dalle osservazioni di Bruno *et al.* (2006a, 2006b), i tentativi effettuati per evidenziare la presenza di scitalone e di isosclerone nelle foglie di vite impiegando metodologie diverse dalla semplice HPLC, o non hanno avuto successo o hanno portato alla determinazione di concentrazioni delle due tossine davvero molto basse. È quindi possibile che scitalone e isosclerone svolgano la loro azione nel sito di produzione (imbrunimento dei vasi) piuttosto che nelle foglie, dove invece agirebbero altre sostanze. A quest'ultimo riguardo c'è infatti da rilevare che gli EPS di *Pch*, non rilevati da Bruno e coll. negli organi vegetativi della vite, vanno effettivamente ad accumularsi nelle foglie di vite così come evidenziato dai saggi immunoenzimatici svolti all'uopo (☞ capitolo V.2). Inoltre, dai dati rilevati da Bruno e coll. (2006) si rileva che la concentrazione nel pianto di tutti e quattro i tipi di metaboliti indagati (isosclerone,

scitalone, EPS e pullulani) è massima alla ripresa vegetativa (22 marzo); diminuisce poi gradualmente fino a quasi scomparire nelle settimane successive (rilievo del 12 aprile, in *tab. 2*). Invece, l'accumulo dei due pentacetidi nelle foglie e negli acini (i pullulani non sono stati rilevati né nelle foglie, né negli acini) è risultata particolarmente rilevante nelle fasi di chiusura e di maturazione del grappolo (al di sopra della soglia di tossicità). In precedenti fasi fenologiche non è stata determinata alcuna presenza di tossine nelle foglie. Sembrerebbe, dunque, che ci possano essere due fasi di trasporto dello scitalone e dell'isosclerone: una, grosso modo da metà marzo a metà aprile, ininfluenza ai fini dell'induzione dei sintomi fogliari; e un'altra, ipotetica, successiva alla prima, che sarebbe responsabile dell'accumulo delle due tossine nelle foglie e negli acini e, quindi, della comparsa dei sintomi. Tutto ciò sembra molto poco probabile. È invece più probabile, almeno alla luce dei dati raccolti nel presente progetto, che i due pentacetidi fitossici svolgano la loro azione, come detto avanti, nel sito di formazione (il legno) mentre nelle foglie (e negli acini) vadano ad accumularsi gli EPS (e forse altre sostanze ancora) i quali, al raggiungimento della soglia di fitotossicità, causano la formazione dei sintomi. Ciò potrebbe spiegare la comparsa dei sintomi estesa da giugno (in qualche caso già alla fine di maggio) ad agosto e in qualche misura anche la fluttuazione dei sintomi da un anno all'altro.

### IV.3 Monitoraggio di marcatori chimici di stress idrico in foglie di vite con sintomi di esca

L. Calamai\*, E. Zini, L. Cantalupo, C. Comparini

#### IV.3.1 Introduzione

Lo stress idrico può essere definito come il raggiungimento, all'interno della pianta, di un livello insufficiente di energia libera dell'acqua.

La deficienza di acqua nelle piante costituisce il fattore ambientale che ne limita maggiormente la crescita e, di conseguenza, la produttività (Boyer, 1982). Lo stato idrico della pianta può infatti influire sugli incrementi vegetativi con diversi meccanismi:

- l'assimilazione fotosintetica può essere limitata da uno sbilancio idrico per limitazioni che intervengono nella funzionalità degli stomi;
- lo stress idrico può influire sul turgore cellulare e può di conseguenza limitare l'espansione fogliare e indurre fenomeni di plasmolisi e necrosi fogliare;
- lo stress idrico può modificare il trasporto degli assimilati nei diversi organi.

Le piante nel corso della loro evoluzione hanno sviluppato diversi meccanismi per fronteggiare situazioni di stress. Il principale meccanismo che consente di mantenere un normale potenziale di pressione delle cellule è l'aumento della concentrazione di soluti. Studi effettuati in diversi laboratori hanno evidenziato nelle foglie un accumulo di zuccheri solubili che abbassano il potenziale osmotico del succo cellulare e perciò prevengono la fuoriuscita dell'acqua dalla cellula (Stewart *et al.*, 1966; Storey e Wyn-Jones, 1977).

La tolleranza allo stress idrico è stata anche associata a variazioni di altri parametri come, ad esempio, il livello di acido abscissico (ABA) (Maldonado *et al.*, 1997). La concentrazione di ABA, in foglie di vite, generalmente aumenta in dipendenza di un incremento della resistenza stomatica e di una corrispondente diminuzione del potenziale idrico fogliare (Stewart, 1971; Smart *et al.*, 1983). Anche il contenuto di aminoacidi varia in condizioni di stress. La sintesi proteica, rallentata da azione di stress, può determinare una accelerazione della demolizione proteica con conseguente arricchimento di aminoacidi liberi e di amidi. Come caratteristica di un ricambio proteico alterato da stress si hanno variazioni nei rapporti tra i singoli aminoacidi, in particolare un enorme incremento nella concentrazione di prolina (Larcher W., 1993).

In questa parte del lavoro di ricerca sono stati analizzati il contenuto di glucosio, fruttosio, saccarosio, amido, ABA, e aminoacidi in foglie di vite colpite dal mal dell'esca della vite. Un elevato contenuto di questi fattori rappresenta un valido indicatore per rilevare uno stato di sofferenza idrica delle piante. Scopi dell'indagine sono stati: 1. indagare sulla eventuale differenza in questi parametri tra piante sane, che non hanno mai manifestato sintomi, e piante malate e sintomatiche al momento del prelievo; 2. verificare la variazione del contenuto di

questi fattori in relazione allo sviluppo dei sintomi. In pratica, si è voluto verificare l'ipotesi che lo sviluppo dei sintomi fogliari sia correlato a uno stato di stress idrico associato/aggravato dall'azione di sostanze fitotossiche, prodotte dai funghi responsabili del mal dell'esca.

#### IV.3.2 Materiali e metodi

Nelle prove sono state impiegate foglie della cv. Cabernet Sauvignon prelevate da piante naturalmente infette, allevate in vaso o in campo.

In particolare sono state utilizzate:

- piante in vaso (prelievo delle foglie il 13 luglio 2005);
- foglie con sintomi visibili (escluso porzione necrotica e incluso porzioni con alterazioni del colore);
- foglie di piante malate ma asintomatiche;
- piante in campo (prelievo delle foglie il 20 maggio e il 17 luglio 2005);
- foglie con sintomi visibili (escluso porzione necrotica e incluso porzioni con alterazioni del colore);
- foglie di piante malate ma asintomatiche nel 2005.

Tab. 1 - Dettaglio delle foglie prelevate nel mese di luglio

Località	Stato fitosanitario al momento del prelievo	Sigla del campione*	Località	Stato fitosanitario al momento del prelievo	Sigla del campione*
Sesto F.no	asintomatica	P30F1	Az. Montepaldi	asintomatica	F8P13-1
Sesto F.no	asintomatica	P30F2	Az. Montepaldi	asintomatica	F8P13-3
Sesto F.no	asintomatica	P30F3	Az. Montepaldi	asintomatica	F8P13-4
Sesto F.no	asintomatica	P30F5	Az. Montepaldi	asintomatica	F8P13-5
Sesto F.no	asintomatica	P30F4	Az. Montepaldi	asintomatica	F1P11-1
Sesto F.no	malata	P23F1	Az. Montepaldi	asintomatica	F1P11-2
Sesto F.no	malata	P23F2	Az. Montepaldi	asintomatica	F1P11-3
Sesto F.no	malata	P23F3	Az. Montepaldi	asintomatica	F1P11-4
Sesto F.no	malata	P23F4	Az. Montepaldi	asintomatica	F1P11-5
Sesto F.no	malata	P23F5	Az. Montepaldi	malata	F1P13-1
Sesto F.no	asintomatica	P11F1	Az. Montepaldi	malata	F1P13-2
Sesto F.no	asintomatica	P11F3	Az. Montepaldi	malata	F1P13-3
Sesto F.no	asintomatica	P11F2	Az. Montepaldi	malata	F1P13-4
Sesto F.no	malata	P29F4	Az. Montepaldi	malata	F1P13-5
Sesto F.no	malata	P29F5	Az. Montepaldi	malata	F8P8-5
Sesto F.no	malata	P29F3	Az. Montepaldi	malata	F8P8-4
Sesto F.no	malata	P29F2	Az. Montepaldi	malata	F8P8-3
Sesto F.no	malata	P29F1	Az. Montepaldi	malata	F8P8-2
			Az. Montepaldi	malata	F8P8-1

\* Università di Firenze email: luca.calamai@unifi.it

Prove orientative, effettuate nel mese di maggio del 2005, hanno invece riguardato esclusivamente materiale di campo prelevato da piante che dal 2003 non avevano mai manifestato i sintomi della malattia. Questa prima indagine ha avuto lo scopo di conoscere il contenuto di zuccheri e aminoacidi liberi all'inizio della stagione vegetativa prima di un'eventuale manifestazione sintomatica, e ha permesso di perfezionare la messa a punto della metodologia utilizzata.

Le prove effettuate su foglie raccolte nel mese di luglio sono state condotte sia su foglie malate (sintomatiche), che su foglie sane (asintomatiche); queste ultime sono state utilizzate come controllo. Il vigneto considerato è stato il vigneto sperimentale n. 19 dell'Azienda agricola di Montepaldi (San Casciano in Val di Pesa, FI); le piante in vaso sono state allestite presso il Dipartimento di Ortoflorofruitticoltura del Polo Scientifico e Tecnologico di Sesto Fiorentino (FI).

In maggio sono state prelevate 16 foglie da 4 piante diverse (4 foglie per pianta da due tralci: la terza e la quarta foglia di ciascun tralcio considerato). In luglio le foglie prelevate sono state 37: 19 dal campo (9 da piante sintomatiche e 10 da piante asintomatiche) e 18 dalle piante in vaso (8 da piante sintomatiche e 10 da piante asintomatiche) (tab. 1).

**IV.3.3 Risultati**

**Zuccheri solubili**

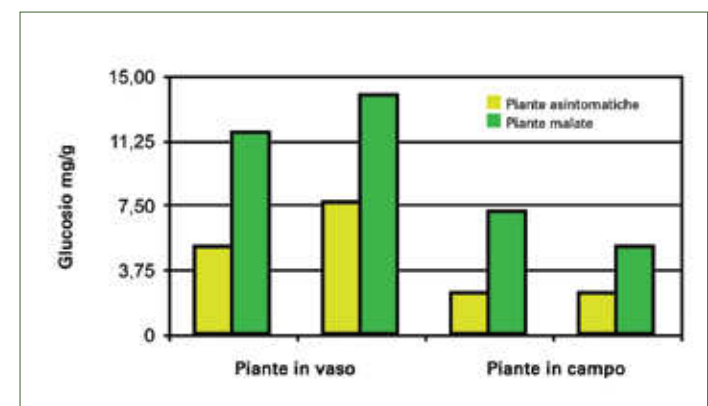
Nella tab. 2 sono riportati i risultati delle determinazioni sulla concentrazione di zuccheri solubili nelle foglie prelevate in maggio da piante presumibilmente sane (asintomatiche).

Dai valori riportati in tab. 2 si rileva una consistente variabilità nel contenuto in glucosio nelle foglie di piante diverse; tale contenuto varia infatti circa da ca. 6,3 a ca. 11 mg/g. Il contenuto di fruttosio e di saccarosio sono invece risultati più costanti. Infatti, il fruttosio è variato circa fra 2,4 e 3 mg/g, mentre i valori limite del saccarosio sono oscillati circa tra 13,7 e 16 mg/g.

**Tab. 3 - Medie dei valori del contenuto di glucosio e fruttosio in foglie di vite, prelevate nel mese di luglio 2004**

Campione	Glucosio (mg/g)		Campione	Fruttosio (mg/g)	
	Pianta malata asintomatica	Pianta sintomatica		Pianta malata asintomatica	Pianta sintomatica
<b>Sesto F.no</b>			<b>Sesto F.no</b>		
P30	5,225357		P30	2,401231	
P11	7,827658		P11	6,018485	
P23		11,949504	P23		7,4241684
P29		13,995788	P29		10,682481
Media	6,5265075	12,972646	Media	4,209858	9,0533245
<b>Montepaldi</b>			<b>Montepaldi</b>		
F8P13	2,6113		F8P13	0,684527	
F1P11	2,623563		F1P11	0,745555	
F1P13		7,3514871	F1P13		3,3504285
F8P8		5,308825	F8P8		2,9950075
Media	2,6174315	6,330156	Media	0,7150625	3,172718

Fig. 1 - Medie dei valori del contenuto di glucosio in foglie di vite di piante malate asintomatiche e di piante sintomatiche in campo (Montepaldi, San Casciano V.P.) e in vaso (Sesto F.no), prelevate nel mese di luglio



Nella tab. 3 e nelle figg. 1-2 si riportano le concentrazioni di zuccheri solubili (glucosio e fruttosio) nelle foglie raccolte in luglio da piante sane e malate, in campo e allevate in vaso.

Dai due grafici si può evincere come le piante malate, sia quelle in campo sia quelle in vaso, presentino, in un'annata in cui manifestano i sintomi fogliari, un maggior contenuto di questi due monosaccaridi, più che doppi rispetto ai valori riscontrati nelle foglie di piante malate ma asintomatiche nell'anno considerato. C'è da rilevare che un accumulo fogliare di zuccheri solubili abbassa il potenziale osmotico del succo cellulare e perciò previene la fuoriuscita dell'acqua dalla cellula (Stewart *et al.*, 1966; Storey e Wyn-Jones, 1977). Questo meccanismo costituisce una risposta adattativa a modificazioni restrittive al libero movimento dell'acqua nei vasi conduttori del legno, frutto dell'ostruzione fisica al passaggio dell'acqua indotta dalla malattia. La consistenza del fluido xilematico è infatti alterata.

**Tab. 2 - Contenuto in zuccheri solubili (mg/g di peso fresco) in foglie prelevate in campo da tralci diversi (A, B) di 4 viti presumibilmente sane (P1, P9, P4 e PX) (Montepaldi, San Casciano V.P.), nel mese di maggio**

Foglia	Glucosio	Fruttosio	Saccarosio	Foglia	Glucosio	Fruttosio	Saccarosio
P1AF3	6,57464	2,54525	16,87141	P4BF4	5,7115	2,43147	12,60239
P1AF4	4,34258	1,96371	19,83582	P4BF3	7,1578	2,90208	15,24483
P1BF3	8,18588	2,70679	11,96722	P4AF3	10,88819	3,53302	12,52664
P1BF4	6,31094	2,6249	15,71384	P4AF4	6,98576	2,53823	14,59961
Media	6,35351	2,46016	16,09707	Media	7,685811	2,8512016	13,74337
P9AF4	5,49947	1,99718	12,53828	PX1AF3	8,75728	3,25868	16,35601
P9BF4	8,03547	2,76567	16,38217	PX1AF4	7,32603	2,46961	14,0312
P9AF3	6,70553	2,25594	15,3517	PX1BF4	8,16501	3,58754	12,98035
P9BF3	7,28505	2,66904	12,96012	PX1BF3	8,16246	3,01902	12,19193
Media	6,88138	2,4219588	14,308069	Media	8,1026939	3,0837144	13,889871
<b>Media totale</b>					7,2558485	2,7042585	14,509595

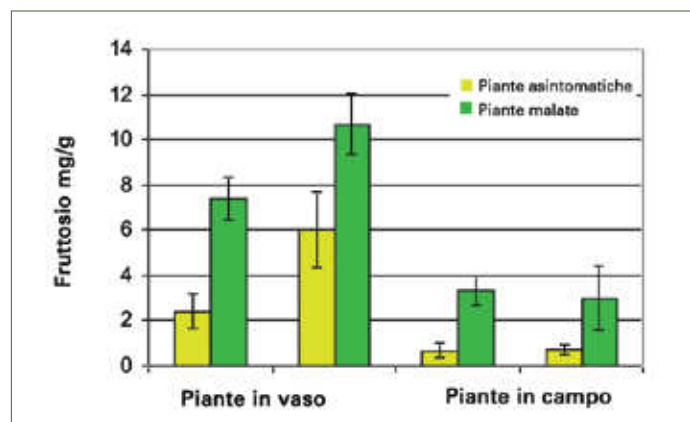


Fig. 2 - Medie dei valori del contenuto di fruttosio in foglie di vite di piante malate asintomatiche e di piante sintomatiche in campo (Montepaldi, San Casciano V.P.) e in vaso (Sesto F.no), prelevate nel mese di luglio

Questi risultati concordano con quelli di altri lavori effettuati su piante di *V. vinifera* Sylvaner, affette dalla malattia di Pierce. Sia il contenuto di glucosio che di fruttosio è stato visto aumentare nelle piante affette da questa sindrome che, come nel mal dell'esca, è causa di una limitazione xilematica.

Se il maggior contenuto di soluti registrato nelle piante malate può essere considerato un valido indicatore dello stato di deperimento della pianta allora possiamo ipotizzare che le piante in vaso risultino più "stressate" di quelle in campo. Questo risultato potrebbe essere dovuto a una situazione di sofferenza accumulata da queste in seguito al trasferimento in vaso avvenuto nell'anno 2003.

Diversi i risultati relativi al contenuto in saccarosio (fig. 3, tab. 4).

Nelle piante il saccarosio è una tipica forma di trasporto: le sostanze organiche prodotte dalla fotosintesi delle foglie vengono in gran parte trasformate in saccarosio per essere trasportate agli altri organi non fotosintetici. Il contenuto fogliare di saccarosio delle piante asintomatiche, soprattutto di quelle in vaso, risulta maggiore di quello delle piante sintomatiche. Poi-

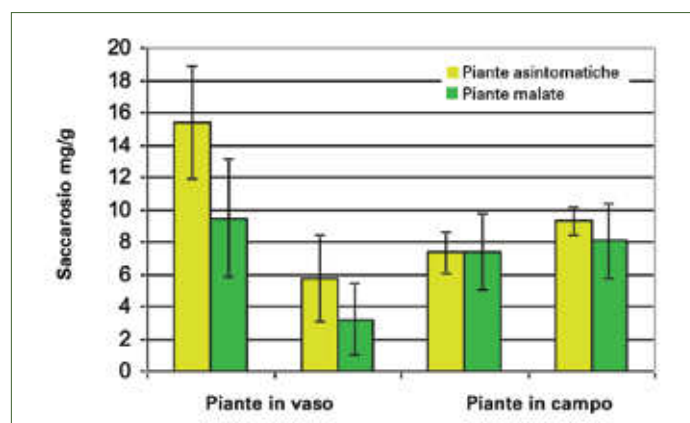


Fig. 3 - Medie dei valori del contenuto di saccarosio in foglie di vite di piante malate asintomatiche e di piante sintomatiche in campo (Montepaldi, San Casciano V.P.) e in vaso (Sesto F.no), prelevate nel mese di luglio

Campione	Saccarosio (mg/g)		Campione	Amido (mg/g)	
	Pianta malata asintomatica	Pianta sintomatica		Pianta malata asintomatica	Pianta sintomatica
<b>Sesto F.no</b>			<b>Sesto F.no</b>		
P30	15,38544		P30	23,10166	
P11	5,748965		P11	38,19696	
P23		9,484495	P23		8,68793
P29		3,212376	P29		8,70174
Media	10,567202	6,3484355	Media	30,64931	8,69483
<b>Montepaldi</b>			<b>Montepaldi</b>		
F8P13	7,368955		F8P13	3,65368	
F1P11	9,289561		F1P11	3,68031	
F1P13		7,399902	F1P13		1,32074
F8P8		8,056898	F8P8		2,25038
Media	8,329258	7,7284	Media	3,66699	1,78556

ché il saccarosio è il principale zucchero traslocato nelle piante e quindi la forma di carbonio maggiormente importata dai tessuti non fotosintetici è ritenuto il vero "substrato zucchero" per la respirazione nelle piante. Una probabile spiegazione del minor contenuto di saccarosio potrebbe derivare da una maggiore richiesta di energia da parte delle piante malate. Il classico sintomo da senescenza che caratterizza il mal dell'esca della vite è un processo metabolico attivo, ovvero richiede energia. L'energia richiesta dalla pianta deriva dalla respirazione mediante la trasformazione del saccarosio. Il minor contenuto di saccarosio riscontrato nelle piante malate si traduce in una maggiore quantità di glucosio e fruttosio, come osservato dalle tabelle e dai grafici precedenti.

**Amido in foglie di vite, in luglio**

Come si può osservare dalla fig. 4 e dalla tab. 4, i valori delle medie del contenuto d'amido fogliare delle piante asintomatiche in vaso sono più che quadrupli rispetto agli stessi valori presentati dalle piante sintomatiche. Questa situazione potrebbe essere la conseguenza di un rallentamento delle funzioni fotosintetizzanti generato dall'alterata funzionalità dell'apparato xilematico; ne deriverebbe una diminuzione, se non la completa interruzione, nell'accumulo di questo zucchero. L'amido rappresenta, infatti, il principale zucchero di riserva presente in quasi tutte le piante. Dalla fig. 4 si evince come la concentrazione di amido, delle piante in vaso, sia strettamente legata alla manifestazione dei sintomi della malattia.

*Pcb* e *Pal* sono inoltre buoni produttori di complessi enzimatici in grado di degradare i costituenti del legno. In effetti, i polisaccaridi della parete cellulare e quelli di riserva accumulati nelle cellule dei raggi midollari (amido) sono idrolizzati facilmente da questi ifomiceti (Chiarappa, 1959; Mugnai *et al.*, 1996a; 1999).

Le ipotesi qui formulate sono confermate anche dai valori ottenuti dalle piante in cam-

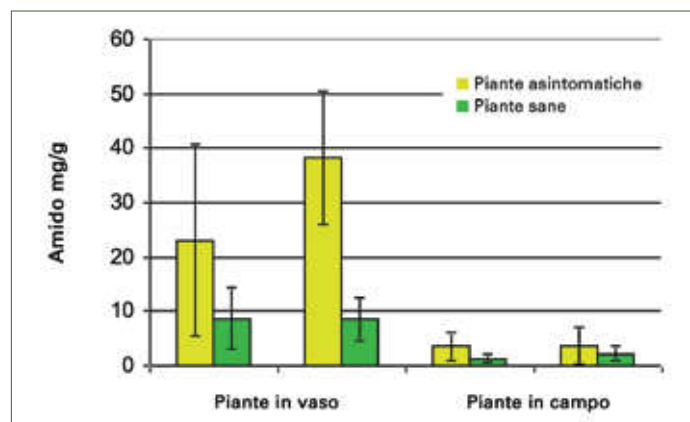


Fig. 4 - Medie dei valori del contenuto di amido in foglie di vite di piante malate, ma asintomatiche, e di piante sintomatiche in campo (Montepaldi, San Casciano V.P.) e in vaso (Sesto F.no), prelevate nel mese di luglio

po. Dalla *fig. 4* si evince come la concentrazione di amido, delle piante in vaso, sia strettamente legata alla manifestazione dei sintomi della malattia. Possiamo osservare infatti che gli istogrammi rappresentanti le piante asintomatiche in campo superano, anche se di poco, quelli associati alle sintomatiche.

**Acido abscissico nelle foglie raccolte in luglio**

L'acido abscissico è un ormone vegetale presente in tutte le piante superiori, molto efficace nel causare la chiusura degli stomi. L'ABA è stato determinato, all'interno della pianta, in ogni organo principale o tessuto vivente, dall'apice della radice a quello del germoglio (*tab. 5*). Il metabolismo dell'ABA è particolarmente interessante poiché le concentrazioni di questo ormone possono fluttuare notevolmente in tessuti specifici durante lo sviluppo o in risposta al cambiamento delle condizioni ambientali. In condizioni di stress idrico il contenuto di ABA nelle foglie può aumentare di 50 volte nell'arco delle 4-8 ore e nello stesso lasso di tempo può tornare a livelli normali a seguito di reidratazione dei tessuti. Questo è il cambiamento più drastico riportato per la concentrazione di un ormone in risposta a un segnale ambientale (Taiz e Zeiger, 2002). L'accumulo di ABA nelle foglie sotto stress gioca un ruolo importante nella riduzione della perdita dell'acqua dovuta alla traspirazione in condizioni di stress idrico. L'ABA regola il turgore non solo diminuendo la traspirazione ma anche aumentando il flusso di acqua dentro le radici (Glinka e Rein-

Tab. 5 - Medie dei valori del contenuto di ABA in foglie di vite, prelevate in luglio		
Campione	ABA (µg/g)	
	Pianta malata asintomatica	Pianta sintomatica
<b>Sesto F.no</b>		
P30	0,55286	
P11	0,84291	
P23		1,25361
P29		2,63805
Media	0,69788	1,94583
<b>Montepaldi</b>		
F8P13	0,06986	
F1P11	0,06643	
F1P13		0,10040
F8P8		0,06003
Media	0,06814	0,08021

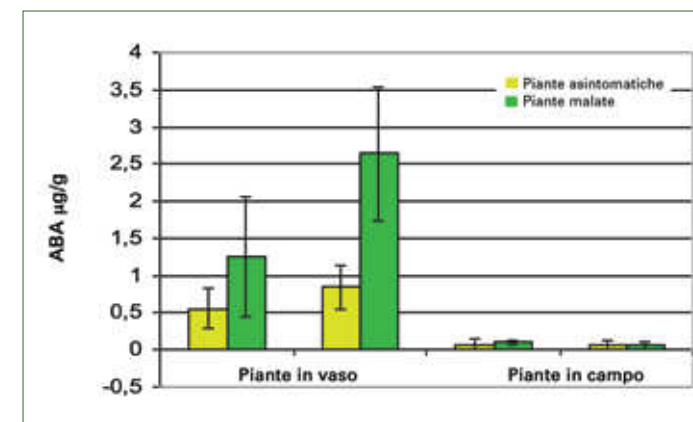


Fig. 5 - Medie dei valori del contenuto di ABA in foglie di vite di piante malate, ma asintomatiche, e di piante sintomatiche in campo (Montepaldi, San Casciano V.P.) e in vaso (Sesto F.no), prelevate nel mese di luglio

hold, 1971). L'ABA promuove inoltre la senescenza fogliare; può indirettamente aumentare la formazione di etilene e stimolare l'abscissione.

Dalla *tab. 5* e dalla *fig. 5* possiamo osservare come il contenuto di questo ormone sia particolarmente elevato nelle piante sintomatiche. Questo risultato lo si ritrova però soltanto per le piante in vaso; le piante in campo non mostrano sostanziali differenze nel contenuto tra le malate (sintomatiche) e quelle sane (asintomatiche). Questo risultato potrebbe essere dovuto alla produzione di ABA precedente alla comparsa dei sintomi nelle piante in vaso; queste infatti come già detto potrebbero aver risentito della condizione di stress da trapianto e di conseguenza essere state tutte, sia malate che sane, in condizioni fisiologiche favorevoli alla produzione di ABA. Altre ipotesi potrebbero essere investigate sul significato della maggiore quantità di ABA riscontrate nelle piante affette dal mal dell'esca della vite, poiché è stato provato che numerosi generi di funghi producono l'ABA come metabolita secondario (Zeevaert e Creelman, 1988). Inoltre, l'aumento della concentrazione fogliare di ABA è stato dimostrato essere stimolato dall'avvizzimento fogliare (Pierce e Raschke, 1981).

**IV.3.4 Conclusioni**

I rilievi effettuati nel 2005 sono stati ripetuti nel 2006 e, in parte, nel 2007, con risultati analoghi. Questi risultati e quelli qui riportati, considerati nel loro insieme, e sia pure con le limitazioni derivanti dalla ampia variabilità delle misurazioni effettuate, permettono di ricavare alcune indicazioni di carattere generale:

1. tra le piante in vaso e quelle in campo ci sono significative differenze nelle misurazioni con variazioni più ampie nelle piante in vaso rispetto alle piante in campo (*tab. 6*);
2. nelle piante sintomatiche il contenuto in fruttosio e in glucosio tende ad aumentare mentre tende a diminuire quello del saccarosio;
3. diminuisce il contenuto in amido nelle foglie di piante sintomatiche;
4. il contenuto in acido abscissico sembra aumentare nelle foglie di piante sintomatiche. Scaturisce, dai dati rilevati e dalle valutazioni conseguenti, che le piante ammalate di



**Tab. 6 - Intervalli dei valori (mg/g di tessuto) di glucosio, fruttosio e saccarosio misurati in piante in diverso stato fitosanitario**

Tipo di pianta rilevata	Glucosio (mg/g)	Fruttosio (mg/g)	Saccarosio (mg/g)
Pianta presumibilmente sana (rilievo in maggio)	4,3-10,89	1,96-3,59	11,97-19,83
Pianta malata di esca, ma asintomatica nell'anno del rilievo			
• Sesto F.no	5,22-7,82	2,40-6,01	5,74-15,38
• Montepaldi	2,61-2,62	0,68-0,74	7,37- 9,29
Pianta malata di esca e sintomatica nell'anno del rilievo			
• Sesto F.no	11,94-13,99	7,40-10,68	3,21-9,48
• Montepaldi	5,31-7,35	2,99-3,35	7,40-8,06

**Tab. 7 - Contenuto in zuccheri, amido e ABA raffrontato allo stato sanitario di alcune delle piante utilizzate nei saggi**

Pianta	Stato sanitario	Glucosio (mg/g)	Fruttosio (mg/g)	Saccarosio (mg/g)	Amido (mg/g)	ABA (µg/g)
P30	sempre sana	5,22	2,40	15,39	23,10	0,55
P11	sintomatica dopo 1-9 giorni	7,83	6,02	5,75	38,19	0,84
P23	sintomatica già da 1-9 giorni	11,95	7,42	9,48	8,69	1,25
P29	sintomatica già da 1-9 giorni	13,99	10,68	3,21	8,70	2,64

Valori presumibilmente normali determinati in foglie prelevate in campo (Montepaldi) in maggio: glucosio: 8,285; fruttosio: 2,703; saccarosio: 14,505.

esca e sintomatiche soffrono una sorta di stress esemplificato dall'aumento del contenuto in ABA, dall'aumento di glucosio e fruttosio, proveniente da una demolizione del saccarosio, e dalla diminuzione del saccarosio (segnale di ridotta fotosintesi e di parziale degradazione di quello accumulato/prodotto) e dell'amido (segnale di ridotta attività fotosintetica). È anche interessante rilevare, dai dati elaborati in *tab. 7*, che le variazioni del glucosio, fruttosio, saccarosio, amido e ABA aumentano, dalla pianta sana (P30) alla pianta che già manifestava i sintomi da qualche giorno prima delle analisi (P23 e P29). Ciò va ad avvalorare l'ipotesi di un accumulo progressivo di sostanze tossiche nelle foglie.

Infine, per quanto riguarda l'esistenza di uno stato di stress idrico nelle piante, altri gruppi hanno potuto accertare che tale ipotesi, in realtà, non sussiste nelle piante ammalate di esca che vanno manifestando i sintomi fogliari. Ciò significa che il presunto stress idrico esemplificato dai parametri rilevati è da attribuirsi ad altre cause, al momento non chiaramente identificabili.

## IV.4 Alterazioni degli scambi gassosi causati dal mal dell'esca

### IV.4.1 Misurazioni su foglia singola e sull'intera chioma di piante di vite in vaso

G.B. Mattii\*, E. Bardi, C. Calabrese, A. Giorgini

#### Introduzione

I sintomi fogliari dell'esca sono caratterizzati, essenzialmente, da clorosi e da necrosi dei tessuti. Dunque, verosimilmente, da una riduzione del contenuto in clorofilla (quindi, alterazione della fotosintesi) e da morte cellulare.

Studi sulla fotosintesi sono stati svolti fra il 2003 e il 2005 da Petit *et al.* (2006) in Francia. Il gruppo di ricercatori ha rilevato i seguenti parametri: fotosintesi netta (Pn); conduttanza stomatica (gs); concentrazione di CO<sub>2</sub> intercellulare (ci); tasso di traspirazione (E); concentrazione della clorofilla e dei carotenoidi (P); concentrazione dei carboidrati (C). Il materiale utilizzato per le misurazioni è stato il seguente: foglie asintomatiche su piante che non avevano mai manifestato sintomi di esca (foglie di controllo) (FC); foglie su tralci asintomatici di piante sintomatiche (FAS); foglie asintomatiche su tralci sintomatici (FS); porzione ancora verde di foglie sintomatiche (VS); porzione clorotica di foglie sintomatiche (GS). I risultati ottenuti da Petit *et al.* (2006) sono riassunti in forma semplificata nella *tab. 1*.

Petit *et al.* (2006) hanno dunque rilevato parametri alterati degli scambi gassosi essenzialmente nelle foglie sintomatiche (porzione verde e clorotica) e, occasionalmente, o in maniera non significativa, nelle foglie asintomatiche di tralci con foglie sintomatiche.

Per quanto riguarda le misurazioni di fluorescenza della clorofilla (dato esemplificativo della intensità della fotosintesi) una diminuzione significativa è stata rilevata solo nella porzione gialla di foglie sintomatiche.

**Tab. 1 - Scambi gassosi rilevati in varie tipologie di foglie di vite\***

Tesi	Fotosintesi netta (Pn)	Conduttanza stomatica (gs)	Concentrazione di CO <sub>2</sub> intercellulare (ci)	Tasso di traspirazione (E)
FC	normale	normale	normale	normale
FAS	normale	normale	normale	normale
FS	diminuzione (-)** diminuzione (settembre) (-)	normale (agosto)	normale	normale
VS	diminuzione (- -)	diminuzione (- -)	aumento	diminuzione (- -)
GS	diminuzione (- - -)	diminuzione (- - -)	aumento	diminuzione (- -)

\* Fonte: Petit *et al.*, 2006. \*\* Il numero di segni negativi, fra parentesi, è indicativo dell'intensità della diminuzione.

\* Università di Firenze email: gbmattii@unifi.it

La concentrazione totale di clorofilla nelle foglie delle piante di controllo è risultata di  $2,50 \pm 0,21$  mg/g di peso fresco. Nelle foglie asintomatiche di tralci asintomatici o sintomatici non è stata osservata alcuna riduzione significativa. Invece, riduzioni significative sono state rilevate nelle foglie sintomatiche: -30% nelle porzioni ancora verdi e -90% nelle porzioni gialle. Di rilievo il fatto che il rapporto delle clorofille *a/b* ( $2,22 \pm 0,10$ ) era pressoché uguale in tutte le tesi. Anche il contenuto in carotenoidi ( $0,12 \pm 0,09$  mg/g di peso fresco) è apparso uguale in tutte le tesi.

Infine, il contenuto in carboidrati nei tralci. Questa misurazione è stata effettuata nel mese di gennaio degli anni 2004 e 2005. Nei tralci di controllo il contenuto in amido e in carboidrati solubili è risultato, rispettivamente di  $8,23 \pm 1,26$  mg/g di peso secco e di  $49,37 \pm 12,66$  mg/g di peso secco. Al contrario, sia nei tralci sintomatici sia in quelli asintomatici di piante sintomatiche il contenuto in amido è diminuito di oltre il 50%; invece, il contenuto in carboidrati solubili non ha subito variazioni significative.

Le conclusioni che Petit e collaboratori hanno ricavato dalle loro indagini possono così riassumersi:

- l'alterazione della fotosintesi potrebbe determinare perturbazioni nella quantità di carboidrati accumulati dalla pianta;
- la diminuzione nella quantità di CO<sub>2</sub> assimilata potrebbe determinare una minore sintesi di carboidrati e un minore esporto verso organi di riserva (ad esempio, minore accumulo di zuccheri negli acini);
- la contemporanea riduzione della fotosintesi netta e della conduttanza stomatica nelle foglie sintomatiche sembra suggerire l'esistenza di un generalizzato stato di stress idrico nella pianta;
- oppure, la clorosi fogliare e la chiusura degli stomi potrebbero essere causati dall'attività di fitotossine prodotte dai funghi dell'esca, liberate nei vasi e traslocate nelle foglie;
- parallelamente alla diminuzione di CO<sub>2</sub> assimilata e alla chiusura degli stomi, la concentrazione di CO<sub>2</sub> intercellulare aumenta sia nelle porzioni verdi sia in quelle gialle di foglie sintomatiche. Ciò potrebbe significare che la diminuzione di CO<sub>2</sub> fissata possa anche essere stata determinata da processi interni alle foglie considerate: ad esempio, una diminuita attività di uno o più degli enzimi della fotosintesi (*tuttavia, anche l'alterazione di questi processi dovrebbe avere una causa scatenante: fitossine piuttosto che stress idrico*);
- nella diminuzione della fotosintesi netta potrebbe essere coinvolta anche l'intensità della fotosintesi rilevata attraverso misurazioni di fluorescenza: alla base della diminuita fluorescenza potrebbe esserci una *down regulation* della fotosintesi;
- poiché il contenuto totale di clorofilla è diminuito nelle foglie sintomatiche e poiché il rapporto fra le clorofille *a* e *b* è apparso uguale nelle foglie sintomatiche e in quelle di controllo, entrambe le clorofille dovrebbero essere state danneggiate nelle foglie sintomatiche;
- il contenuto in carotenoidi non è diminuito nelle foglie sintomatiche. Ciò significa che questi pigmenti continuano a svolgere nelle foglie asintomatiche di piante con foglie sintomatiche un effetto protettivo sulle membrane cellulari contro l'azione di funghi patogeni;
- l'intensità delle alterazioni degli scambi gassosi è apparso correlato allo stadio della malattia poiché è stata osservata una gradualità nella distruzione dell'apparato fotosintetico da parte dell'esca: dalle foglie di controllo alle porzioni gialle di foglie sintomatiche con le

fasi intermedie rappresentate dalle foglie asintomatiche su tralci asintomatici e sintomatici di piante sintomatiche incluso le porzioni verdi di foglie sintomatiche (*gli autori, tuttavia, non quantificano, in termini temporali, la gradualità delle alterazioni*);

- la diminuita fotosintesi si è accompagnata a una diminuzione dei carboidrati di riserva. Nella vite i primi atti vegetativi (dalla schiusura delle gemme alla fioritura) sono sostenuti dai carboidrati accumulati negli organi perenni (tralci e radici) nell'anno precedente, soprattutto dalla fioritura (quando le foglie possono considerarsi mature) ai primi segni di senescenza fogliare. Ne consegue che un minore accumulo di carboidrati di riserva (in questo caso dell'amido) può influire negativamente, nell'anno seguente, sullo sviluppo degli organi annuali, in particolare delle infiorescenze, molto sensibili alla quantità di zuccheri disponibile;
- l'accumulo di amido è apparso minore sia nei tralci sintomatici sia in quelli asintomatici (qui la fotosintesi non è diminuita). Ciò significa che l'amido prodotto nei tralci asintomatici di piante sintomatiche si ridistribuisce in tutta la pianta e che, quindi, i tralci asintomatici possono contribuire a ridurre gli effetti negativi dell'esca. Tuttavia, il più basso contenuto di amido si rifletterebbe comunque negativamente sulle prestazioni della pianta l'anno successivo a quello in cui si manifestano i sintomi. Con altre parole, la forma fogliare dell'esca è deleteria per la pianta non solo nell'anno in cui si manifesta ma anche in quello successivo.

Allo scopo di verificare ed estendere i risultati ottenuti da Petit *et al.* (2006) sono state effettuate ulteriori osservazioni su piante di vite ammalate di esca e trasferite dal campo in vaso. Di seguito sono riportati i principali risultati ottenuti.

## Materiali e metodi

Per studiare gli effetti sulla pianta del mal dell'esca, sono state scelte, fra il gruppo di piante Cabernet Sauvignon in vaso, a Sesto Fiorentino (☞ capitolo IV.7a), 8 piante malate di esca, di cui 4 sintomatiche e 4 asintomatiche. All'interno di ciascun vaso è stato posizionato, alla profondità di circa 20 cm, un sensore di umidità (Decagon ECH<sub>2</sub>O) per rilevare il contenuto di acqua nel terreno. Quest'ultimo parametro è stato determinato anche per via gravimetrica (differenza di peso di campioni essiccati in stufa a 105°C per 2 giorni).

Su un primo gruppo di 4 piante (P26, P27, P35 e P36) (di cui 2 con sintomi e 2 asintomatiche) è stata misurata la fotosintesi dell'intera chioma con il sistema del "tree enclosure" (fig. 1). Sul secondo gruppo costituito dalle restanti 4 piante, sono stati misurati gli scambi gassosi su foglia singola con un analizzatore di gas all'infrarosso (CIRAS1-PP Systems). All'interno di ciascun gruppo sono state poi scelte una pianta asintomatica e una con sintomi: su due piante di un gruppo è stata mantenuta l'irrigazione, sulle altre due piante del secondo gruppo sono state invece instaurate condizioni di stress idrico mediante sospensione programmata dell'irrigazione. Lo stress idrico indotto è stato rilevato (normalmente alle ore 12:30) attraverso misure di potenziale idrico fogliare, espresso in MPa, effettuate con una camera a pressione (o camera di Scholander). L'irrigazione delle piante stressate è stata ripristinata allorquando sono stati raggiunti valori di potenziale idrico inferiori a -1,5 MPa.

Riassumendo, le tesi oggetto delle misurazioni sono state le seguenti: pallone 1, pianta sintomatica asciutta; pallone 2, pianta sintomatica irrigata; pallone 3, pianta asintomatica



Fig. 1 - Panoramica dei palloni di polietilene montati su piante di vite in vaso

ca asciutta; pallone 4, pianta asintomatica irrigata; pianta 1, pianta asintomatica asciutta; pianta 2, pianta asintomatica irrigata; pianta 3, pianta sintomatica asciutta; pianta 4, pianta sintomatica irrigata.

Delle piante sintomatiche una (P27) ha cominciato a mostrare sintomi fra l'11 e il 22 luglio essendo risultata asintomatica al rilievo dell'11 luglio e sintomatica a quello del 22; invece, l'altra (P36) è risultata asintomatica il 14 agosto e sintomatica il 30 agosto.

Per misurare gli scambi gassosi (fotosintesi, traspirazione e respirazione) sulla pianta intera è stato utilizzato un sistema autocostruito ("tree enclosure") (fig. 1) formato da un pallone di polietilene (ca. 210 x 120 cm) sigillato sulla pianta in modo da inglobarla fino alla base del tronco. La circolazione forzata di aria (circa 30 l/s) all'interno del pallone è stata assicurata da un ventilatore che aspirava aria dall'ambiente e la convogliava all'interno del pallone attraverso un tubo di plastica del diametro di 100 mm. L'aria veniva diffusa omogeneamente intorno alla pianta attraverso un tubo forato sistemato all'interno del rivestimento di polietilene. All'interno del tubo è presente una strozzatura di 10 mm: misurando la differenza di pressione a monte e a valle della strozzatura (5-10 millibar), è possibile, secondo la legge del tubo di Venturi, risalire al flusso di aria. Tale misura è fondamentale nel calcolo della fotosintesi. Prima dell'ingresso nel pallone, un campione di aria viene inviato a un analizzatore a infrarossi per la misura della concentrazione di CO<sub>2</sub>; inoltre, nella stessa posizione del prelievo dell'aria, è presente uno psicrometro che misura la temperatura e l'umidità dell'aria in ingresso. All'uscita di ogni pallone vengono effettuate le stesse misure appena descritte: un tubo di polietilene invia un campione di aria all'analizzatore all'infrarosso e un altro psicrometro misura la temperatura e l'umidità dell'aria in uscita da ogni pallone. Tutti i dati sono stati raccolti da un data-logger "mod-CR 10" (Campbell) ogni 10 minuti, per cui risultano 144 "set" di letture ogni 24 ore. Questo sistema consente di monitorare praticamente in tempo reale la situazione fisiologica della pianta relativamente agli scambi gassosi (CO<sub>2</sub> e acqua). In pratica, il calcolo della fotosintesi è ottenuto moltiplicando il differenziale di CO<sub>2</sub> tra aria immessa nel pallone e aria in uscita dal pallone per il flusso di aria (volume/tempo) e dividendo per la superficie fogliare della pianta. Sostituendo alla concentrazione di CO<sub>2</sub> l'umidità dell'aria si ottiene la traspirazione. Per il calcolo della superficie fogliare della pianta è stato

innanzitutto prelevato un campione rappresentativo di 50 foglie mature; di ciascuna foglia sono state quindi misurate la lunghezza della nervatura centrale e l'area totale mediante digitalizzazione dell'immagine e successiva analisi con il programma IMAGE TOOL. È stata quindi calcolata la retta di regressione tra la superficie fogliare e la lunghezza della nervatura centrale. Con riferimento a questa retta di regressione è stata calcolata, quando necessario, la superficie fogliare di una pianta dopo aver misurato la lunghezza della nervatura centrale di tutte le foglie della pianta.

Il sistema era anche provvisto di un sensore per la misura della radiazione fotosinteticamente attiva (PAR).

La misura degli scambi gassosi, oltre che sull'intera chioma, è stata effettuata anche su porzioni di foglia mediante un misuratore portatile di gas all'infrarosso, mod. CIRAS 1 (PP Systems, UK). Tale strumento effettua le misure su una superficie fogliare di 2,5 cm<sup>2</sup>. Le misure sono state effettuate nella mattinata (ore 10:00) e nel pomeriggio (ore 16:00; dal 1° al 30 settembre nel 2005; dal 18 giugno al 16 agosto nel 2007), solo nelle giornate in cui le condizioni meteorologiche consentivano condizioni di luce saturante (> 1000 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>).

In base alle variazioni di CO<sub>2</sub> e umidità lo strumento impiegato nelle misurazioni fornisce direttamente i valori di fotosintesi e di traspirazione dal cui rapporto si ottiene l'efficienza dell'utilizzo dell'acqua (WUE). Quest'ultimo valore misura il numero di μmoli di CO<sub>2</sub> fissate per ogni mmole di acqua traspirata. In caso di carenza di acqua gli stomi si chiudono parzialmente, la traspirazione diminuisce e così, entro certi limiti, migliora l'efficienza di utilizzo dell'acqua. Ciò determina una diminuzione dell'assimilazione della CO<sub>2</sub>, ma la pianta aumenta le sue probabilità di sopravvivenza consumando meno acqua (Taiz e Zeiger, 1996). Dal valore della traspirazione è possibile risalire alla conduttanza stomatica.

Le misurazioni sono state effettuate su foglie esterne della chioma (fig. 2). Le foglie sono state divise in 6 classi: foglie di piante non sintomatiche; foglie sintomatiche di piante sintomatiche; parte sana di foglia sintomatica; parte sintomatica di foglia parzialmente sintomatica; foglia asintomatica successiva a foglia sintomatica; foglia asintomatica lontana da una sintomatica (5 foglie asintomatiche nel mezzo). Per ciascuna classe sono state misurate 3 foglie. Sulle piante asintomatiche di ciascuna tesi sono state misurate 3 foglie per un totale di 6 foglie (2 piante x

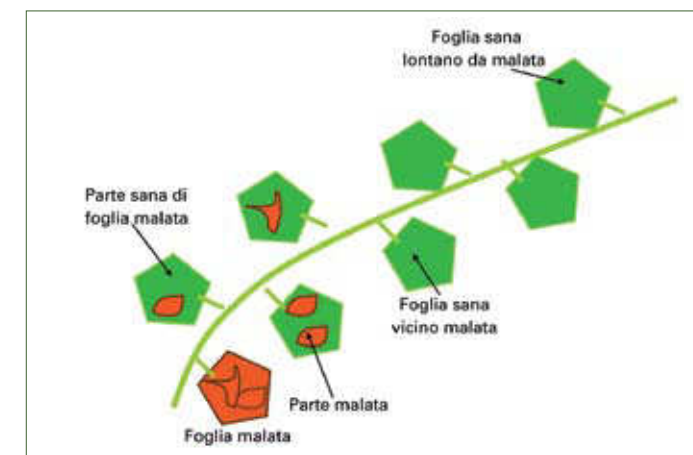


Fig. 2 - Raffigurazione schematica delle foglie utilizzate per le misurazioni degli scambi gassosi

3 foglie) (classe 1). Sulle piante sintomatiche di entrambe le tesi (asciutto e irrigato) sono state misurate 15 foglie per un totale di 30 (2 piante x 15 foglie) (classi 2, 3, 4, 5, 6).

**Risultati**

**Scambi gassosi in foglia singola**

*Traspirazione*

Il giorno dopo l'inizio delle prove non sono emerse differenze significative nei valori di traspirazione nelle foglie di piante asintomatiche, irrigate e non irrigate (fig. 3), probabilmente perché le piante non hanno risentito dello stress idrico indotto. La stessa spiegazione può essere fornita per le foglie asintomatiche lontane da quelle sintomatiche. Invece, nelle foglie asintomatiche vicine a foglie sintomatiche come pure nelle porzioni asintomatiche o sintomatiche di foglie sintomatiche delle tesi non irrigue i valori traspirativi sono apparsi inferiori rispetto alle tesi irrigue. Sembra quindi che la pianta cerchi di reagire allo stress idrico riducendo la traspirazione.

Diverso è il comportamento delle foglie completamente sintomatiche in piante non irrigate; in questo caso i valori della traspirazione sono superiori rispetto alle tesi irrigue. La spiegazione del fenomeno risiede forse nel fatto che la funzionalità stomatica, più o meno completamente compromessa, insieme a eventuali microrotture dell'epidermide, impedisca alla pianta di ridurre gli effetti dello stress (Matta, 1984; Agrios, 2005).

Nei rilievi effettuati il 6 settembre appare netto il divario fra tesi irrigate e tesi non irrigate sia in piante sintomatiche che asintomatiche, segno che lo stress indotto ha sviluppato i suoi effetti sulla risposta fisiologica della pianta.

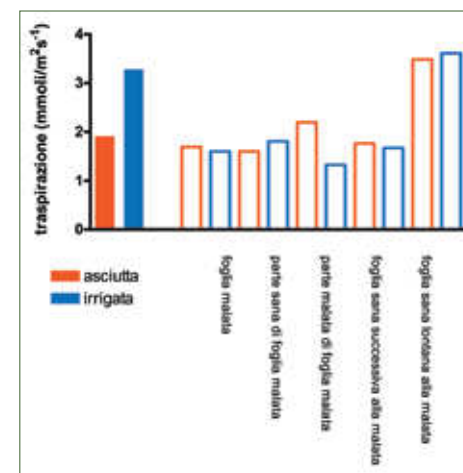


Fig. 5 - Andamento della traspirazione fogliare il 13 settembre

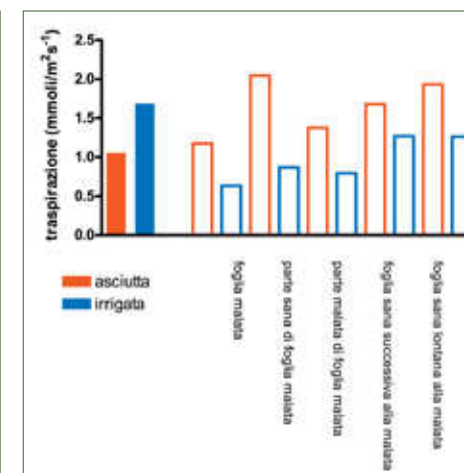


Fig. 6 - Andamento della traspirazione fogliare il 20 settembre

Le foglie completamente sane mantenute in asciutto continuano ad avere valori superiori rispetto a quelle di piante irrigue (fig. 4).

A partire dal 13 settembre si comincia a notare una inversione nei valori traspirativi delle piante asintomatiche rispetto a quelle sintomatiche (fig. 5).

Questa inversione è ancora più chiara nel rilievo del 20 settembre (fig. 6): mentre le piante asintomatiche irrigue continuano ad avere, com'era da attendersi, valori superiori rispetto alle non irrigue nelle diverse tesi delle piante sintomatiche i valori traspirativi delle foglie di piante in asciutto risultano superiori a quelli di piante irrigate e ciò anche in foglie asintomatiche lontane da foglie sintomatiche.

Evidentemente nelle piante asintomatiche, perfettamente funzionanti, la maggiore disponibilità di acqua influenza positivamente la traspirazione; invece, nelle piante sintomatiche, da una parte il progredire dei sintomi fogliari e dall'altro la probabile traslocazione nelle foglie distali di fitotossine, hanno alterato irrimediabilmente la funzionalità stomatica e al tempo stesso hanno provocato lesioni tali da aumentare la perdita "passiva" di acqua.

*Potenziale idrico*

Nelle figg. 7-8 sono riportati i valori del potenziale idrico di foglie di piante sintomatiche e asintomatiche, irrigate e non irrigate. Nelle piante asintomatiche irrigate i valori misurati sono risultati, ovviamente, più bassi, oscillanti intorno a 0,5 MPa, rispetto alle piante non irrigate (valori oscillanti intorno a 1 MPa). Nel caso invece di piante sintomatiche i valori dei potenziali idrici fogliari sono risultati paragonabili a quelli riscontrati nelle piante asintomatiche tenute in asciutto e pressoché uguali nelle piante irrigate e in quelle in asciutto. Il fenomeno è la probabile conseguenza di una alterazione dei meccanismi di controllo della pianta, oppure di ferite meccaniche a livello del parenchima fogliare che, causando perdite dirette di acqua, hanno falsato la misura effettuata con la camera a pressione.

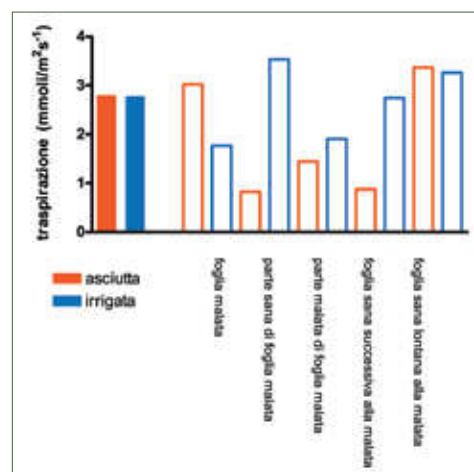


Fig. 3 - Andamento della traspirazione fogliare il 31 agosto

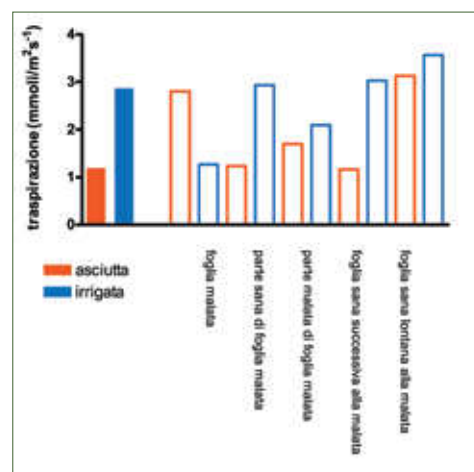


Fig. 4 - Andamento della traspirazione fogliare del 6 settembre

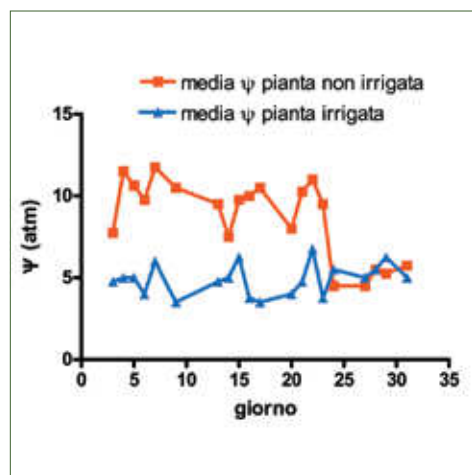


Fig. 7 - Andamento del potenziale idrico in piante asintomatiche

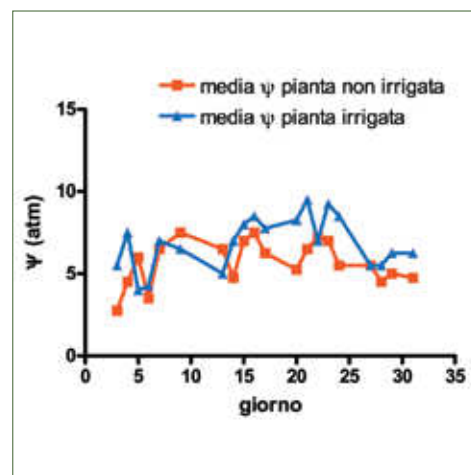


Fig. 8 - Andamento del potenziale idrico in piante sintomatiche

In effetti, i risultati ottenuti sono in accordo con l'andamento traspiratorio registrato nelle medesime tesi e con l'ipotesi di un danneggiamento cellulare nelle piante sintomatiche accompagnato da una più intensa traspirazione e, di conseguenza, da un potenziale idrico minore.

È opinione diffusa che in piante colpite da malattie sistemiche il flusso idrico possa risultare alterato a causa della presenza nei vasi del patogeno e a causa di reazioni di difesa della pianta (produzione di tille; accumulo di gomme) con conseguente modificazione della resistenza interna della pianta (resistenza dello xilema, dell'apoplasto fogliare e apertura stomatica). Anche nel caso dell'esca è verosimile che la resistenza xilematica aumenti a causa degli stessi fenomeni prima ricordati (presenza del patogeno nei vasi; tille; gomme) con ridotta resistenza dell'apertura stomatica, aumento della traspirazione e diminuzione del potenziale idrico fogliare.

**Assimilazione fotosintetica**

Dai rilievi effettuati il 1° settembre sono emersi nelle piante sia asintomatiche sia sintomatiche irrigate valori di assimilazione nettamente superiori rispetto alle stesse piante in asciutto (fig. 9). Inoltre, all'interno del gruppo di piante sintomatiche le foglie completamente sintomatiche e le porzioni alterate di foglie sintomatiche hanno assunto, già dalle prime misurazioni, valori di assimilazione molto bassi. Ciò potrebbe essere dovuto all'azione delle fitotossine dei funghi dell'esca (scitalone, isosclerone, EPSs) che, trasportate dalla corrente linfatica, vanno ad accumularsi nelle foglie fino a raggiungere concentrazioni tali da danneggiare, probabilmente, l'integrità dei cloroplasti e/o lo stesso processo fotosintetico. Tale fenomeno potrebbe dipendere anche dalla progressiva distruzione del parenchima fogliare, principalmente dei cloroplasti all'interno della foglia, che determinerebbe una perdita di funzionalità.

Valori attestanti una perdita pressoché totale dell'attività fotosintetica e della funzionalità delle foglie sono stati misurati nei rilievi successivi. In particolare, in quello del 20 settem-

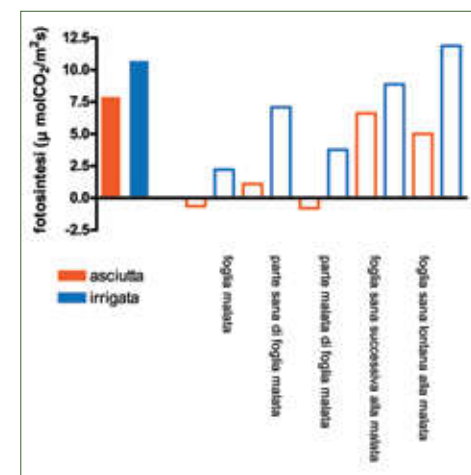


Fig. 9 - Andamento della fotosintesi il 1° settembre

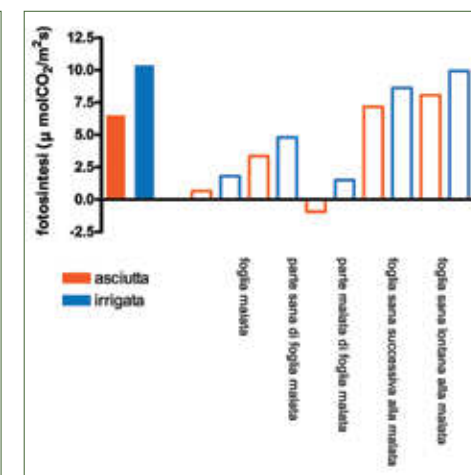


Fig. 10 - Andamento della fotosintesi il 20 settembre

bre la parte alterata di foglie sintomatiche ha fatto registrare valori addirittura negativi (fig. 10). Invece, le foglie asintomatiche di piante sintomatiche hanno presentato valori prossimi a quelli delle piante asintomatiche.

**Efficienza dell'utilizzo dell'acqua**

Nelle tesi irrigate, le foglie di piante asintomatiche e quelle asintomatiche di piante sintomatiche hanno manifestato valori di efficienza dell'utilizzo dell'acqua più elevati in assoluto, mentre le foglie completamente o parzialmente sintomatiche hanno presentato valori più bassi (fig. 11). Tuttavia, è apparsa altresì evidente una certa gradualità di valori dalle foglie completamente sintomatiche alle foglie asintomatiche lontane da quelle sintomatiche, e fino alle foglie di piante asintomatiche. Questa gradualità di valori lascia intendere l'intervento di un fenomeno alterativo localizzato (ad esempio, accumulo di tossine) rispetto a un fenomeno alterativo generalizzato (ad esempio, localizzato nel tronco), o comunque una preponderanza del primo sul secondo.

Nelle tesi in asciutto sono stati confermati i valori bassi di efficienza dell'utilizzo dell'acqua nelle foglie completamente sintomatiche e nella porzione sintomatica di foglie sintomatiche (fig. 12). Negli altri casi gli andamenti dei valori sono apparsi meno chiari comunque in linea con gli andamenti rilevati nelle tesi irrigue. In particolare, il gruppo di foglie sane ha manifestato valori superiori rispetto alle malate con i valori più elevati nelle foglie sane successive a quelle malate.

**Conduttanza stomatica**

In linea con tutte le precedenti osservazioni, la conduttanza stomatica, espressione della facilità con cui avvengono gli scambi gassosi tra atmosfera e foglia attraverso gli stomi (le variazioni della conduttanza stomatica sono ovviamente importanti per la regolazione della

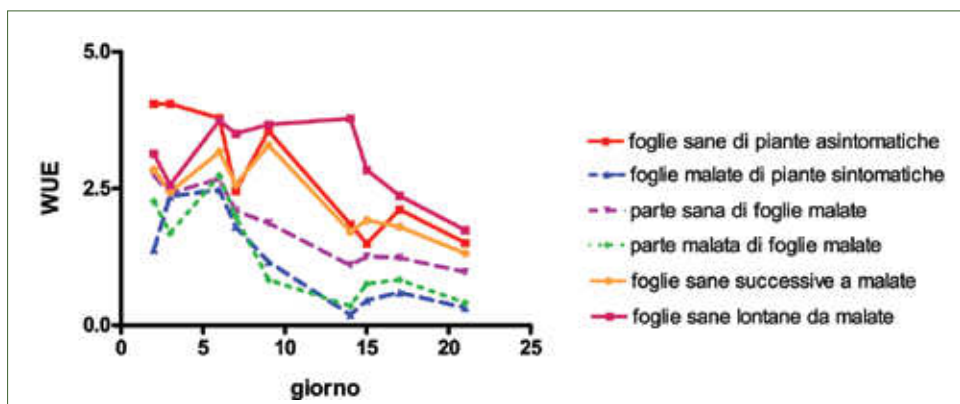


Fig. 11 - Andamento dell'efficienza dell'utilizzo dell'acqua in piante irrigate

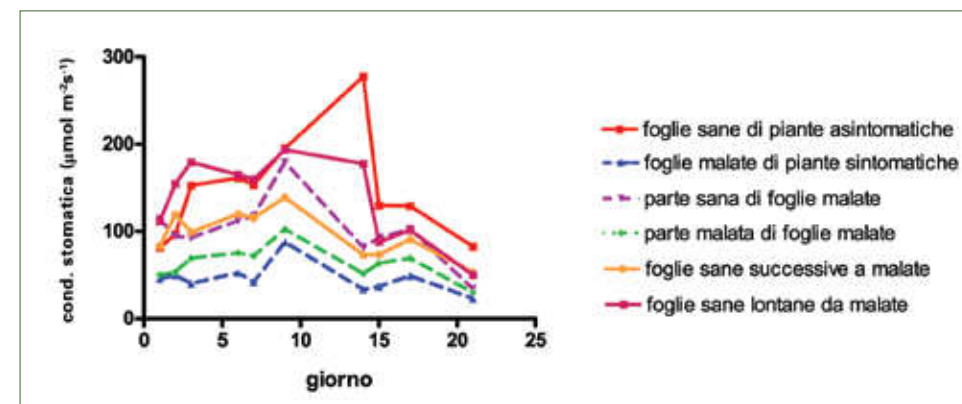


Fig. 13 - Andamento della conduttanza stomatica in piante irrigate

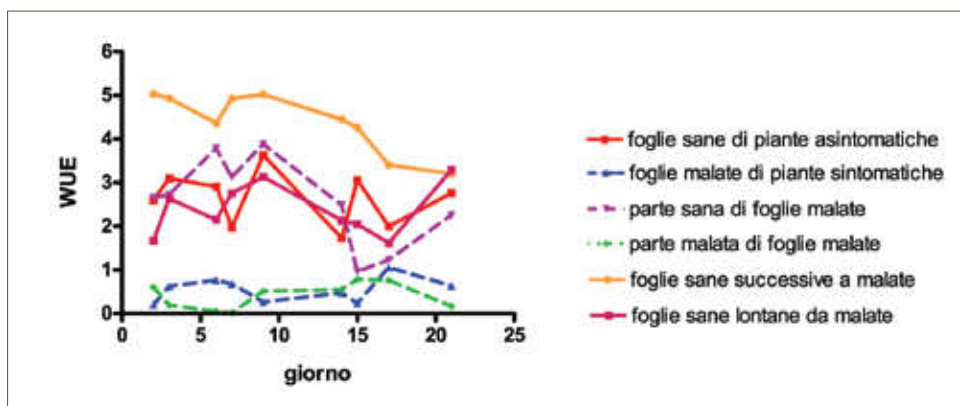


Fig. 12 - Andamento dell'efficienza dell'utilizzo dell'acqua in piante non irrigate

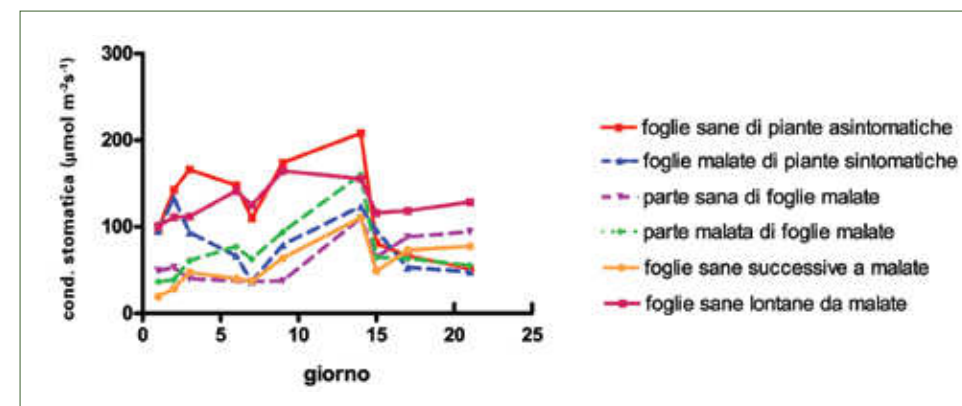


Fig. 14 - Andamento della conduttanza stomatica in piante non irrigate

perdita d'acqua da parte della pianta e per il controllo della velocità di assorbimento della CO<sub>2</sub>, è risultata, nel caso delle tesi irrigue, via via più elevata dalle foglie sintomatiche a quelle asintomatiche di piante sintomatiche e fino alle foglie di piante asintomatiche (fig. 13).

Andamenti analoghi a quelli ora detti sono stati osservati nel caso delle tesi non irrigate (fig. 14). Tuttavia, in queste tesi, i valori misurati sono risultati meno regolari e più bassi rispetto alle tesi irrigue poiché, si può supporre, la chiusura degli stomi ha causato una diminuzione della conduttanza stomatica che può aver avuto come conseguenza anche una riduzione degli scambi gassosi a causa della parziale chiusura stomatica (Avena *et al.*, 1997).

**Concentrazione della CO<sub>2</sub> nelle camere sottostomatiche**

La concentrazione della CO<sub>2</sub> nelle camere sottostomatiche in foglie asintomatiche di piante irrigate ha assunto valori più bassi rispetto alle foglie sintomatiche (fig. 15).

Basse concentrazioni della CO<sub>2</sub> sono indicative di una maggior attività fotosintetica (dato

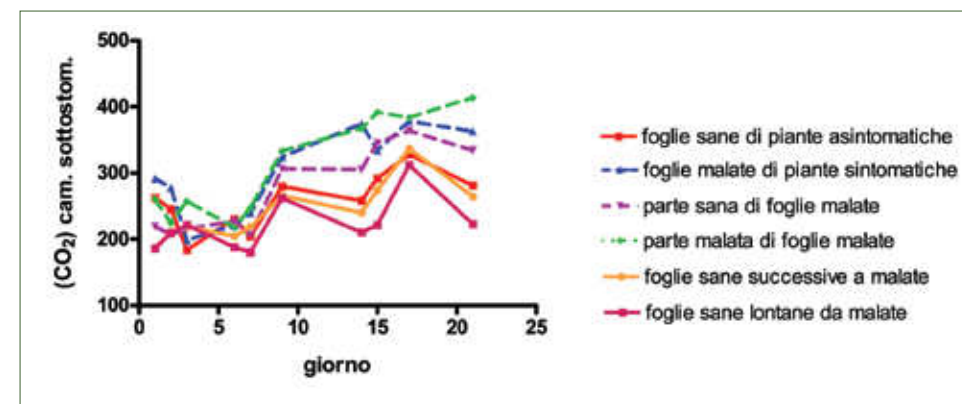


Fig. 15 - Andamento della concentrazione della CO<sub>2</sub> nelle camere sottostomatiche di foglie di piante irrigate

confermato dalle misure fotosintetiche effettuate sull'intera chioma) poiché ciò contribuisce a creare un gradiente di concentrazione che richiama a sua volta altre molecole di CO<sub>2</sub> dall'esterno. I valori in piante asciutte sono stati omessi in quanto hanno avuto un andamento fluttuante di difficile interpretazione e non sono quindi risultati utili ai fini della ricerca.

**Scambi gassosi sull'intera chioma**

*Traspirazione*

L'andamento della traspirazione nella prima settimana delle prove non ha mostrato grandi differenze tra piante irrigate e piante non irrigate, sintomatiche o asintomatiche. Tuttavia, queste ultime hanno mostrato un comportamento atipico; infatti i valori di traspirazione sono apparsi, soprattutto nei primi giorni, lievemente superiori rispetto alle piante irrigate (fig. 16, i dati in figura sono la media dei valori rilevati su piante sintomatiche e asintomatiche, irrigate e non irrigate).

Lo stesso andamento è stato notato nei primi due giorni della seconda settimana. Successivamente, le tesi irrigate hanno assunto valori superiori rispetto alle altre (fig. 17).

I dati della terza settimana non sono stati raccolti per problemi tecnici.

Un andamento più interessante è stato osservato nella quarta settimana. In particolare, nei giorni 22, 23 e 24 settembre (dalla 628<sup>ma</sup> alla 700<sup>ma</sup> ora) i valori delle tesi irrigue si sono discostati nettamente da quelle non irrigue (fig. 18).

Per quanto riguarda gli andamenti traspirativi di piante sintomatiche e asintomatiche, nel primo giorno della prima settimana non ci sono state differenze significative fra le due tesi. Successivamente, i valori delle piante asintomatiche si sono attestati su livelli lievemente superiori rispetto alle piante sintomatiche (fig. 19).

Dalla seconda settimana in poi le piante asintomatiche hanno mostrato valori maggiori e nettamente superiori a quelli delle piante sintomatiche (fig. 20).

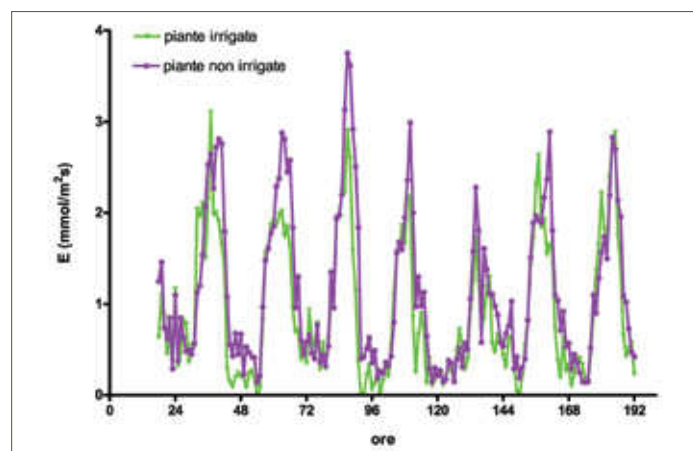


Fig. 16 - Andamento della traspirazione nella prima settimana di piante irrigate e non irrigate sotto pallone

Fig. 17 - Andamento della traspirazione nella seconda settimana di piante irrigate e non irrigate sotto pallone

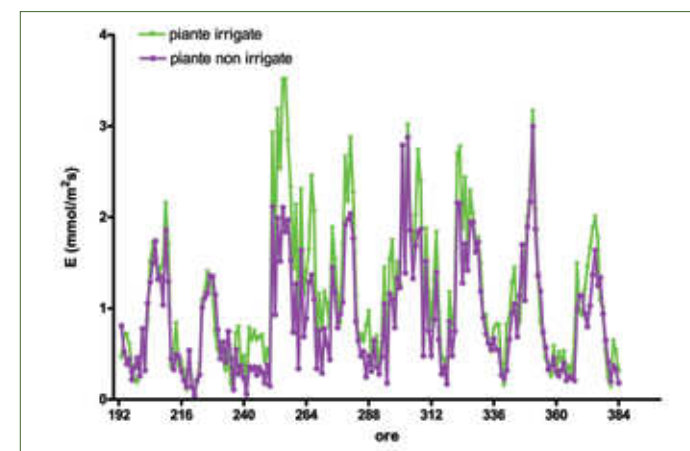


Fig. 18 - Andamento della traspirazione nella quarta settimana di piante irrigate e non irrigate sotto pallone

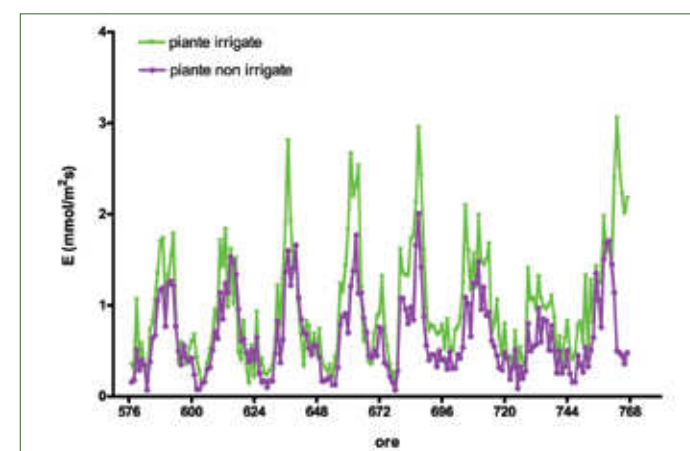
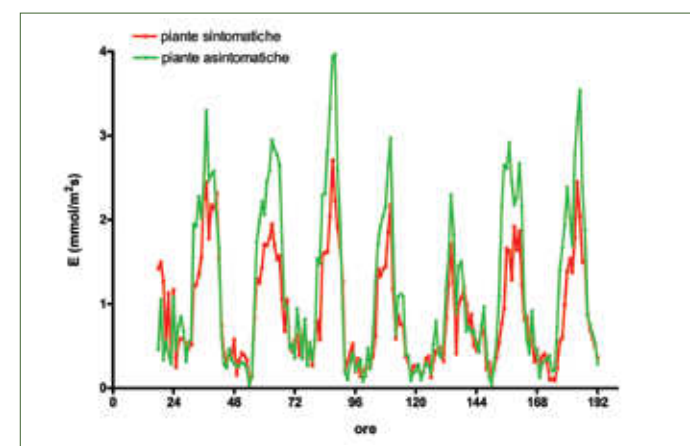


Fig. 19 - Andamento della traspirazione nella prima settimana di piante sintomatiche e asintomatiche sotto pallone



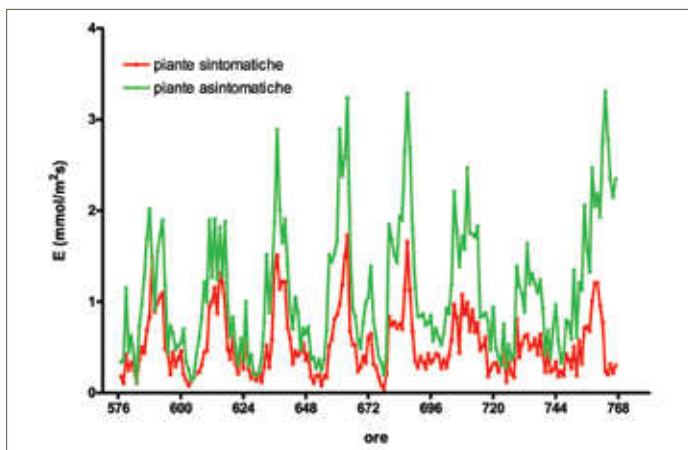


Fig. 20 - Andamento della traspirazione nella quarta settimana di piante sintomatiche e asintomatiche sotto pallone

**Assimilazione fotosintetica**

All'inizio della prima settimana le piante, irrigate e non irrigate, hanno presentato un andamento simile (fig. 21). Con il passare dei giorni le due tesi si sono via via sempre più differenziate e le tesi irrigate hanno assunto valori di assimilazione fotosintetica maggiori nella prima così come nelle altre 3 settimane (fig. 22). L'assimilazione fotosintetica di piante asintomatiche, già a partire dalla prima settimana, è risultata superiore rispetto alle piante sintomatiche. In effetti, già due giorni dopo l'inizio delle misurazioni i valori di respirazione di queste ultime si sono discostati nettamente da quelli di piante senza sintomi raggiungendo valori di  $-10 \mu\text{mol CO}_2/\text{mq s}$  (fig. 23). Gli andamenti della seconda, terza e quarta settimana (fig. 24) sono risultati analoghi a quelli della prima settimana.

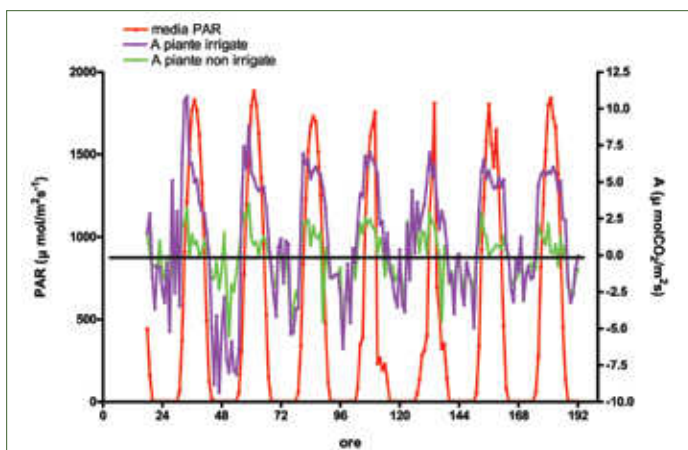


Fig. 21 - Andamento dell'assimilazione fotosintetica nella prima settimana di piante irrigate e non irrigate sotto pallone

Fig. 22 - Andamento dell'assimilazione fotosintetica nella quarta settimana di piante irrigate e non irrigate sotto pallone

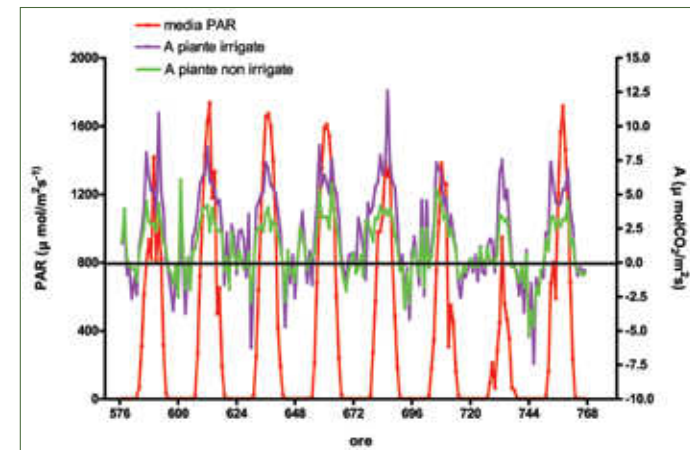


Fig. 23 - Andamento dell'assimilazione fotosintetica nella prima settimana di piante sintomatiche e asintomatiche sotto pallone

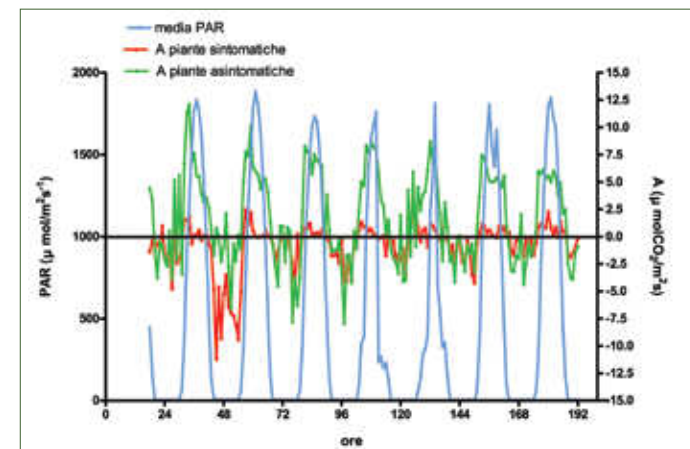
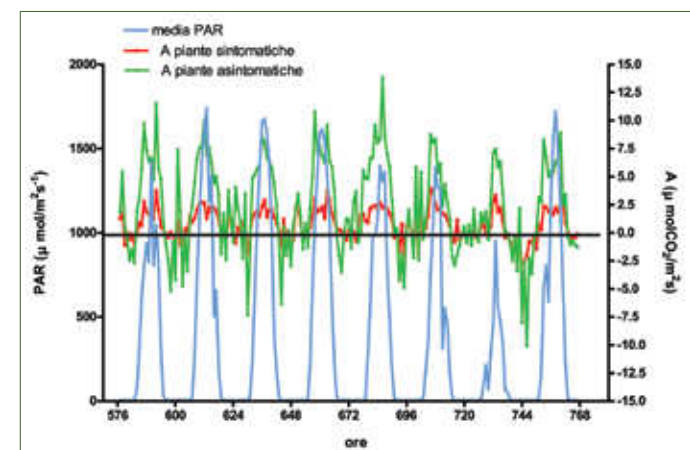


Fig. 24 - Andamento dell'assimilazione fotosintetica nella quarta settimana di piante sintomatiche e asintomatiche sotto pallone





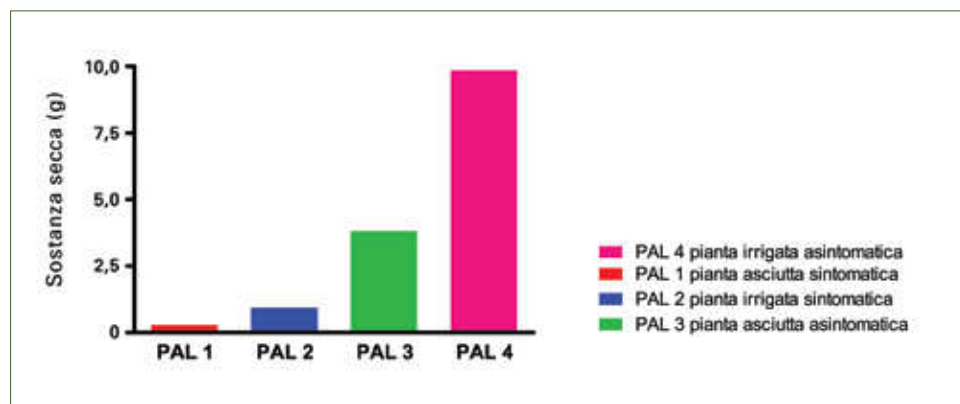


Fig. 25 - Accumulo giornaliero di sostanza secca per pianta

**Accumulo giornaliero di sostanza secca**

Il maggiore accumulo giornaliero di sostanza secca si è avuto nella pianta asintomatica irrigata. Valori via via inferiori sono stati osservati nella pianta asintomatica non irrigata; nella pianta sintomatica irrigata e, infine, nella pianta sintomatica non irrigata (fig. 25).

**Sintesi delle prove realizzate nel 2007: fotosintesi, traspirazione e rapporto fotosintesi-traspirazione**

Il 15 giugno 2007 sono stati montati i palloni di polietilene trasparente su due piante asintomatiche (P36 e P46) e su due piante che mostravano sintomi (P32, sintomatica a iniziare da un giorno compreso fra l'8 e il 14 giugno; P45, sintomatica dal 15 giugno). Il 18 giugno una delle due piante sane (P46) ha iniziato a mostrare sintomi. Le quattro piante sono state monitorate fino al 25 giugno. In questa data i palloni sono stati smontati dalle piante P32 e P45 e montati sulle piante P31 e P42, ancora asintomatiche. Le piante P36, P31 e P42 non hanno manifestato sintomi di esca per tutta la durata delle prove.

In questa prova il terreno di tutte le piante è stato costantemente irrigato fino alla capacità di campo. I risultati ottenuti sono riportati nelle figg. 26-29.

Nella fig. 26 è riportato l'andamento della fotosintesi misurata a livello di pianta intera. Nel caso della pianta sana l'andamento è pressoché costante durante tutte le giornate delle misurazioni. Invece, nella pianta che ha mostrato i sintomi dal 18 giugno (freccia verde) il livello di fotosintesi tende ad abbassarsi progressivamente da questa data in poi (segnali di diminuzione sono presenti anche in date precedenti). Si nota soprattutto una drastica diminuzione pomeridiana della fotosintesi, come se le foglie subissero uno stress termico. Non si tratta tuttavia di stress da carenza idrica poiché il terreno nei vasi è stato mantenuto alla capacità di campo. Inoltre, poiché i livelli di respirazione notturna sono praticamente simili in entrambe le piante, non sembra neanche che il metabolismo interno sia stato in qualche

maniera alterato. Tutto ciò suggerisce che la diminuzione di fotosintesi possa essere dovuta alla diminuzione di pigmenti fotosintetici (principalmente clorofilla) nelle foglie.

Riguardo all'andamento della traspirazione (fig. 27) misurata su pianta intera, le foglie della pianta sintomatica hanno mostrato, così come era stato evidenziato negli anni precedenti, un livello di traspirazione superiore rispetto a quello della pianta sana. L'interpretazione di questo risultato è da ricercarsi, verosimilmente, nella presenza di ferite sull'epidermide delle foglie sintomatiche, che aumenta le perdite di acqua per traspirazione "passiva", cioè non stomatica. Deve essere considerato, peraltro, che una maggiore perdita di acqua per traspirazione presuppone un maggior trasporto, quindi è lecito supporre che il sistema di trasporto svolga ancora efficientemente il suo compito, nonostante il fatto che certamente nel tronco una porzione più o meno vasta del sistema conduttore sia andato distrutto per effetto della carie del legno e alterato per effetto dei funghi *Phaeoconiella chlamydospora* e/o *Phaeoacremonium aleophilum*.

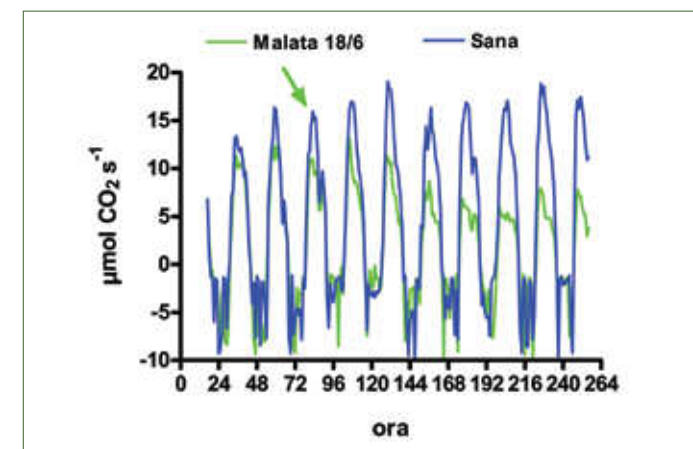


Fig. 26 - Fotosintesi su pianta intera. Rilievi iniziati il 15 giugno: il 18 giugno (indicato dalla freccia verde) una delle due piante ha iniziato a manifestare sintomi di mal dell'esca

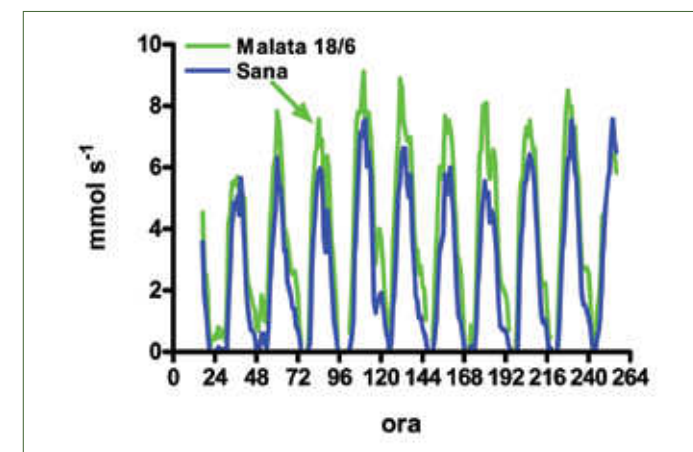


Fig. 27 - Andamento della traspirazione misurata su pianta intera

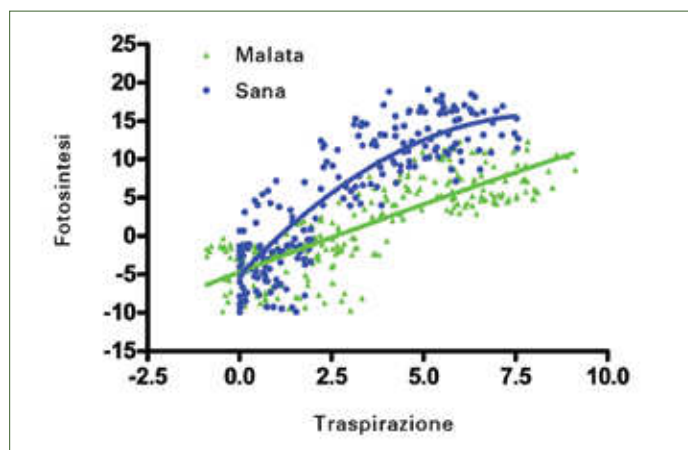


Fig. 28 - Relazione tra fotosintesi e traspirazione su pianta intera

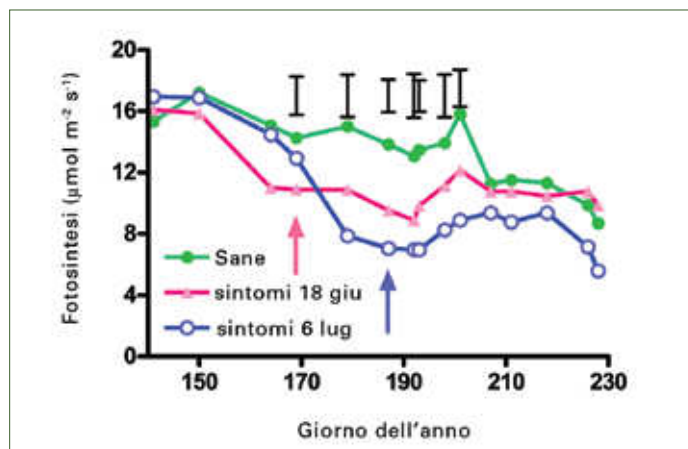


Fig. 29 - Andamento della fotosintesi in foglia singola, in presenza e assenza di sintomi

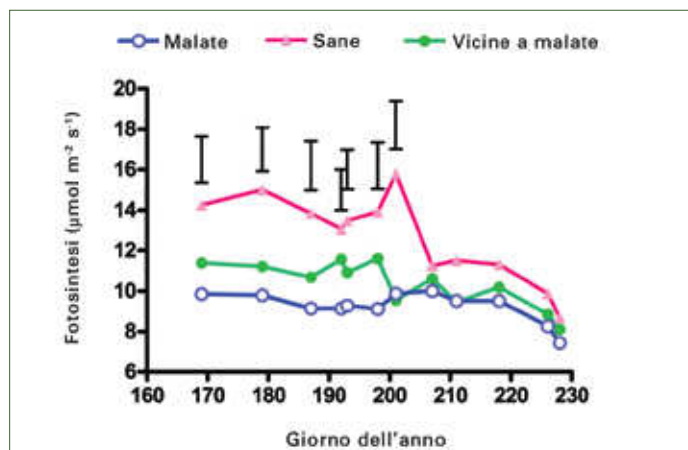


Fig. 30 - Andamento medio della fotosintesi in foglia singola, con riferimento alla presenza/assenza di sintomi e alla posizione sul tralcio. Si valutano tre tipologie di foglie: sempre sane, sempre malate e foglie vicine a quelle malate

La relazione tra fotosintesi e traspirazione (fig. 28) emerge dalla combinazione dei dati sulla fotosintesi e da quelli sulla traspirazione. In questo caso possiamo osservare che nella pianta sana i valori di fotosintesi sono più alti a parità di traspirazione; in altre parole, è più alta l'efficienza di utilizzazione dell'acqua, anche se la dispersione del dato è tale da fornire un coefficiente di regressione piuttosto basso.

La fig. 29 mostra l'andamento della fotosintesi misurata su foglia singola. Le misure riguardano tre tipologie di foglie: quelle sane per tutto il periodo delle misurazioni; quelle che hanno iniziato a manifestare sintomi il 18 giugno e quelle che hanno manifestato sintomi dal 6 luglio in poi. Le barre verticali indicano il valore della DMS al 95% di probabilità. È possibile evidenziare una diminuzione dell'attività fotosintetica già prima (in media una quindicina di giorni) della comparsa del sintomo in entrambe le tipologie di foglie sintomatiche. Durante la parte centrale della stagione si nota una netta diminuzione delle capacità fotosintetiche delle foglie sintomatiche, come osservato anche nei precedenti anni, mentre nella parte finale della stagione c'è una ripresa dell'attività, forse dovuta a un adattamento delle piante alla situazione di stress in cui si trova. È ampiamente documentato in letteratura, infatti, che una riduzione dell'apparato fotosintetico provoca un aumento dell'attività della parte restante. Comunque, nella parte finale della stagione, il livello di fotosintesi tende ad abbassarsi per il naturale invecchiamento fisiologico delle foglie.

La fig. 30 illustra, infine, l'andamento della fotosintesi in foglie sane (su viti non sintomatiche), foglie sintomatiche e foglie apparentemente sane vicino a foglie sintomatiche. Mentre i dati riportati nella fig. 29 sono riferiti sempre alle stesse foglie, per tutta la durata della stagione, in questo caso le foglie rilevate sono state di volta in volta cambiate per soddisfare le caratteristiche descritte. La necessità di cambiare foglie è stata determinata dal fatto che foglie asintomatiche, vicine a foglie sintomatiche, divenivano o potevano divenire anch'esse sintomatiche con il progredire della manifestazione sintomatica della malattia.

Anche nella fig. 30 le barre verticali indicano la DMS come nel caso precedente. Non si sono rilevate differenze statistiche tra le foglie sintomatiche e quelle sane vicine, anche se, soprattutto nella prima parte della stagione, si osserva una tendenza a una più alta fotosintesi nelle foglie non sintomatiche prossime a foglie sintomatiche. Si può quindi affermare che l'andamento della fotosintesi è ugualmente compromesso sia nelle foglie sintomatiche sia in quelle asintomatiche più prossime.

Valori nettamente più elevati sono stati ovviamente misurati nelle foglie appartenenti alle piante sane.

### Conclusioni

I dati ottenuti sia da Mattii *et al.* sia da Gucci *et al.* (capitolo IV.4b) confermano, sostanzialmente, quelli di Petit e collaboratori.

I valori di traspirazione su foglia singola di piante sintomatiche sono risultati essere superiori rispetto a quelli di foglie di piante asintomatiche e con il passare dei giorni le differenze sono andate accentuandosi probabilmente a causa dell'intensificarsi dei sintomi fogliari e dell'instaurarsi di un atteso quanto normale processo di senescenza delle foglie. Anche

L'attività fotosintetica è stata influenzata negativamente dai sintomi fogliari probabilmente in seguito a una degenerazione dei cloroplasti e/o ad alterazioni di una o più fasi intermedie del processo fotosintetico. La malattia ha influito negativamente anche sull'assimilazione di CO<sub>2</sub>, l'accumulo di biomassa e, quindi, sull'accrescimento. In particolare, l'andamento della concentrazione di CO<sub>2</sub> è risultato inversamente proporzionale all'attività fotosintetica poiché è noto che maggiore è l'efficienza del processo minore è la concentrazione del gas all'interno delle camere sottostomatiche. Il potenziale idrico non ha invece mostrato una diminuzione apprezzabile in presenza di sintomi fogliari. Laddove sono stati rilevati valori inferiori rispetto al normale ciò è stato attribuito alla presenza di microlesioni sulle foglie. Le foglie asintomatiche vicine a foglie sintomatiche hanno generalmente manifestato fenomeni alterativi dei parametri fotosintetici analoghi a quelli delle foglie sintomatiche. È stato anche dimostrato che le alterazioni nelle foglie asintomatiche vicine a foglie sintomatiche potevano cominciare anche fino a un paio di settimane prima che si manifestassero i sintomi di esca anche su di esse. Questo risultato, associato ai risultati di Petit e collaboratori, chiaramente indica un processo dinamico di formazione del sintomo esemplificato da un progressivo accumulo nelle foglie, fino a una concentrazione soglia di attività tossica, di sostanze che poi determinano le alterazioni osservate. L'accertata presenza nelle foglie di EPSs fungini fitotossici (☞ capitolo V.3) sembra confortare questa ipotesi.

Per quanto riguarda gli effetti a distanza delle manifestazioni di esca su una pianta c'è da osservare che, pur ritenendo ineccepibili le argomentazioni di Petit *et al.*, qui ricordate, le piante che risultano asintomatiche nell'anno successivo a un anno in cui sono risultate sintomatiche non manifestano, normalmente, speciali ritardi nel germogliamento (☞ capitolo IV.4) o nella formazione degli organi annuali, o anche, nella quantità e qualità della produzione (☞ capitoli VI.1 e VI.2). C'è quindi da concludere che le osservate diminuzioni di amido nei tralci da parte di Petit *et al.* (2006), peraltro già osservate da Mugnai *et al.* (1996), non sono importanti ai fini della piena esplicazione da parte della pianta delle sue potenzialità vegetative e produttive. D'altro canto la presenza della malattia per più anni consecutivi non è sembrata influire su talune misurazioni di scambi gassosi (Gucci *et al.*, ☞ capitolo IV.4b).

Infine, uno degli scopi degli studi effettuati era anche quello di verificare la possibilità che i sintomi fogliari potessero essere la conseguenza di uno stress idrico nella pianta. I risultati ottenuti sembrano escludere questa eventualità.

## IV.4.2 Misurazioni su foglia singola di piante di vite in campo

R. Gucci\*, G. Caruso, C. Bertolla, L. Andreini

### Introduzione

Rilievi del potenziale idrico di base e misure degli scambi gassosi in corrispondenza di diverse fasi fenologiche di piante di vite asintomatiche e sintomatiche sono stati effettuati anche dall'unità operativa di Pisa. Anche in questo caso si è voluto accertare l'influenza sugli scambi gassosi e sul potenziale idrico di base dei sintomi fogliari di esca, latenti o conclamati; inoltre, si è tentato di utilizzare le misurazioni effettuate per una diagnosi precoce della malattia o per evidenziare differenze tra genotipi.

### Materiali e metodi

L'attività di ricerca è stata condotta in un vigneto allevato a cordone libero, al 24<sup>mo</sup> anno di produzione, con sesto d'impianto di 3x1 m, situato a Colignola (Pisa), nel centro sperimentale del Dipartimento di Coltivazione e Difesa delle Specie Legnose dell'Università di Pisa.

Le tesi erano disposte all'interno del vigneto in quattro blocchi randomizzati disposti in senso trasversale alla lunghezza del campo. In ogni blocco erano presenti quattro vitigni (Cabernet Sauvignon, Sangiovese, Trebbiano e Chardonnay), ciascuno innestato su tre portinnesti: Franco (A) 1103P (P), 5BB (K).

Nel 2006 sono stati presi in esame tre diversi vitigni (Cabernet Sauvignon, Sangiovese e Trebbiano); nel 2007 i rilievi sono stati effettuati solo sul vitigno Cabernet Sauvignon.

Nel 2006 le misure dei parametri di scambio gassoso e di potenziale idrico del fusto sono state effettuate il 28 luglio (invaiaura) e il 20 settembre (maturazione grappolo) su foglie pienamente espanse di piante di vite appartenenti agli stessi tre vitigni sopra elencati. I parametri di scambio gassoso sono stati misurati con unità IRGA CIRAS1 su tre foglie di altrettante piante per ciascuna tesi in condizioni di radiazione fotosinteticamente attiva di saturazione (PPF > 900 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). Tutte le misure, incluse quelle sulle foglie affette da mal dell'esca, sono state effettuate su porzioni di tessuto fogliare che non presentavano alcun sintomo della malattia.

Le misure di potenziale idrico di base sono state effettuate, tra le ore 9:30 e le 11:00 (ora solare), mediante una camera a pressione tipo PMS 1000 (Plant Moisture Systems, USA),

\* Università di Pisa email: rgucci@agr.unipi.it



Fig. 1 - Foglia di vite affetta da mal dell'esca. Il cerchio rosso indica la porzione di foglia che non presenta alcun sintomo della malattia e sulla quale sono state effettuate le misure di scambi gassosi per il confronto con foglie apparentemente sane

Fig. 2 - Pianta di vite affetta da mal dell'esca. I cerchi in rosso indicano la foglia sana e quella sintomatica utilizzate per le misure di scambi gassosi e del potenziale idrico di base

previa copertura delle foglie con foglio di alluminio per 40 minuti, in modo da bloccare la traspirazione delle foglie e in attesa che il potenziale fogliare si equilibrasse con quello xilematico del tralcio. Per le misure di potenziale sono state utilizzate due foglie per pianta (foglia sana e sintomatica) nel caso di piante sintomatiche e una foglia nel caso di piante asintomatiche. Ciascuna tesi era costituita da tre piante.

Per i rilievi sono state utilizzate foglie di vite completamente espanse di piante sane (ovvero piante che non hanno mai manifestato sintomi di mal dell'esca) e sintomatiche nel 2005 (ovvero piante che nel 2005 presentavano sintomi di mal dell'esca, ma che risultavano apparentemente sane nel 2006). Sono state inoltre prese in considerazione, su piante di vite affette da mal dell'esca, foglie sane completamente espanse (prive di sintomi in entrambi gli anni) e foglie sintomatiche, ovvero foglie con evidenti sintomi di mal dell'esca. Riassumendo, per ciascuno dei tre vitigni nel 2006 sono state confrontate le foglie sane di piante sane e di piante sintomatiche nel 2005 e le foglie sane e sintomatiche di piante sintomatiche nel 2006.

Nel 2007, sono state confrontate piante sane e piante che avevano presentato i sintomi della malattia per un diverso numero di anni. In particolare, i rilievi sono stati effettuati su piante (Cabernet Sauvignon) che hanno presentato i sintomi nel 2004, 2005, 2006 e 2007 (E04-05-06-07); nel 2005, 2006 e 2007 (E05-06-07); nel 2005 e nel 2007 (E05 - E07) e nel 2006 (E06) e su piante sane (Sana). I parametri di scambi gassosi sono stati misurati prima della comparsa dei sintomi (19 giugno) mentre il potenziale idrico del fusto è stato misurato il 19 giugno e il 18 luglio (dopo la comparsa dei sintomi). Inoltre, il 18 luglio sono state effettuate misure di potenziale idrico su foglie sane e su foglie sintomatiche appartenenti a piante affette da mal dell'esca.

I dati rilevati sono stati elaborati e sottoposti ad analisi della varianza a una via (ANOVA); le medie delle tesi sono state separate mediante differenze minime significative (LSD,  $P \leq 0,05$ ).

### Risultati

#### Confronto tra piante sane e piante sintomatiche nel 2005 e asintomatiche nel 2006

I valori di assimilazione netta, conduttanza stomatica, concentrazione interna di  $CO_2$  e potenziale idrico di base sono risultati simili in foglie appartenenti a piante sane (mai sintomatiche) e in foglie di piante asintomatiche nel 2006, ma che avevano presentato i sintomi fogliari della malattia nel 2005 (tabb. 1-2). Il confronto non ha evidenziato differenze significative sia a luglio che a settembre. In ciascun vitigno, i valori del tasso di assimilazione (A) e della conduttanza stomatica ( $g_s$ ) sono risultati elevati e tipici di foglie di vite in buone condizioni di assimilazione e funzionalità stomatica.

Nella tab. 1 si riportano i parametri di scambio gassoso e potenziale idrico di base misurati il 28 luglio 2006 su foglie di vite completamente espanse di piante sane (ovvero piante che non hanno mai manifestato sintomi di mal dell'esca) e sintomatiche nel 2005 (ovvero piante che nel 2005 presentavano sintomi di mal dell'esca, ma che risultano apparentemente sane nel 2006). I rilievi sono stati effettuati su piante appartenenti a tre diversi vitigni a Colignola (PI) e i parametri di scambio gassoso sono stati misurati con unità IRGA CIRAS1 su 3 foglie di altrettante piante per ciascuna tesi in condizioni di radiazione fotosinteticamente attiva di saturazione ( $PPF > 900 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ ), a una temperatura fogliare di  $32,4 \pm 1,1^\circ C$ , e a una concentrazione di  $CO_2$  ambientale pari a  $353 \pm 11,9 \mu l/l$ . Il potenziale idrico è stato misurato tra le ore 9:30 e le 11:00 (ora solare) su una foglia per pianta dopo insacchettamento con carta stagnola per 40 minuti, mediante camera a pressione PMS 1000. Differenze minime significative (LSD) sono state calcolate dopo analisi della varianza a una via per ciascun vitigno a un livello di probabilità del 5%.

Nella tab. 2 figurano i parametri di scambio gassoso e potenziale idrico di base misurati il 20 settembre 2006 su foglie di vite completamente espanse di piante sane (ovvero piante che non

Tab. 1 - Parametri di scambio gassoso e potenziale idrico di base misurati il 28 luglio 2006 su foglie di vite di piante sane e sintomatiche nel 2005									
	Cabernet Sauvignon			Sangiovese			Trebiano		
	Sana	Sintomatica 2005	LSD (0,05)	Sana	Sintomatica 2005	LSD (0,05)	Sana	Sintomatica 2005	LSD (0,05)
Assimilazione ( $\mu mol CO_2 m^{-2} s^{-1}$ )	13,6	15,2	5,3	13,6	16,5	9,7	15,2	12,8	4,3
$g_s$ ( $mmol m^{-2} s^{-1}$ )	236	350	118	231	247	49	350	217	185
$C_i$ ( $\mu l/l$ )	225	220	67	219	205	70	220	205	58
$\Psi_w$ (MPa)	-0,98	-0,84	0,34	-0,77	-0,82	0,36	0,84	-0,86	0,12

**Tab. 2 - Parametri di scambio gassoso e potenziale idrico di base misurati il 20 settembre 2006 su foglie di vite di piante sane e sintomatiche nel 2005\***

	Cabernet Sauvignon			Sangiovese			Trebiano		
	Sana	Sintomatica 2005	LSD (0,05)	Sana	Sintomatica 2005	LSD (0,05)	Sana	Sintomatica 2005	LSD (0,05)
Assimilazione ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	13,0	12,4	7,1	14,0	12,7	5,4	11,6	12,6	6,1
$g_s$ ( $\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	205	225	115	221	201	73	185	204	75
$c_i$ ( $\mu\text{l/l}$ )	223	235	31	219	220	29	225	224	26
$\Psi_w$ (MPa)	-0,98	-0,88	0,35	-0,74	-0,96	0,46	-0,73	-0,85	0,37

\* I rilievi sono stati effettuati su piante appartenenti a tre diversi vitigni a Colignola (PI) e i parametri di scambio gassoso sono stati misurati con unità IRGA CIRAS1 su 3-4 foglie di altrettante piante per ciascuna tesi (n = 3 Cabernet; n = 4 Sangiovese; n = 3 Trebbiano) in condizioni di radiazione fotosinteticamente attiva di saturazione (PPF > 900  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), a una temperatura fogliare di  $26,7 \pm 0,6^\circ\text{C}$ , e a una concentrazione di  $\text{CO}_2$  ambientale pari a  $358,7 \pm 1,2 \mu\text{l/l}$ . Il potenziale idrico è stato misurato tra le ore 9:30 e le 11:00 (ora solare) su una foglia per pianta dopo insacchettamento con carta stagnola per 40 minuti, mediante camera a pressione PMS 1000. Differenze minime significative (LSD) sono state calcolate dopo analisi della varianza a una via per ciascun vitigno a un livello di probabilità del 5%.

hanno mai manifestato sintomi di mal dell'esca) e sintomatiche nel 2005 (ovvero piante che nel 2005 presentavano sintomi di mal dell'esca, ma che risultano apparentemente sane nel 2006).

**Confronto tra foglie sane e foglie sintomatiche di piante affette da mal dell'esca**

La *tab. 3* riporta i parametri di scambio gassoso e potenziale idrico di base misurati il 28 luglio 2006 su foglie completamente espanse di piante di vite affette da mal dell'esca appartenenti a tre diversi vitigni a Colignola (PI). Le tesi a confronto sono: *a*) sana, ovvero foglia non sintomatica di pianta colpita da mal dell'esca; *b*) sintomatica, ovvero foglia con evidenti sintomi di mal dell'esca.

Le misure del 28 luglio (*tab. 3*) hanno evidenziato nelle foglie sintomatiche di tutti e tre i vitigni una forte riduzione dei valori di assimilazione (A) e di conduttanza stomatica ( $g_s$ ) e un significativo aumento della concentrazione interna di  $\text{CO}_2$  ( $c_i$ ). I vitigni che sembrano risentire maggiormente della malattia sono il Cabernet Sauvignon e il Sangiovese, le cui foglie sane presentano valori di A ( $13,2\text{-}14,1 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) e di  $g_s$  ( $278\text{-}251 \text{mmol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) pari rispettivamente a circa 3 e 2,5 volte rispetto a quelli rilevati in foglie sintomatiche (circa  $100 \text{mmol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  in entrambi i vitigni). In questi due vitigni le foglie sintomatiche presentano una concentrazione interna di  $\text{CO}_2$  intorno al 15% più alta rispetto alle foglie sane. Nel Trebbiano le foglie sane presentano valori di A poco più del doppio di quelli di foglie sintomatiche, mentre le differenze di  $g_s$  e  $c_i$  risultano addirittura non significative, seppure si osservi nelle foglie sintomatiche una riduzione del funzionamento stomatico (-36% circa) e un aumento della concentrazione interna di  $\text{CO}_2$  (+19%). Per quanto riguarda infine il potenziale idrico fogliare, questo non risulta influenzato dalla malattia, essendo sempre compreso tra -0,81 e -0,98 MPa sia nelle foglie sane, sia in quelle sintomatiche dei 3 vitigni in esame.

**Tab. 3 - Parametri di scambio gassoso e potenziale idrico di base misurati il 28 luglio 2006 su foglie di piante di vite sane e affette da mal dell'esca\***

	Cabernet Sauvignon			Sangiovese			Trebiano		
	Sana	Malata	LSD 0,05	Sana	Malata	LSD (0,05)	Sana	Malata	LSD (0,05)
Assimilazione ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	13,2 a	3,7 b	3,1	14,1 a	4,7 b	3,8	14,2 a	6,0 b	6,0
$g_s$ ( $\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	278 a	99 b	60	251 a	105 b	81	272	175	142
$c_i$ ( $\mu\text{l/l}$ )	23 b	254 a	29	215 b	249 a	13	215	257	50
$\Psi_w$ (MPa)	-0,82	-0,98	0,19	-0,86	0,87	0,08	-0,81	-0,86	0,19

\* I parametri di scambio gassoso sono stati misurati con unità IRGA CIRAS1 su una foglia malata e una sana di 4-10 piante per ciascun vitigno (n = 10 Cabernet; n = 7 Sangiovese; n = 4 Trebbiano) in condizioni di radiazione fotosinteticamente attiva di saturazione (PPF > 900  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), a una temperatura fogliare di  $32,6 \pm 1,20^\circ\text{C}$ , e a una concentrazione di  $\text{CO}_2$  ambientale pari a  $350,0 \pm 11,2 \mu\text{l/l}$ . Il potenziale idrico è stato misurato tra le ore 9:30 e le 11:00 (ora solare) su una foglia sana e una malata per pianta dopo insacchettamento con carta stagnola per 40 minuti, mediante camera a pressione PMS 1000. Differenze minime significative (LSD) sono state calcolate dopo analisi della varianza a una via per ciascun vitigno a un livello di probabilità del 5%.

**Tab. 4 - Parametri di scambio gassoso e potenziale idrico di base misurati rispettivamente il 7 e il 20 settembre 2006 su foglie espanse di piante di vite affette da mal dell'esca\***

	Cabernet Sauvignon			Sangiovese			Trebiano		
	Sana	Malata	LSD 0,05	Sana	Malata	LSD (0,05)	Sana	Malata	LSD (0,05)
Assimilazione ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	12,5 a	3,6 b	5,8	12,3 a	6,5 b	6,6	13,5 a	3,3 b	11,6
$g_s$ ( $\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	249 a	102 b	87	226 a	132 b	43	224	124	125
$c_i$ ( $\mu\text{l/l}$ )	285	241	114	234	254	60	235	301	112
$\Psi_w$ (MPa)	-0,94	-0,84	0,43	-0,70	0,73	0,19	-0,82	-0,75	0,41

\* I parametri di scambio gassoso sono stati misurati con unità IRGA CIRAS1 su una foglia malata e una sana di 4 piante per ciascun vitigno in condizioni di radiazione fotosinteticamente attiva di saturazione (PPF > 900  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), a una temperatura fogliare di  $27,0 \pm 0,7^\circ\text{C}$ , e a una concentrazione di  $\text{CO}_2$  ambientale pari a  $360,0 \pm 2,2 \mu\text{l/l}$ . Il potenziale idrico è stato misurato tra le ore 9:30 e le 11:00 (ora solare) su una foglia sana e una malata per pianta dopo insacchettamento con carta stagnola per 40 minuti, mediante camera a pressione PMS 1000. Differenze minime significative (LSD) sono state calcolate dopo analisi della varianza a una via per ciascun vitigno a un livello di probabilità del 5%.

La *tab. 4* riporta i parametri di scambio gassoso e potenziale idrico di base misurati rispettivamente il 7 e il 20 settembre 2006 su foglie completamente espanse di piante di vite affette da mal dell'esca appartenenti a tre diversi vitigni a Colignola (PI). Le tesi a confronto sono: *a*) sana, ovvero foglia non sintomatica di pianta colpita da mal dell'esca; *b*) sintomatica, ovvero foglia con evidenti sintomi di mal dell'esca nel 2006.

Al 20 settembre (*tab. 4*) gli effetti della malattia sui principali parametri di scambio gassoso sono gli stessi osservati alla data di luglio, eccezion fatta per  $c_i$  che non risulta influenzata in modo significativo dalla malattia. In Cabernet Sauvignon e Trebbiano il tasso di assimilazione delle foglie sintomatiche ( $3,6-3,3 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , rispettivamente) risulta circa un quarto di quello delle foglie sane ( $12,5-13,5 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), mentre nel Sangiovese la riduzione risulta relativamente più contenuta (circa il 50%). Anche la  $g_s$  è ridotta nelle foglie malate; la maggior diminuzione si osserva nel Cabernet Sauvignon, dove le foglie sintomatiche presentano il 60% in meno di attività stomatica rispetto alle foglie sane. Negli altri due vitigni la riduzione del funzionamento stomatico risulta invece compresa tra il 41 e il 45%. Il potenziale idrico fogliare misurato al 7 settembre, infine, non è stato influenzato dalla malattia (*tab. 4*).

**Confronto tra piante (Cabernet Sauvignon) con manifestazioni dei sintomi di mal dell'esca in anni diversi**

La *tab. 5* riporta i parametri di scambio gassoso misurati il 19 giugno 2007 su foglie di vite (Cabernet Sauvignon) completamente espanse di piante sane (ovvero piante che non hanno mai manifestato sintomi di mal dell'esca) e sintomatiche (ovvero piante che presentavano sintomi di mal dell'esca). Sono stati confrontati i valori di scambi gassosi e di potenziale di base in viti che hanno presentato i sintomi dal 2004 al 2007 (E04-05-06-07), dal 2005 al 2007 (E05-06-07), nel 2005 e nel 2007 (E05-E07), nel 2006 (E06) e su piante sane (Pianta sana).

Gli scambi gassosi misurati prima della comparsa dei sintomi di mal dell'esca, non sono risultati significativamente diversi in piante sane e in piante sintomatiche negli anni precedenti (*tab. 5*). Anche considerando solamente le piante sintomatiche, la durata della presenza della malattia sulla pianta non ha determinato differenze significative nei parametri esaminati.

Tab. 5 - Parametri di scambio gassoso misurati il 19 giugno 2007 su foglie di vite (Cabernet Sauvignon) di piante sane e sintomatiche*			
Tesi	$g_s$ ( $\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	Assimilazione ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	$c_i$ ( $\mu\text{l/l}$ )
Pianta sana	295	16,6	199
E05 - E07	275	16,2	217
E06	302	15,9	217
E05-06-07	294	16,6	216
E04-05-06-07	326	17,8	209
LSD	93,72	5,04	23,08

\* I parametri di scambio gassoso sono stati misurati con unità IRGA CIRAS1 su 3 foglie di altrettante piante per ciascuna tesi in condizioni di radiazione fotosinteticamente attiva di saturazione ( $\text{PPF} > 900 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), a una temperatura fogliare di  $29,7 \pm 0,41^\circ\text{C}$ , e a una concentrazione di  $\text{CO}_2$  ambientale pari a  $353 \pm 10 \mu\text{l/l}$ . Differenze minime significative (LSD) sono state calcolate dopo analisi della varianza a una via a un livello di probabilità del 5%.

Tab. 6 - Valori di potenziale idrico di base misurato il 19 giugno 2007 e il 18 luglio 2007 su foglie di vite (Cabernet Sauvignon) di piante sane e sintomatiche*			
Tesi	Potenziale idrico fogliare (MPa)		
	19 giugno 2007	18 luglio 2007	
	Foglie sane	Foglie sane	Foglie sintomatiche
E05 - E07	-0,58	-0,63	***
E06	-0,60	-0,48	-0,57
E05-06-07	-0,70	-0,58	***
E04-05-06-07	-0,57	-0,50	-0,68
E 04-05-06-07	-0,58	-0,53	-0,60
LSD	0,135	0,209	0,213

\* Il potenziale idrico è stato misurato tra le ore 9:30 e le 11:00 (ora solare) su una foglia per pianta dopo insacchettamento con foglio di alluminio per 40 minuti, mediante camera a pressione PMS 1000. Differenze minime significative (LSD) sono state calcolate dopo analisi della varianza a una via a un livello di probabilità del 5%.  
\*\*\* Non erano presenti foglie sintomatiche sulle piante appartenenti a queste tesi.

Per quanto riguarda il potenziale idrico fogliare i valori misurati su foglie sane a giugno e su foglie sane e sintomatiche a luglio non hanno mostrato differenze significative tra le diverse tesi (*tab. 6*). Anche in questo caso la presenza per più anni della malattia non ha indotto differenze significative nei valori di potenziale idrico di base rispetto alle piante sintomatiche in un solo anno e alle piante sane.

Effettuando le misure sulle foglie sane e sulle foglie sintomatiche di una stessa pianta affetta da mal dell'esca sono state osservate differenze significative solo nella tesi E05-06-07 (*tab. 6*). In particolare, le foglie sintomatiche hanno presentato un valore medio di potenziale idrico pari a  $-0,68 \text{ MPa}$  contro i  $-0,5 \text{ MPa}$  misurati nelle foglie sane (LSD, 1,463).

**Conclusioni**

La presenza della malattia comporta una forte diminuzione del tasso di assimilazione e della conduttanza stomatica, con effetti in genere più marcati nel Cabernet Sauvignon. Anche la concentrazione interna di  $\text{CO}_2$  risulta spesso influenzata, essendo generalmente nelle foglie malate più alta che nelle foglie sane. Al contrario, la presenza di malattia non sembra influire sul potenziale idrico fogliare, che si mantiene sui valori tipici di piante non stressate sia nelle foglie malate che in quelle sane.

Dall'analisi dei dati raccolti emergono differenze significative tra foglie sintomatiche e non sintomatiche relativamente all'assimilazione netta ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ).

Anche la conduttanza stomatica è risultata essere negativamente influenzata dalla presenza di sintomi di mal dell'esca nelle foglie di tutti i vitigni in esame. Inoltre, è interessante notare che i valori dei parametri di scambio gassoso misurati prima della comparsa dei sintomi, sono risultati simili a quelli registrati in piante sane. Ciò significa che dal punto di vista diagnostico una sola misura dei parametri di scambi gassosi effettuata circa un mese prima del picco di infezione nel vigneto non fornisce elementi utili ai fini di una diagnosi precoce. Altre analisi (☞ capitolo IV.3) hanno infatti dimostrato che le misurazioni degli scambi gassosi manifestano una qualche alterazione solo a partire da una quindicina di giorni prima della comparsa dei sintomi.

## IV.5 Conducibilità idraulica in tralci di piante di vite colpite dal mal dell'esca

*L. Andreini\*, G. Scalabrelli, R. Gucci, G. Caruso, C. Bertolla, R. Viti*

### IV.5.1 Introduzione

In considerazione dell'esigenza di acquisire una migliore conoscenza del comportamento delle piante di vite affette da mal dell'esca si è ritenuto opportuno valutare alcuni aspetti di carattere anatomico e funzionale in diversi genotipi di vite mettendo a punto un dispositivo sperimentale di rilevamento della conducibilità idrica.

### IV.5.2 Materiali e metodi

Nelle prove sono state considerate piante adulte di tre vitigni, Cabernet Sauvignon, Sangiovese e Trebbiano toscano, ciascuno innestato su tre portinnesti: Franco (A), 1103P (P) e Kober 5BB (K). Su questo materiale è stata valutata la funzionalità dei fasci xilematici mediante il test della traslocazione di un tracciante colorato in soluzione acquosa (azosulfamide 1%). L'esame è stato condotto su tralci di piante di vite, sintomatiche l'anno precedente, prelevati prima e dopo la comparsa dei sintomi di mal dell'esca e su tralci di piante considerate sane. I tralci sono stati mantenuti nella soluzione colorata per 2-3 ore al termine delle quali sono state realizzate sezioni ogni 10 cm subito osservate a uno stereomicroscopio dotato di fotocamera digitale per l'acquisizione di immagini. Sulle foto delle sezioni trasversali, mediante analisi d'immagine è stata stimata la percentuale dell'area xilematica colorata dal passaggio del tracciante (Image tool 3.00). È stata inoltre misurata la porzione di tralcio percorsa dal tracciante.

### IV.5.3 Risultati

Le analisi del flusso xilematico nei tralci di vite realizzate nel triennio 2005-2007 sui tre vitigni in esame hanno dato risultati variabili negli anni. Infatti, i test della traslocazione, effettuati prima della comparsa dei sintomi, su tralci di piante sane e di piante sintomatiche negli anni precedenti, non hanno messo in evidenza differenze significative nel flusso xilematico del tralcio. Degno di nota sembra essere il caso di piante di Cabernet Sauvignon cronicamente sintomatiche in tutti gli anni di sperimentazione (2004-2006) le quali hanno

\* Università di Pisa email: landreini@sssup.it

**Tab. 1 - Altezza media (cm) raggiunta dal tracciante lungo i tralci prelevati all'allegagione e all'invaiaitura da piante di Cabernet Sauvignon (Colignola - PI) asintomatiche e infette\***

Tesi	Area xilematica colorata (%)	
	Allegagione - 13 giugno 2007	Invaiaitura - 11 luglio 2007
Vite asintomatica	45 a	55 a
Viti infette da 2 anni E05-06	30 a	29 a
Viti infette da 3 anni E04-05-06	22 b	26 a

\* Tralci prelevati all'allegagione (13 giugno 2007) e all'invaiaitura (11 luglio 2007) da piante di Cabernet Sauvignon (Colignola - PI) asintomatiche e infette da tre (E 2004-2005-2006) e due anni (E 2005-2006) e mantenuti nella soluzione colorata per 3 ore, espressa come valore assoluto (H) e percentuale della lunghezza del tralcio stesso (h). Percentuale media dell'area xilematica interessata dal passaggio del tracciante. Valori medi ± e.s. La separazione delle medie è stata fatta mediante la minima differenza significativa, LSD test, P ≤ 0,05.

mostrato una minore traslocazione del flusso (*tab. 1*), differenza che non è stata poi più riscontrata nel corso della stagione del 2007 (*fig. 1*). Dopo la comparsa dei sintomi fogliari del mal dell'esca, sono stati ottenuti risultati variabili. In Cabernet Sauvignon e Sangiovese non sono state osservate differenze tra piante infette e sane, mentre in Trebbiano toscano per due anni consecutivi è stata rilevata una minore entità del flusso di traslocazione dell'azosulfamide nei tralci infetti rispetto a quelli di controllo. Dalla valutazione qualitativa delle sezioni del tralcio si è potuto apprezzare nei tralci infetti una minore traslocazione del tracciante fin dalla porzione basale del tralcio.

Dopo la comparsa dei sintomi fogliari del mal dell'esca sono stati ottenuti risultati variabili. In Cabernet Sauvignon e Sangiovese non sono state osservate differenze tra piante infette e sane, mentre in Trebbiano toscano, per due anni consecutivi, è stata rilevata una minore entità del flusso di traslocazione dell'azosulfamide nei tralci infetti rispetto a quelli di controllo. Dalla valutazione qualitativa delle sezioni del tralcio, si è potuto apprezzare nei tralci infetti una minore traslocazione del tracciante fin dalla porzione basale del tralcio (*fig. 2*). In termini di percentuale, nel 2005 si è registrato che nel controllo il colorante raggiungeva circa il 70% della lunghezza del tralcio mentre nella tesi malata il tracciante arrivava ad un'altezza statisticamente inferiore rispetto al controllo, corrispondente al 47% della lunghezza totale del tralcio. L'analisi d'immagine svolta sulle sezioni dei tralci ha consentito inoltre di stimare la percentuale di xilema colorato dal tracciante. Prendendo in considera-



Fig. 2 - Sezioni trasversali e longitudinali, dalla porzione basale a quella più apicale, di tralci e piccioli, prelevati dopo la comparsa dei sintomi fogliari del mal dell'esca da piante sintomatiche e asintomatiche di Cabernet Sauvignon e mantenuti in un tracciante colorato

zione le sezioni realizzate ad un'altezza di 30 cm, la percentuale dell'area xilematica attiva, dopo due ore di permanenza nell'azosulfamide, era del 7% mentre nei tralci di controllo raggiungeva il 28% (*tab. 1*).

#### IV.5.4 Conclusioni

La porzione dei tessuti xilematici dei germogli non appaiono interessati prima della evidenziazione dei sintomi fogliari da ostruzione o impedimenti, mentre dopo la comparsa dei sintomi fogliari il germoglio portatore delle foglie sintomatiche ha risposto in maniera diversa a seconda del vitigno, in particolare qualche limitazione è emersa nel Trebbiano toscano, mentre nel Cabernet Sauvignon si ha una riduzione del flusso solo nelle piante che hanno manifestato una ripetizione dei sintomi negli anni, cosa che potrebbe aver determinato un indebolimento stabile della pianta.



Fig. 1 - Sezioni trasversali e longitudinali, dalla porzione basale a quella più apicale, di tralci prelevati da piante di Cabernet Sauvignon prima della comparsa dei sintomi fogliari del mal dell'esca e mantenuti in un tracciante colorato



## IV.6 Alterazioni istologiche degli internodi e dei piccioli fogliari

G. Scalabrelli\*, R. Gucci, G. Caruso, C. Bertolla, L. Andreini, R. Viti

Lo studio microscopico delle sezioni fini degli internodi e dei piccioli, campionati nel corso del triennio, dai vitigni Cabernet Sauvignon, Sangiovese e Trebbiano toscano, ha messo in evidenza differenti caratteristiche anatomiche, che sono apparse dipendenti dalla manifestazione della fitopatìa. La peculiarità principale dei tessuti vegetali interessati dalla malattia, ugualmente riscontrata nei tre genotipi studiati, è rappresentata dalla minore lignificazione dei tessuti, in particolare di quelli vascolari. Questo difetto è evidenziato dalla scarsa intensità della colorazione specifica che rivela la lignina (cristalvioletto). Nelle figure seguenti sono illustrate sezioni rappresentative dei risultati ottenuti in modo analogo nei tre vitigni.

Dall'anatomia delle sezioni trasversali degli internodi basali mediani e apicali del germoglio, emerge una minore intensità di colorazione degli elementi vascolari, indice di un minore ispessimento delle pareti dei vasi xilematici e delle cellule dei tessuti parenchimatici. Questo difetto risultava particolarmente evidente nelle sezioni di germogli di Sangiovese prelevati ad agosto, (maturazione degli acini) e che a quel momento presentavano sintomi fogliari acuti. In particolare, le sezioni trasversali di internodo mediano asintomatico evidenziano il normale ispessimento delle fibre sclerenchimatice della guaina del fascio rispetto ai tessuti di germogli affetti da mal dell'esca che sono caratterizzati, invece, da debole colorazione (fig. 1).

Analoghe caratteristiche sono state osservate nei tessuti di Trebbiano prelevati a luglio,

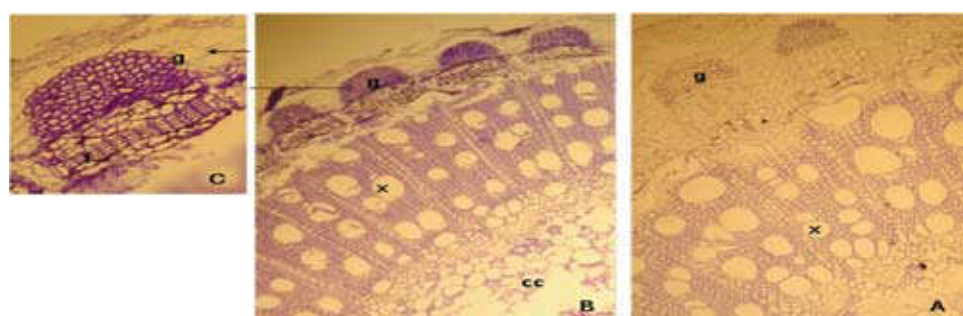


Fig. 1 - Cv. Sangiovese (1 agosto 2005): sezione trasversale di internodo mediano di tralcio infetto (A) e sano (B). Particolare della guaina del fascio (C) lignificata regolarmente; (cc = cilindro centrale; x = xilema; f = floema; g = guaina). Ingrandimento: A, B, C: x200

\* Università di Pisa email: gscalabrelli@agr.unipi.it

Fig. 2 - Cv. Trebbiano (11 luglio 2005): sezione trasversale di internodo apicale del germoglio, in cui si evidenzia la guaina del fascio (g), parzialmente lignificata in tessuto sano (A) e priva di ispessimenti nei tessuti che presentavano i primi sintomi del mal dell'esca (B). Ingrandimenti = A e B: x200 (x = vasi xilematici)

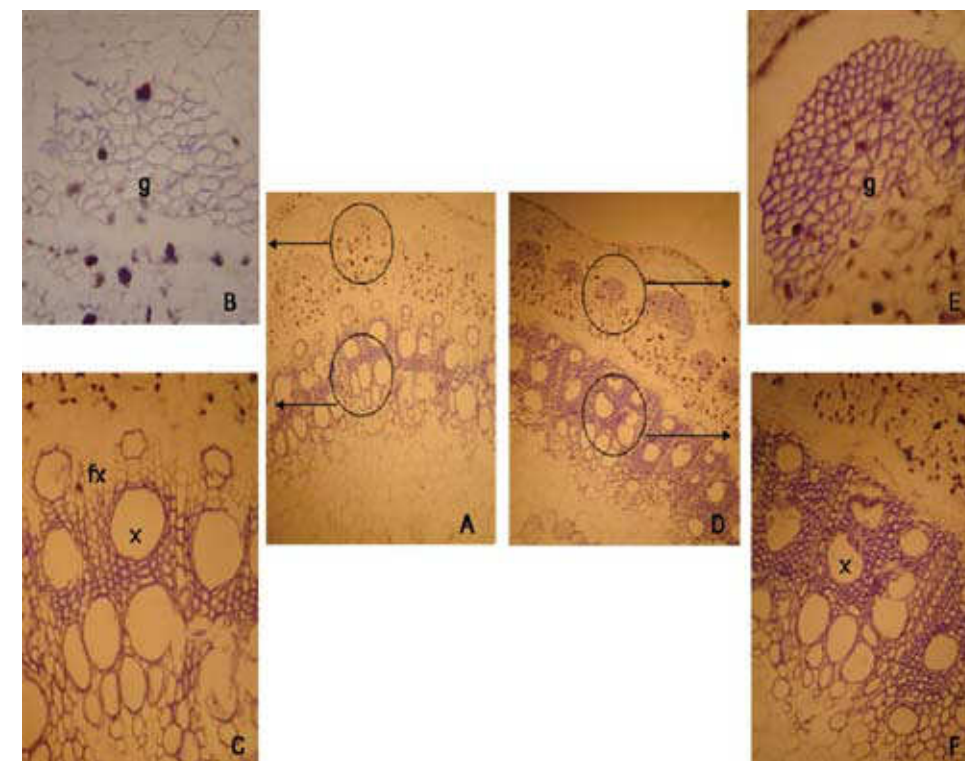
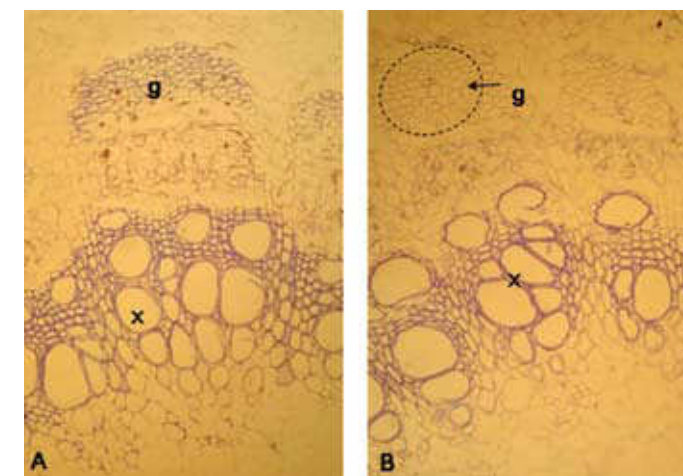


Fig. 3 - Cv. Trebbiano (22 luglio 2006): sezioni trasversali di internodi mediano-apicali del germoglio, in tessuto affetto da mal dell'esca (A) e sano (D). Nei tessuti malati (B, C), si evidenziano rispettivamente la guaina del fascio (g) e le fibre xilari (fx) prive di ispessimenti e i vasi xilematici (x) parzialmente lignificati. Ingrandimenti = A, D: x100; C, F: x200; B, E: x400

periodo in cui erano presenti sui germogli i sintomi cronici e acuti della sindrome. Nelle figg. 2 e 3 è possibile apprezzare come i campioni sintomatici erano caratterizzati da minore ispessimento delle pareti degli elementi vascolari (x), delle fibre xilari (fx) e dei tessuti della guaina dei fasci (g). Infatti, l'esame anatomico delle sezioni dei piccioli ha confermato quanto osservato a livello degli internodi, oltre a evidenziare specifiche caratteristiche che appaiono legate all'insorgenza del mal dell'esca.

Nelle sezioni trasversali di piccioli prelevati ad agosto da germogli di piante di Sangiovese (fig. 4) e Cabernet Sauvignon (fig. 5), in presenza di sintomi fogliari importanti,

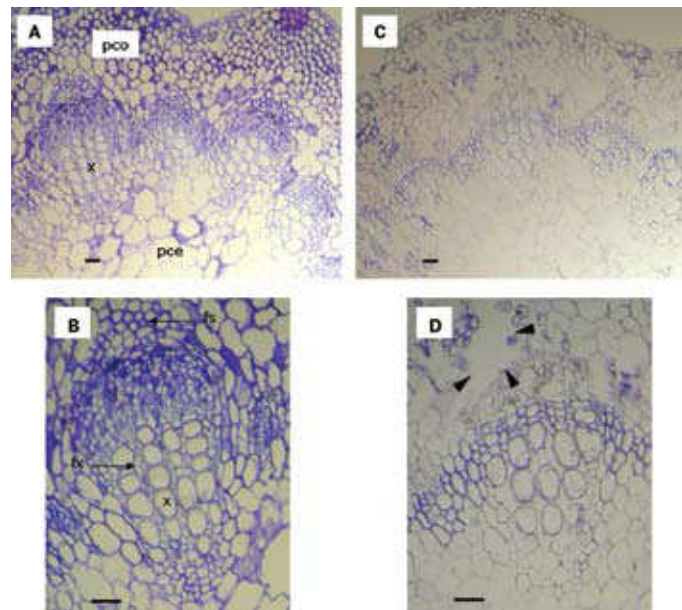


Fig. 4 - Sangiovese (maturazione 2005): particolari di fasci xilematici di piccioli di foglia sana su pianta sana (A) e di foglia sintomatica su pianta infetta (C) visti in sezione trasversale e rispettivi particolari in cui si evidenzia la minore lignificazione dei tessuti in viti colpite da mal dell'esca (B, D). Le frecce indicano un'area cellulare degradata. Legenda: pco = parenchima corticale; pce = parenchima centrale; x = xilema; fx = fibre dello xilema; fs = fibre sclerenchimatiche. Barra = 50 mm

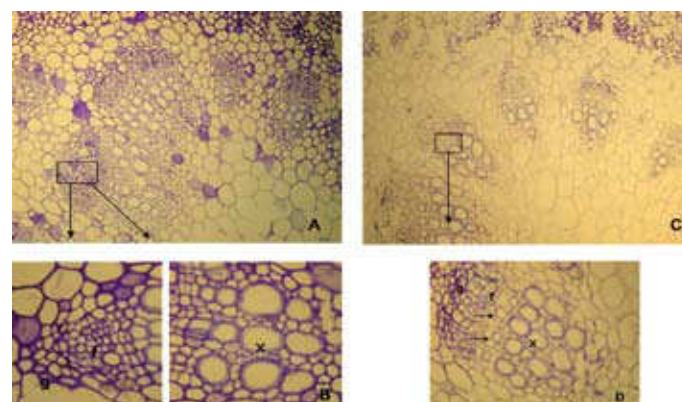


Fig. 5 - Cabernet Sauvignon (maturazione 2005): particolari di fasci xilematici di piccioli di foglia sana su pianta sana (A) e di foglia sintomatica su pianta infetta (C) visti in sezione trasversale e rispettivi particolari (B,D) da cui si evidenzia la minore lignificazione dei vasi xilematici (x), degli elementi del floema (f) e della guaina (g) dei tessuti colpiti da mal dell'esca. Le frecce indicano elementi vascolari di forma irregolare. Ingrandimenti = A, C: x100; B, D: x400

si osservano elementi vascolari meno lignificati rispetto ai tessuti di piccioli di foglie sane prelevate da piante asintomatiche. Inoltre nei tessuti infetti dei piccioli dei tre vitigni sono stati evidenziati vasi del meta-xilema di piccole dimensioni e con forma irregolare (fig. 5). Questi elementi vascolari hanno il lume del vaso di forma quadrangolare anziché circolare, proprietà che potrebbe indicare perdita di pressione e turgore del sistema conduttore.

In presenza di sintomi fogliari il parenchima centrale del picciolo di foglie di Sangiovese e Cabernet Sauvignon è risultato costituito da cellule prive di turgore con le pareti collassate (fig. 6). Le cellule del parenchima corticale del picciolo mostravano danni analoghi a quelli osservati nel parenchima del midollo centrale (fig. 6).

La metodologia utilizzata essendo stata confermata su tutte le piante che hanno manifestato sintomi di mal dell'esca potrebbe essere utilizzata come strumento di diagnosi precoce per il monitoraggio dello stato sanitario delle piante, in quanto è possibile individuare con largo anticipo la manifestazione dei sintomi (fino a quasi 2 mesi prima, nella nostra casistica).

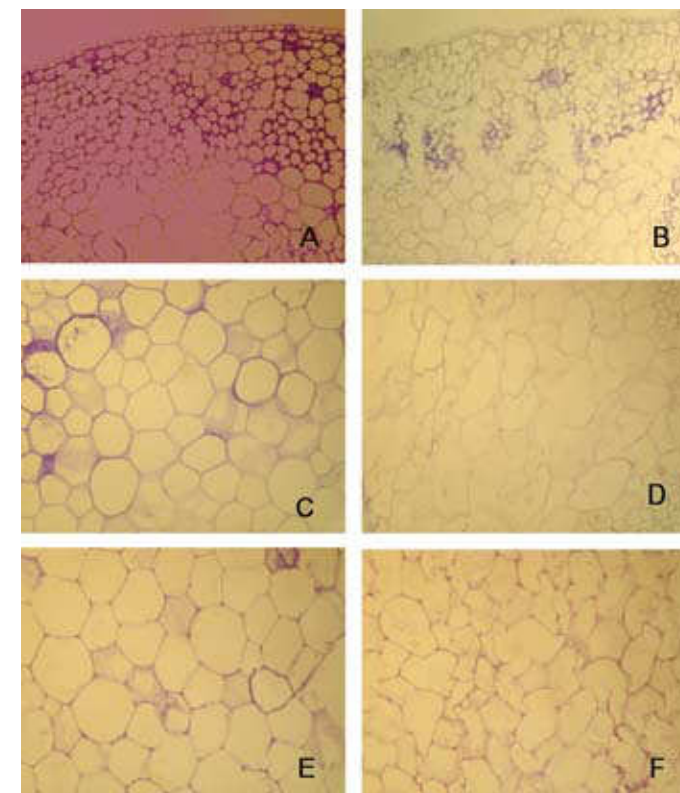


Fig. 6 - Particolari (1 agosto 2005) del collenchima di piccioli (A, B) e delle cellule del parenchima del midollo centrale (C, D) di piccioli di foglia sana su pianta sana (A, C) e di foglia sintomatica su pianta infetta da mal dell'esca (B, D). Cabernet Sauvignon (A, B, C, D) Sangiovese (E, F). Legenda: co = collenchima; pce = parenchima centrale. Ingrandimenti sezioni trasversali = A, C, D, E, F: x200; B: x100.

## IV.7 Espressione dei sintomi fogliari dell'esca in funzione della disponibilità di acqua nel suolo e germogliamento delle gemme

### IV.7.1 Monitoraggio di piante di vite in vaso

G. Surico\*, G. Marchi, L. Mugnai, F. Peduto

#### Introduzione

Nell'emisfero Nord i sintomi dell'esca compaiono normalmente fra giugno e agosto. Più precisamente, almeno il 70% delle piante ammalate rivelano il loro stato fitosanitario fra giugno e luglio. È poi verificato che, ad esempio, alle latitudini più basse della penisola italiana i primi sintomi fogliari possano comparire anche verso la fine di maggio-primi di giugno mentre in regioni più a nord del paese la comparsa dei sintomi è ritardata fino a luglio. In quest'ultimo caso agosto, e occasionalmente settembre, sono mesi in cui possono ancora manifestarsi numerosi casi di esca, incluso colpi apoplettici.

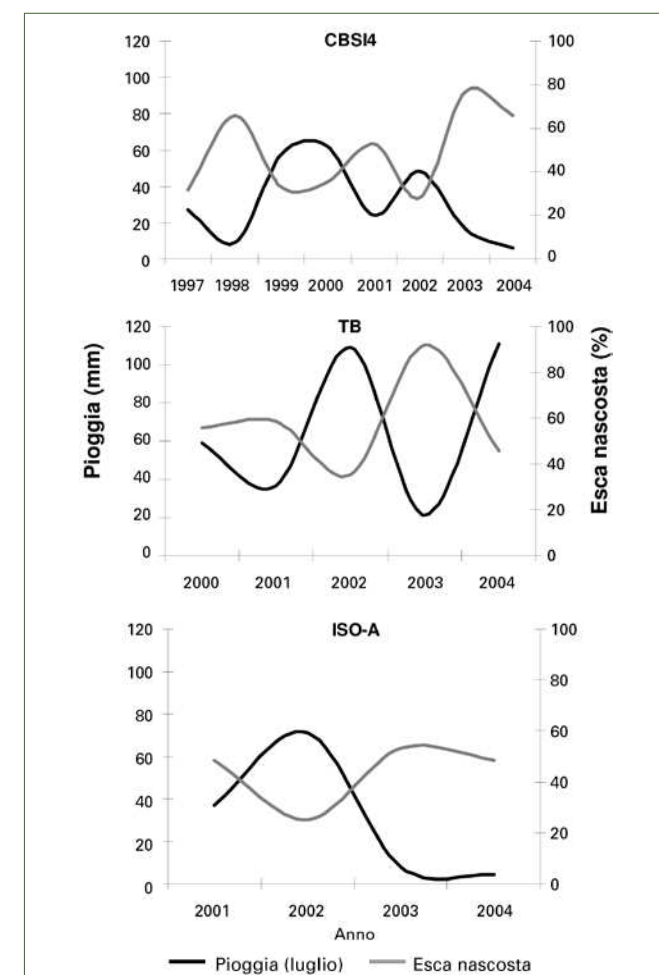
In questo contesto, due fattori stagionali che potrebbero influire sull'espressione dei sintomi fogliari dell'esca e, quindi, sulla percentuale relativa di esca manifesta (piante che, in un anno, manifestano sintomi fogliari) e di esca nascosta (piante ammalate che, in un anno, rimangono asintomatiche), sono la temperatura nei tre mesi considerati (giugno, luglio e agosto o maggio, giugno e luglio) e la piovosità. Allo scopo di verificare la possibile influenza sulla malattia di questi due elementi climatici l'incidenza delle viti sintomatiche in alcuni vigneti è stata confrontata con la pioggia caduta e con le temperature da giugno ad agosto. I dati relativi, raccolti nel triennio 1992-1994, sono riportati in *tab. 1*.

**Tab. 1 - Pioggia mensile, temperatura media e incidenza dell'esca manifesta in tre vigneti a San Casciano Val di Pesa (Firenze), dal 1992 al 1994**

Anno e mese	Periodi di pioggia	Numero di giorni con pioggia	Pioggia totale (mm)	Temperatura media	Esca manifesta (%) rilevata in settembre
1992	giugno	3	94	18,6	46,43
	luglio	3	109	22,3	
	agosto	2	41	24,1	
1993	giugno	5	90	21,2	63,27
	luglio	3	15	22,5	
	agosto	4	67	24,5	
1994	giugno	2	59	19,7	19,62
	luglio	3	71	25,0	
	agosto	0	0	24,9	

\* Università di Firenze email: giuseppe.surico@unifi.it

*Fig. 1 - Relazione tra la quantità di pioggia caduta nel mese di luglio e la percentuale di piante malate che non manifestano sintomi fogliari di esca (esca nascosta) in 3 vigneti ubicati nelle province di Siena (CBSI4), Ravenna (TB) e Firenze (ISO-A), rispettivamente*



L'esame dei dati in *tab. 1* non ha consentito di ricavare una chiara correlazione tra comparsa dei sintomi e piovosità/temperatura dell'aria. Tuttavia, è stata colta l'impressione che un'estate fresca, ma non molto, e piovosa fosse favorevole alla comparsa dei sintomi fogliari dell'esca. Ad esempio, nel 1993, quando l'esca manifesta è stata del 63,27%, giugno e agosto, ma non luglio, sono stati piuttosto piovosi. Invece, nel 1994, anno con la più bassa percentuale di esca manifesta del triennio considerato, la stagione è stata abbastanza asciutta (130 mm di pioggia nel trimestre contro 172 mm nel 1993 e 244 nel 1992) e calda (media delle temperature medie di 23,2°C). Nel 1992, anno di maggiore piovosità, c'era da attendersi, nel caso che questo elemento avesse un significato concreto, una percentuale di esca manifesta più alta che nel 1994; invece, è risultata solo del 46,43% (molto più alta, comunque, che nel 1994). Forse, il fattore limitante è stato in questo caso una temperatura un po' più bassa (21,67, media del trimestre, contro 22,73 nel 1993).

Risultati più significativi di quelli ora commentati sono stati ottenuti quando sono stati esaminati i dati di tre altri vigneti, rispettivamente in provincia di Siena (CBSI4), Ravenna (TB) e Firenze (ISO-A) (Marchi *et al.*, 2006). Il vigneto a Siena è stato monitorato dal 1997 al 2004, quello a Ravenna dal 2000 al 2004 e il terzo, a Firenze, dal 2001 al 2004. I dati elaborati sono riportati nella *fig. 1*. I grafici che si riferiscono ai tre vigneti chiaramente mostrano la correlazione

negativa fra quantità di pioggia caduta nel mese di luglio e la percentuale di esca nascosta. Con altre parole, all'aumentare della pioggia caduta aumenta la quantità di esca manifesta (o, al contrario, diminuisce la quantità di esca nascosta) e, viceversa, al diminuire della quantità di pioggia caduta diminuisce la quantità di esca manifesta (o aumenta la quantità di esca nascosta).

Risultati che suggeriscono un effetto positivo della pioggia sulla comparsa dei sintomi fogliari sono stati ottenuti anche da Gubler e collaboratori in California (Eskalen *et al.*, 2005a).

Allo scopo di raccogliere ulteriori informazioni rivolte alla validazione dell'ipotesi sulla correlazione fra quantità di acqua disponibile nel suolo e comparsa dei sintomi fogliari di esca sono state svolte alcune prove su piante di vite in vaso.

**Materiali e metodi**

Dal 1997 al 2002 sono state tenute sotto osservazione per la comparsa di sintomi dell'esca 16 piante della cv. Sangiovese di 22 anni di età e sicuramente ammalate di esca. Le piante erano state in precedenza estirpate e trapiantate in vasi di plastica da 200 litri contenenti sabbia di fiume. I vasi sono stati collocati in piena aria, in un giardino retrostante un laboratorio della Sezione di Patologia vegetale a Sesto Fiorentino (FI).

Tutte le piante sono state irrigate ogni 4-5 giorni da aprile a giugno. In luglio sono stati formati 3 gruppi di piante (2 da 5 e uno da 6 piante) e alle piante di ciascun gruppo è stata somministrata la seguente quantità di acqua:

1. da 10 a 40 l di acqua per vaso alla comparsa dei primi segni di stress idrico;
2. 10 l per vaso ogni 7 giorni;
3. 10 l per vaso ogni 15 giorni.

Le osservazioni, cominciate nel 1997, sono state ripetute per sei anni fino al 2002. Il rilievo di eventuali sintomi è stato effettuato pressoché settimanalmente, dal 15 giugno al 15 settembre di ciascun anno.

In tutto il periodo delle prove non sono stati mai osservati sintomi fogliari dell'esca o fenomeni di avvizzimento totale o parziale. Nel 2003 la prova non è stata ripetuta e le piante sono state abbandonate. Su alcune di queste piante si sono poi sviluppati, nel giro di 2-3 anni, carpofori di *Fomitiporia mediterranea* di notevoli quanto inusuali dimensioni.

La prova è stata ripetuta nel 2005. In questo caso, nel mese di febbraio, 50 piante di 23 anni della cv. Cabernet Sauvignon, tutte con sintomi fogliari nella stagione precedente, sono state estirpate da un vigneto in provincia di Firenze e trapiantate in vasi di plastica nera da 200 l. Trenta vasi contenevano terriccio acquistato in vivaio (TV); gli altri 20 sono stati invece riempiti con terreno argilloso (TA) prelevato da un vigneto a Bagno a Ripoli, in provincia di Firenze. Sul fondo di ogni contenitore è stato predisposto uno spesso strato di argilla espansa (LECA), al fine di evitare fenomeni di ristagno idrico. Le piante sono state potate a un unico sperone, con 2-3 gemme.

I vasi sono stati collocati, anche questa volta, in piena aria, presso il Dipartimento di Ortoflorofruitticoltura a Sesto F.no, disposti in modo da formare 5 file di 10 vasi ciascuna (fig. 2; tab. 2). Nei pressi del Dipartimento è funzionante una centralina per la raccolta automatica di dati climatici e meteorologici.



Fig. 2 - Piante di vite in vaso, cv. Cabernet Sauvignon, a Sesto Fiorentino (FI)

Tab. 2 - Schema dei filari con piante di vite in vaso a Sesto F.no (FI)*				
Filare 1	Filare 2	Filare 3	Filare 4	Filare 5
1 TA	11 TA	21 TA	31 TV	41 TV
2 TA	12 TA	22 TA	32 TV	42 TV
3 TA	13 TA	23 TA	33 TA	43 TV
4 TA	14 TA	24 TA	34 TV	44 TV
5 TA	15 TV	25 TV	35 TV	45 TV
6 TA	16 TV	26 TV	36 TV	46 TV
7 TA	17 TV	27 TV	37 TV	47 TV
8 TA	18 TV	28 TV	38 TV	48 TV
9 TA	19 TV	29 TV	39 TV	49 TV
10 TA	20 TA	30 TV	40 TV	50 TV

\* TA = terreno argilloso; TV = terreno di vivaio.

Fino alla metà di aprile le piante sono state irrigate quando necessario. Successivamente hanno ricevuto circa 6,7 litri di acqua al giorno, somministrati per mezzo di un impianto di irrigazione a goccia temporizzato fatto funzionare 2 volte al giorno per 20 minuti. La portata del sistema di irrigazione era di 10 l/ora.

I rilievi sulle viti sono cominciati la metà di aprile e sono continuati fino al 15 settembre circa. Le piante sono state regolarmente concimate e trattate, quando necessario, con prodotti antioidici e antiperonosporici.

La prova è stata ripetuta nel 2006, nel 2007 e nel 2008. In quest'ultimo anno sono state cambiate le condizioni della prova: un filare di 10 piante (da P41 a P50) è stato irrigato come negli anni precedenti (circa 6,7 litri di acqua/giorno). Le piante dei restanti filari sono state invece irrigate solo alla comparsa dei primi segnali di stress idrico. Il 30 luglio la prova è stata interrotta e si è ritornato a irrigare le piante come negli anni precedenti.

**Risultati**

**2005.** Nel 2005 il risveglio vegetativo delle piante è avvenuto con qualche settimana di ritardo rispetto al normale (dall'ultima settimana di aprile alla prima quindicina di maggio e anche oltre) ed è stato molto variabile da pianta a pianta. In totale, hanno rivegetato 13 viti (su 20) nel terreno argilloso (65%) e 26 (su 30) (ca. 87%) nel terreno di vivaio (*tab. 3*). Due piante hanno prodotto tralci solo dal piede della pianta (P 10 su terreno argilloso e P15 su terreno di vivaio). Queste piante sono state escluse dai calcoli percentuali sulla comparsa dei sintomi fogliari nell'anno qui considerato. Le piante che non hanno rivegetato sono state P2, P3, P5, P7, P13, P16, P20, P24, P25, P40, P48 (7 in TA e 4 in TV).

I primi sintomi fogliari di esca sono stati osservati verso la metà di giugno (20.06.2005) su 5 viti, tutte in terreno di vivaio. Il numero di viti sintomatiche è aumentato gradualmente in luglio, è poi rimasto pressoché costante in agosto. In settembre non si sono avuti altri casi di viti sintomatiche (*fig. 3*). In totale 29 viti su 37 (78,38%) hanno presentato sintomi di esca, 9 su 12 in terreno

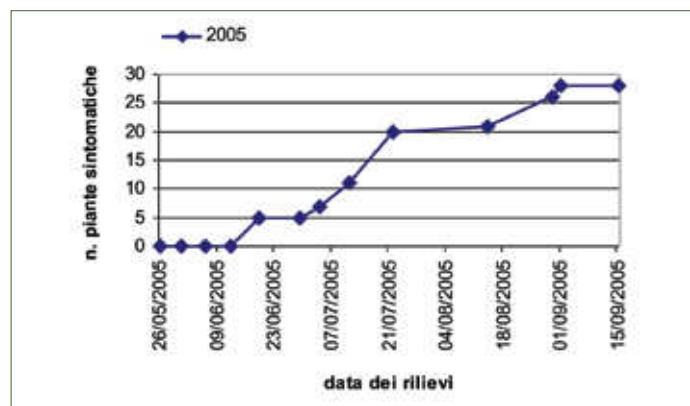


Fig. 3 - Andamento nel 2005 della comparsa dei sintomi fogliari di esca sulle piante di Cabernet Sauvignon in vaso

Filare 1	Filare 2	Filare 3	Filare 4	Filare 5
1 TA	11 TA	21 TA	31 TV	41 TV
	12 TA	22 TA	32 TV	42 TV
		23 TA	33 TA	43 TV
4 TA	14 TA		34 TV	44 TV
	15 TV*		35 TV	45 TV
6 TA		26 TV	36 TV	46 TV
	17 TV	27 TV	37 TV	47 TV
8 TA	18 TV	28 TV	38 TV	
9 TA	19 TV	29 TV	39 TV	49 TV
10 TA*		30 TV		50 TV

\* Ricacci solo dal piede della pianta.

argilloso (75%) e 20 su 25 in terreno di vivaio (80%). Tutte le viti hanno formato grappoli di cui però non si è potuto seguire la completa evoluzione a causa di danni da uccelli.

**2006.** Nel 2006 la ripresa vegetativa è cominciata nella seconda metà di marzo. Al rilievo del 7 aprile: 5 piante (3 in terreno di vivaio e 2 in terreno argilloso) si trovavano nello stadio di 'punta verde' (3 sintomatiche l'anno precedente e 2 asintomatiche) e 8 in quello di 'gemma cotonosa' (5 sintomatiche l'anno precedente e 3 asintomatiche). Tutte le altre piante erano ancora nello stadio di gemma ferma. Al rilievo successivo (21 aprile) 17 piante erano ancora nello stadio di 'gemma cotonosa' (14 sintomatiche l'anno precedente e 3 asintomatiche). Al rilievo del 1° maggio tutte le piante, eccetto due (entrambe sintomatiche nel 2005), erano in vegetazione, negli stadi di "germogliamento" (fuoriuscita delle foglioline raccolte a rosetta) o "grappoli separati" (*tab. 4*). Delle nove piante asintomatiche nel 2005, 8 erano nello stadio "grappoli separati" e una sola nello stadio "grappoli visibili". Delle piante sintomatiche 1 era nello stadio di "foglie distese"; 5 in quello di "grappoli visibili" e tutte le altre in quello di "grappoli separati".

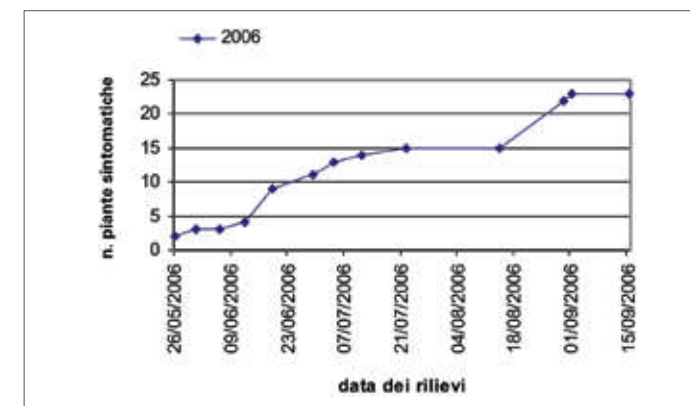


Fig. 4 - Andamento nel 2006 della comparsa dei sintomi fogliari di esca sulle piante di Cabernet Sauvignon in vaso

Filare 1	Filare 2	Filare 3	Filare 4	Filare 5
1 TA	11 TA	21 TA	31 TV	41 TV
	12 TA	22 TA	32 TV	42 TV
		23 TA		43 TV
4 TA	14 TA		34 TV	44 TV
	15 TV*		35 TV	45 TV
6 TA		26 TV	36 TV	46 TV
	17 TV	27 TV	37 TV	47 TV
8 TA	18 TV	28 TV	37 TV	
9 TA	19 TV	29 TV	39 TV	49 TV
10 TA*		30 TV	40 TV	50 TV

\* Ricacci solo dal piede della pianta. La pianta P40, data per morta nel 2005, ha rivegetato nel 2006. Le piante P33 e P38 non hanno germogliato.

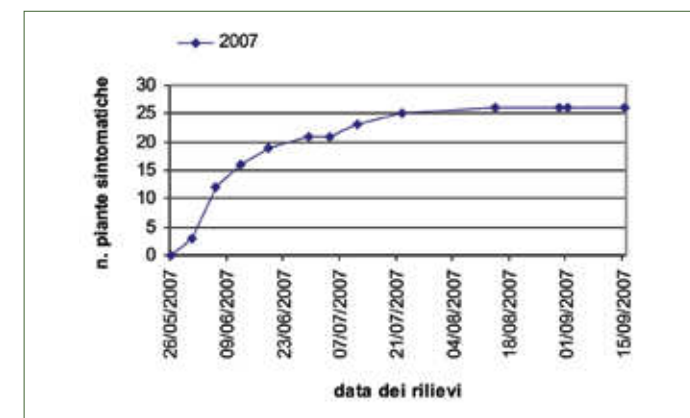
In generale, le piante sintomatiche nel 2005 hanno avuto una ripresa vegetativa un po' più stentata rispetto a quelle asintomatiche ma il fenomeno è stato tutt'altro che eclatante. È accaduto, infatti, che talune piante sintomatiche nel 2005 hanno addirittura rivegetato prima e meglio di piante asintomatiche nel 2005. Due piante (P33 su terreno argilloso e P38 su terreno di vivaio, entrambe sintomatiche ma non apoplettiche nel 2005) non hanno rivegetato e 2 (P10 e P15) hanno vegetato, come nel 2005, solo dal piede della pianta. Queste ultime 2 piante non sono state incluse nei calcoli delle percentuali. La pianta 40, data per morta nel 2005, ha vegetato regolarmente nel 2006.

Per quanto riguarda la comparsa dei primi sintomi, già al rilievo del 26 maggio 2 piante (P18 e P23), una in terreno di vivaio e l'altra in terreno argilloso, hanno presentato sintomi di esca (fig. 4). Al rilievo di metà giugno le piante sintomatiche erano 8 su 36 (22,22%) mentre a quello di metà luglio sono risultate 15 (41,67%). Alla fine della prova la percentuale di piante infette è stata del 61,11% (22 piante sintomatiche su 36). Delle piante in terreno argilloso il 63,64% ha manifestato sintomi (7 piante su 11); la percentuale di piante sintomatiche in terreno di vivaio è stata invece del 60,00% (15 piante su 25).

**2007.** Tutte le piante, tranne una (P22 su terreno argilloso, sintomatica nel 2006 ma non nel 2005), hanno germogliato entro il mese di aprile con un andamento simile a quello descritto nel 2006: molto variabile da pianta a pianta ma senza alcuna evidente correlazione con la comparsa o meno di sintomi nel 2006 e con il tipo di terreno utilizzato per riempire i vasi. In totale le piante oggetto del rilievo sono state 35 (tab. 5; 37 piante in piedi meno 2 - P15 e P19 - con ricacci dal basso e incluso la pianta P10, con sintomi sui ricacci dal basso: vedi dopo). La pianta P19 ha emesso germogli solo dal portinnesto; per questo motivo è stata considerata morta.

Al rilievo del 25 maggio sono state osservate tre piante (tutte in terreno argilloso) con sintomi di esca (fig. 5). L'8 giugno erano 12 (6 in terreno argilloso; altrettante in terreno di vivaio); 16 il 14 giugno. A metà luglio altre 9 piante sintomatiche si sono aggiunte alle

Fig. 5 - Andamento nel 2007 della comparsa dei sintomi fogliari di esca sulle piante di Cabernet Sauvignon in vaso



precedenti. Dalla metà di luglio al 27 agosto il numero di piante sintomatiche è aumentato di solo due unità (in totale, a questa data, 26 piante). All'ultimo rilievo (13 settembre) non sono state contate altre piante sintomatiche. Delle tre piante che avevano vegetato dal basso, una (P10 su terreno argilloso) è apparsa asintomatica il 10 luglio e sintomatica tre giorni dopo. La pianta P10 è stata così inclusa nel calcolo della percentuale di piante sintomatiche che è risultata del 77,14% (27 piante sintomatiche su 35): 9 su 11 in terreno argilloso (81,82%) e 18 su 24 in terreno di vivaio (75,00%).

**2008.** In questo anno il numero delle piante si è ridotto ulteriormente. Infatti, ben 7 piante non hanno rivegetato (P1, P23, P27, P28, P37, P39, P43), tutte sintomatiche nel 2007 (una apoplettica). In particolare, 6 piante non rivegetate avevano manifestato sintomi in tutti e tre gli anni precedenti (tab. 6). [Comunque, altre 8 piante sempre sintomatiche (P12, P17, P21, P29, P32, P45, P46 e P47) hanno rivegetato regolarmente.] Inoltre, la pianta P14 ha

Filare 1	Filare 2	Filare 3	Filare 4	Filare 5
1 TA	11 TA	21 TA	31 TV	41 TV
	12 TA		32 TV	42 TV
		23 TA		43 TV
4 TA	14 TA		34 TV	44 TV
	15 TV*		35 TV	45 TV
6 TA		26 TV	36 TV	46 TV
	17 TV	27 TV	37 TV	47 TV
8 TA	18 TV	28 TV		
9 TA		29 TV	39 TV	49 TV
10 TA*		30 TV	40 TV	50 TV

\* Ricacci dal piede della pianta. P22, non ha germogliato.

Pianta	Anno dei rilievi			
	2005	2006	2007	2008
P1	asintomatica	asintomatica	sintomatica	morta
P14	sintomatica	sintomatica	sintomatica	morta
P23	sintomatica	sintomatica	sintomatica	morta
P27	sintomatica	asintomatica	sintomatica	morta
P28	sintomatica	sintomatica	sintomatica	morta
P37	sintomatica	sintomatica	sintomatica	morta
P39	sintomatica	sintomatica	sintomatica	morta
P43	sintomatica	sintomatica	apoplettica	morta

**Tab. 7 - Schema delle piante in piedi nel 2008**

Filare 1	Filare 2	Filare 3	Filare 4	Filare 5
	11 TA	21 TA	31 TV	41 TV
	12 TA		32 TV	42 TV
4 TA			34 TV	44 TV
	15 TV*		35 TV	45 TV
6 TA		26 TV	36 TV	46 TV
	17 TV			47 TV *
8 TA	18 TV			
9 TA	19 TV**	29 TV		49 TV
10 TA*		30 TV	40 TV	50 TV

\* Ricacci dal piede della pianta. \*\* Ricacci solo dal portinnesto. Non hanno rivegetato P1, P14, P23, P27, P28, P37, P39, P43. P15, sintomatica nel 2008, è stata inclusa nei conteggi delle piante sintomatiche.

prodotto due germogli che sono però avvizziti nel giro di una settimana, e per questo è stata inclusa fra le piante non rivegetate. Infine, la pianta P47 ha vegetato solo dal basso. In totale, rimanevano in piedi solo 27 piante (ca. 70%) delle piante trapiantate e vegetate nel 2005 (tab. 7).

Anche nel 2008 il germogliamento è apparso molto variabile da pianta a pianta e anche in questo anno non è emersa alcuna particolare correlazione fra germogliamento e comparsa o meno di sintomi nel 2007 o negli anni precedenti e con il tipo di terreno utilizzato per riempire i vasi.

Al rilievo del 3 giugno nessuna pianta è risultata sintomatica. Il 10 giugno una pianta (P42), del filare irrigato, mostrava foglie tigrate. Rispetto, quindi, al 2007 e al 2006, c'è stato un certo ritardo nella comparsa dei sintomi (già prima della fine di maggio in questi due anni; fra il 3 e il 10 giugno nel 2008: approssimativamente 12 giorni di ritardo). Il 20 giugno la percentuale di piante sintomatiche è risultata del 10% nei filari non irrigati e del 71,43% nel filare irrigato. Il 12 luglio la percentuale delle piante in asciutto sintomatiche è salita al 30% e quella delle piante irrigate all'85,71% (6 piante sintomatiche su 7). Una pianta (P31, non irrigata) è apparsa apoplettica il 21 giugno. Al rilievo del 22 agosto tutte le piante del filare irrigato erano sintomatiche (100%); 9 su 20 piante (dal conteggio è stata esclusa solo la pianta P19, ma non P10 e P15, sintomatiche nel 2008) in asciutto fino al 30 luglio e poi regolarmente irrigate, sono risultate sintomatiche (45%). Il 5 settembre il numero delle piante sintomatiche è rimasto inalterato. Invece, il 19 settembre il numero delle piante in asciutto fino al 30 luglio è salito a 13 (65%).

Dal ripristino dell'irrigazione e fino al 19 settembre la percentuale di piante in asciutto sintomatiche è quindi più che raddoppiata.

### Conclusioni

I dati riportati (riassunti, in forma semplificata nella tab. 8) sembrano quindi indicare che l'ipotesi avanzata già nel 2000 e confermata nel 2006, cioè che un'estate relativamente fresca e piovosa possa favorire la comparsa dei sintomi fogliari dell'esca, possa ritenersi sufficientemente sostenuta da dati sperimentali. In particolare, le prove in vaso sembrano effettivamente dimostrare che un elevato e regolare apporto di acqua a piante ammalate di esca possa favorire l'espressione della malattia.

I dati raccolti sul numero di piante sintomatiche appaiono ancora più esplicativi se si confrontano con gli scarti fra esca manifesta e esca cumulata rilevata direttamente in vigneto, ad esempio un vigneto a Gambassi Terme (FI) (tab. 9). Dai dati in tabella intanto si

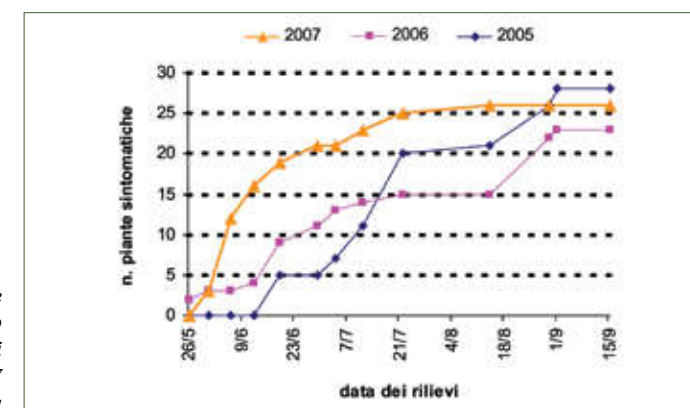


Fig. 6 - Rappresentazione grafica dell'andamento dei sintomi fogliari negli anni 2005, 2006 e 2007 della prova

**Tab. 8 - Percentuali delle piante sintomatiche a diverse date negli anni 2005-2008**

Data del rilievo	2005	2006	2007	2008	
				asciutto	bagnato
30 maggio	0	8,57	8,82	0	0
14 giugno	0	22,86	47,06	0	14,28
20 giugno	10,81	25,71	55,88	10,00	71,43
28 giugno	20,00	31,43	61,76	20,00	71,43
11 luglio	32,43	40,00	67,65	30,00	71,43
20 luglio	56,76	42,86	75,53	30,00	71,43
30 luglio	n.d.	n.d.	n.d.	30,00	71,43
16 agosto	59,46	42,86	76,47	45,00	87,50
30 agosto	72,97	62,86	76,47	45,00	87,50
5 settembre	78,38	62,86	79,41	n.d.	n.d.
15 settembre	78,38	62,86	79,41	45,00	87,50
19 settembre	78,38	62,86	79,41	65,00	100,00

**Tab. 9 - Percentuali delle piante sintomatiche a diverse date negli anni 1995-1998**

Anno	Incidenza annuale (%)	Incidenza cumulata (%)	Esca nascosta (%)	% Esca nascosta sull'incidenza cumulata
1995	11,11	33,40	22,29	66,74
1996	18,60	40,50	21,90	54,07
1997	11,20	45,32	34,12	75,29
1998	12,83	49,90	37,07	74,29

**Tab. 10 - Andamento della manifestazione di esca nelle piante in vaso a Sesto F.no (FI)**

Anno	Incidenza annuale (%)	Incidenza cumulata (%)	Esca nascosta (%)	% Esca nascosta sull'incidenza cumulata
2005	78,38	100,00	21,62	21,62
2006	61,11	100,00	38,89	38,89
2007	77,14	100,00	22,86	22,86
2008	87,50 *	100,00	12,50	12,50

\* Percentuale calcolata solo per il filare irrigato.

evinces che un anno non è mai uguale all'altro e che gli andamenti dei due tipi di esca (manifesta e cumulata) ora si avvicinano, ora si allontanano uno dall'altro: si avvicinano quando la stagione è piovosa, si allontanano quando è secca. Se poi si valuta la frazione di esca che rimane nascosta rispetto all'incidenza totale (cumulata), si ricava che ogni anno la percentuale di piante ammalate che non manifesta sintomi fogliari è normalmente ben più alta del 50% dell'incidenza totale di esca (tab. 9). Nel caso, invece, delle prove in vaso, la percentuale di piante che non ha manifestato sintomi (esca nascosta) solo nel 2006 è apparsa abbastanza elevata, comunque più bassa di quella normalmente rilevabile in campo (tab. 10). Questi dati confermano quanto già ipotizzato in precedenza (Surico *et al.*, 2000a) e cioè che la frazione di esca che rimane nascosta sarà, ovviamente, minore tutte le volte che la stagione decorre favorevole alla comparsa dei sintomi fogliari.

Un altro dato che si può richiamare a conferma del ragionamento che qui si sta facendo è la tendenza di una pianta ammalata a manifestare con regolarità i sintomi fogliari. Era stato osservato, e dati più recenti lo confermano, che una pianta che ha manifestato sintomi di esca in un dato anno può non rimanergli nell'anno successivo o anche per 2, 3 e fino a 5-6 e più anni successivi. E la percentuale di piante che tendono a manifestare i sintomi fogliari ogni anno è davvero bassa. Ad esempio, in un rilievo che ha interessato gli anni dal 1993 al 1998 sono state seguite nel dettaglio 86 viti in campo, rilevando 29 comportamenti diversi delle piante (Surico *et al.*, 2006a). In particolare, il 26,74% delle piante ha manifestato sintomi solo nel primo anno dei rilievi (1993), mentre solo il 2,32% ha manifestato sintomi in tutti e sei gli anni monitorati. Se però si considerano periodi di tre anni consecutivi la percentuale sale al 6,17% (1993-95), 7,3% (1994-96), 5,0% (1995-97), 15,47% (1996-98). Comunque, tutte percentuali più basse di quella rilevata nella prova in vaso nel periodo 2005-2007 (nel quarto anno è stato cambiato il regime idrico).

Infatti, nelle prove in vaso (in tab. 11 i risultati complessivi) 16 piante su 38 risultate sintomatiche nel corso delle prove (42,1%) hanno manifestato sintomi in tutte e tre i primi anni

**Tab. 11 - Andamento della comparsa dei sintomi, dal 2005 al 2008, sulle piante di Cabernet Sauvignon in vaso**

Numero	Pianta	2005	2006	2007	2008
P1	1 (TA)	A	A	S	X
P2		Non germogliata dopo il trapianto in vaso			
P3		Non germogliata dopo il trapianto in vaso			
P4	2 (TA)	S	A	A	A
P5		Non germogliata dopo il trapianto in vaso			
P6	3 (TA)	S	S	S	S
P7		Non germogliata dopo il trapianto in vaso			
P8	4 (TA)	A	A	A	S
P9	5 (TA)	S	S	S	S
P10	(TA)	Germogliamento dalla base nel 2005: sintomatica nel 2007 e nel 2008			
P11	6 (TA)	S	A	S	S
P12	7 (TA)	S	S	S	Cp
P13		Non germogliata dopo il trapianto in vaso			
P14	8 (TA)	S	S	S	A
P15	(TV)	Germogliamento dalla base nel 2005: sintomatica nel 2008			
P16		Non germogliata dopo il trapianto in vaso			
P17	9 (TV)	S	S	S	S
P18	10 (TV)	A	S	A	A
P19	11 (TV)	A	A	X	A
P20		Non germogliata dopo il trapianto in vaso			
P21	12 (TA)	S	S	S	S
P22	13 (TA)	A	S	S	A
P23	14 (TA)	S	S	Cp	X
P24		Non germogliata dopo il trapianto in vaso			
P25		Non germogliata dopo il trapianto in vaso			
P26	15 (TV)	A	S	S	S
P27	16 (TV)	S	A	S	X
P28	17 (TV)	S	S	S	X
P29	18 (TV)	S	S	S	S
P30	19 (TV)	S	S	S	A
P31	20 (TV)	A	A	S	Cp
P32	21 (TV)	S	S	S	S
P33	22 (TA)	S	X	X	X
P34	23 (TV)	S	A	A	A
P35	24 (TV)	A	A	A	A
P36	25 (TV)	S	S	A	A
P37	26 (TV)	S	S	S	X
P38	27 (TV)	S	X	X	X
P39	28 (TV)	S	S	S	X
P40	29 (TV)	X(?)*	A	S	A
P41	30 (TV)	S	A	A	S
P42	31 (TV)	S	S	A	S
P43	32 (TV)	S	S	Cp	X
P44	33 (TV)	S	A	S	S
P45	34 (TV)	S	S	S	S
P46	35 (TV)	S	S	S	S
P47	36 (TV)	S	S	S	A
P48		Non germogliata dopo il trapianto in vaso			
P49	37 (TV)	S	A	S	S
P50	38 (TV)	S	A	S	S

\* P40, non germogliata dopo il trapianto in vaso, ma germogliata nel 2006.

Legenda: A = asintomatica; S = sintomatica; X = pianta morta; Cp = colpo apoplettico; TA = terreno argilloso; TV = terreno di vivaio.



delle prove. Solo 2 piante (5%) (P8, P35) sono risultate asintomatiche in tutti e tre gli anni mentre 6 piante (15%) ha manifestato sintomi un solo anno su tre. Infine, i colpi apoplettici (sempre, comunque preceduti da sintomi fogliari per una decina di giorni) sono stati soltanto quattro (due nel 2007: P23 e P43; due nel 2008, P12 e P31) mentre le piante che non hanno rivegetato in primavera (falsa apoplezia o apoplezia nascosta) sono state in totale 12 (2 nel 2006; 2 nel 2007 [inclusa, in questo caso, la pianta P19] e 8 nel 2008). Delle piante non rivegetate nel 2008, ben 6 sono risultate sintomatiche nei tre anni precedenti; una sintomatica in due su tre e 1 sintomatica un solo anno. Tutte erano risultate sintomatiche nel 2007, una era stata colpita da apoplezia. Sembra quasi che la ripetizione dei sintomi da un anno all'altro debiliti la pianta fino al punto da comprometterne il risveglio vegetativo

Un abbondante e regolare apporto di acqua sembra dunque favorire la comparsa dei sintomi fogliari di esca e ridurre la loro fluttuazione da un anno all'altro.

È stato poi confermato che la manifestazione della malattia tende a concentrarsi in massima parte in giugno-luglio; mentre i primi sintomi possono comparire (almeno nell'ambiente della prova) grosso modo 50-60 giorni dopo il germogliamento. Comunque, per quel che riguarda la dinamica della comparsa dei sintomi fogliari essa è apparsa diversa in tutti e tre gli anni (fig. 6). Ad esempio, nel 2005 (in questo primo anno le piante trapiantate hanno germogliato con notevole ritardo rispetto alle piante in campo) i primi sintomi sono comparsi solo intorno alla metà di giugno; il numero di piante sintomatiche è andato poi gradualmente aumentando fino al termine della prova (15 settembre) attestandosi sul 78,38%. Invece, nel 2006 i primi sintomi sono comparsi già verso la fine di maggio; successivamente il numero di piante sintomatiche è andato aumentando, ma meno che nel 2005 (61,11% la percentuale finale di piante sintomatiche). Nel 2007, tutte le piante che sono risultate sintomatiche (77,14%) hanno manifestato i loro sintomi fogliari entro la seconda decade di luglio, ma in massima parte in giugno. Infine il 2008; in questo anno sono state cambiate le condizioni della prova (vedi Materiali e Metodi). Le piante in asciutto hanno cominciato a manifestare sintomi solo verso la metà di giugno (come nel 2005) e la percentuale di piante sintomatiche al 30 luglio non ha superato il 30%. Invece, nel caso delle piante irrigate i primi sintomi sono comparsi nella prima settimana di giugno e la percentuale di piante sintomati-

che è stata, al 30 luglio, del 71,43%. I dati del 2008 sono o sembrano un'ulteriore conferma del fatto che l'apporto di acqua favorisce la comparsa dei sintomi fogliari.

Per quanto riguarda invece le discrepanze osservate negli anni dal 2005 al 2007 e in particolare nel 2006 rispetto agli altri due anni (minore percentuale di piante sintomatiche) si può forse cercare una spiegazione nella temperatura dell'aria e nella piovosità (qui da intendersi come apporto ulteriore di acqua alle piante in vaso con la pioggia). Nel 2005 e nel 2007 (fig. 8) la media delle temperature minime del mese di giugno è stata identica: 18°C; nel 2006 è stata invece molto più bassa: 16,2°C. Invece, la media delle temperature massime è stata di 29,9 nel 2005, 29,5 nel 2006, 28,5 nel 2007 (ma il dato del giorno 17 è probabilmente errato) e 29,0 nel 2008.

La piovosità non ci dice molto: nel 2005 è piovuto molto in aprile, poco in maggio e ancor meno in giugno; al contrario, nel 2006 è piovuto poco in aprile (quasi niente nel 2007); molto in maggio mentre in giugno la piovosità non è stata diversa dal 2005.

La temperatura di agosto non è stata molto diversa nel 2005 rispetto al 2006 (media delle minime, rispettivamente, 17,8 e 18,1°C; media delle massime, rispettivamente, 29,4 e 29,1°C); nel 2007 è stata invece leggermente più alta (18,6 e 29,8°C) rispetto al 2005 e al 2006. Inoltre, la piovosità nel mese di agosto del 2007 (113,4 mm) è stata molto più alta che nel 2006 (53,6 mm) o nel 2005 (68,6 mm). Tuttavia, nel 2006 e nel 2007, cioè uno e due anni dopo il trapianto in vaso, le prime piante sintomatiche sono state osservate già alla fine di maggio. Questo anticipo dei sintomi, inusuale in campo, almeno in Toscana, è forse da considerarsi una conseguenza della somministrazione di acqua in aprile e maggio.

Una qualche correlazione tra temperatura e dinamica nella comparsa dei sintomi la si può ricavare se si considera l'andamento delle temperature nel mese di giugno e se si ricorre ad un artificio. Nel 2005, anno in cui le piante sono state trapiantate in vaso, il germogliamento ha ritardato di circa un mese. Se, allora, si fanno slittare indietro le date di rilievo dei sintomi, allora le due curve dell'andamento della comparsa dei sintomi fogliari nel 2005 e nel 2007 giungono quasi a sovrapporsi (fig. 7). In questi due anni, nel mese di giugno, ci sono state due ondate di calore con temperature superiori a 29°C, grosso modo, nella prima e nell'ultima decade di giugno (fig. 8). Invece, nel 2006 (e nel 2008), anno in cui l'incremento del numero di piante sintomatiche in giugno è stato molto graduale, c'è stata una sola ondata di calore verso la fine di giugno. Se si assume per buona questa analisi si può allora supporre che larga disponibilità di acqua e temperature relativamente elevate favoriscono la comparsa dei sintomi fogliari.

Le piante nel terreno argilloso non si sono comportate molto diversamente da quelle in terreno di vivaio sia come capacità di germogliamento e vegetazione sia come tendenza a manifestare sintomi fogliari. Nel 2005 la percentuale di piante sintomatiche in terreno argilloso ha uguagliato quella in terreno di vivaio; invece, nel 2006 e 2007 è risultata più alta di una decina di punti percentuali. Se invece si considera la tendenza a rimanifestare i sintomi fogliari, questa caratteristica è apparsa più alta per le piante in terreno di vivaio rispetto alle piante in terreno argilloso. Questi dati non sembrano comunque tali da permettere di affermare che il terreno argilloso rappresenti una situazione più favorevole alla comparsa dei sintomi fogliari e viceversa anche se si potrebbe immaginare che un terreno argilloso trattenendo meglio l'acqua potrebbe favorire la comparsa dei sintomi fogliari. Tuttavia, occorre anche aggiungere, che uno studio sulle comunità batteriche e fungine di due diversi

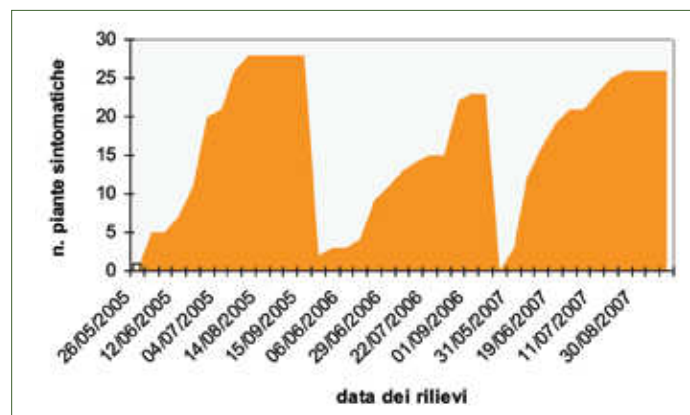


Fig. 7 - Andamento della comparsa dei sintomi fogliari nel 2005, dopo slittamento all'indietro delle date dei rilievi, in confronto al 2006 e al 2007. Si nota la maggiore corrispondenza fra il 2005 e il 2007, rispetto al grafico di fig. 6

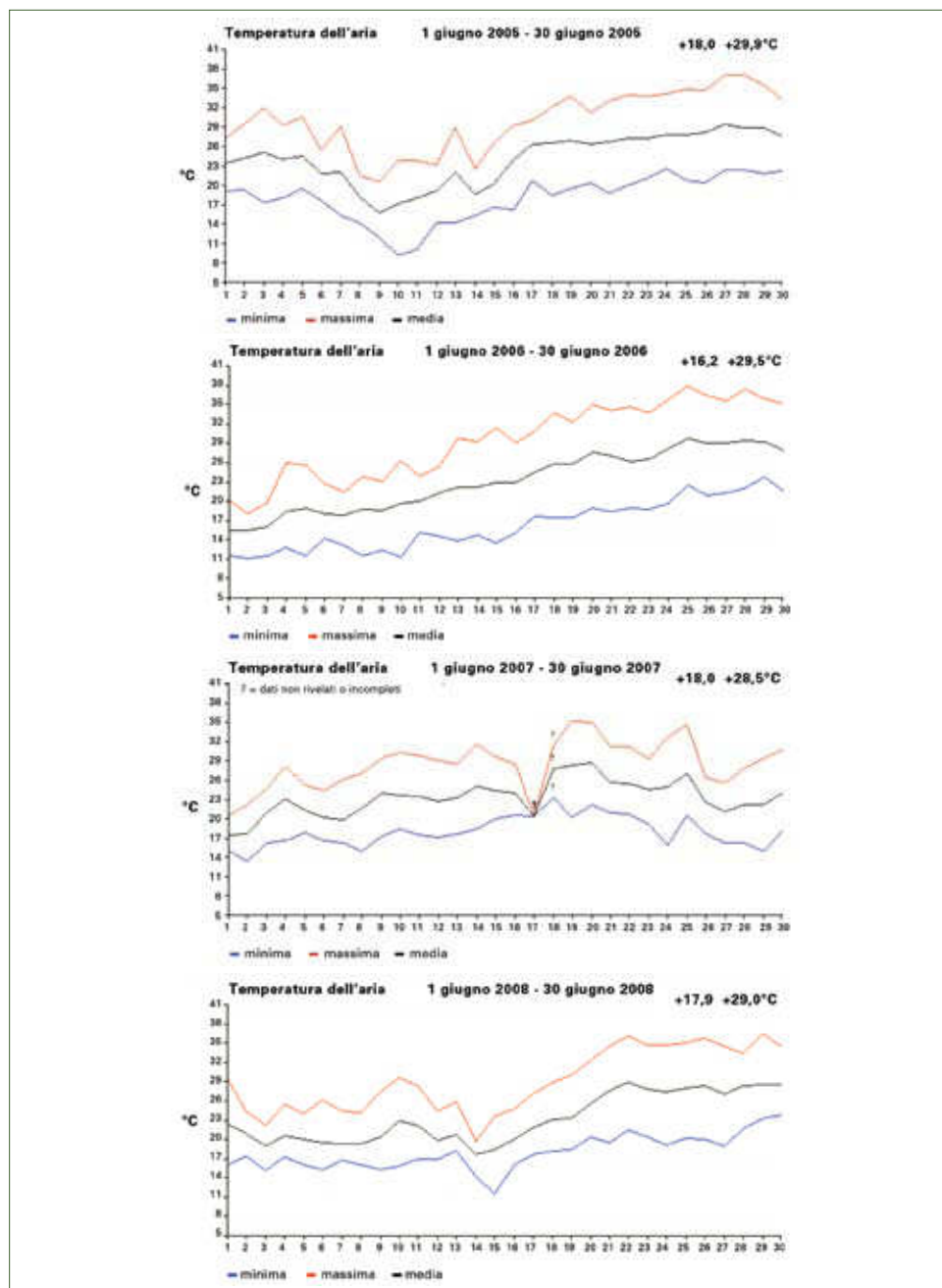


Fig. 8 - Temperatura dell'aria (minima, massima e media) nel Campus universitario di Sesto F.no (FI) nel 2006 Polo scientifico (LAMMA), Sesto Fiorentino (Firenze)

Tab. 12 - Incidenza dell'esca in due vigneti su diversi suoli*						
Vigneto	Roccia madre	Pioggia annua (mm)	Anno di impianto	Forma di allevamento	Incidenza esca (%)	
					2001	2002
Morzano	Argille plioceniche	860	1978	Archetto toscano	25	30
Trecento	Sabbie plioceniche	890	1983	Croce empolese	37	35

\* Fonte: Corti *et al.*, 2004.

suoli (su argille plioceniche e su sabbie plioceniche) di vigneti colpiti dall'esca (Corti *et al.*, 2004) aveva messo in evidenza, fra l'altro, una maggiore incidenza della malattia sul suolo più penetrabile all'acqua di pioggia, cioè quello sabbioso (tab. 12).

Un altro punto da evidenziare è la capacità di germogliamento l'anno successivo alla manifestazione di sintomi fogliari. Non è sembrato, tranne pochi casi, che lo stato di sofferenza, esemplificato dalla comparsa di sintomi, in uno o più anni precedenti, si traduca inevitabilmente nell'anno successivo in un ritardo di germogliamento o in una ridotta produzione. Ciò contrasta con l'osservazione di Petit *et al.* (2006), secondo la quale nelle piante sintomatiche, a causa della ridotta attività fotosintetica, ci sarebbe un minore accumulo, del tutto atteso, di sostanze di riserva e, quindi, minore vigore e capacità produttiva l'anno seguente. Osservazioni su questo stesso argomento sono state fatte anche da altri con risultati leggermente diversi (vedi dopo).

Un'annotazione merita anche farla riguardo alla comparsa di sintomi fogliari sulle due piante (P10 e P15) che nel 2005 avevano emesso tralci solo dal basso, vicino al punto di innesto. La pianta P10 ha manifestato i sintomi dell'esca nel 2007 (due anni dopo il trapianto) e nel 2008; P15 solo nel 2008 (tre anni dopo il trapianto). La pianta P47, vegetata solo dal basso nel 2008, è risultata in quest'anno asintomatica. Anche questo risultato conferma, indirettamente, l'influenza dell'apporto di acqua sulla comparsa dei sintomi fogliari: non si dispone di dati specifici, ma, approssimativamente, le piante ammalate e risanate mediante taglio trasversale del tronco e allevamento dal basso di un tralcio, impiegano qualche anno prima di tornare a manifestare i sintomi. Inoltre, il risultato suggerisce un assunto abbastanza ovvio e cioè che questa pratica di risanamento è efficace solo se la zona dell'innesto e il portinnesto sono sani.

Infine, una ipotesi esplicativa sull'influenza della quantità di acqua disponibile ai fini dell'espressione dei sintomi fogliari: è plausibile, se si dà per vera la teoria tossigenica della induzione dei sintomi fogliari (Bruno *et al.*, 2007a), che un più regolare e abbondante flusso di acqua verso l'alto si traduca inevitabilmente in un maggiore accumulo nelle foglie di tossine dei funghi tracheomicotici dell'esca, *Phaeoconiella chlamydospora* e *Phaeoacremonium aleophilum* in Italia.

In conclusione, un'ultima annotazione sui dati raccolti nel 2009 (durante la preparazione di questo testo). Nel 2009 tutte le piante ancora in vegetazione (24 sulle 50 di partenza) sono state irrigate solo alla comparsa di evidenti segni di stress idrico: la percentuale di piante con sintomi alla fine della prova è stata solo l'8,33%.

## IV.7.2 Andamento del germogliamento delle gemme in piante di vite colpite dall'esca

G. Scalabrelli\*, R. Gucci, G. Caruso, C. Bertolla, L. Andreini, R. Viti

Rilievi sulla ripresa vegetativa di piante ammalate di esca sono stati effettuati anche in campo. I risultati di questi rilievi hanno solo in parte confermato quelli delle prove in vaso. In particolare, a partire dallo stadio di gemma dormiente sono stati realizzati rilievi sullo stadio fenologico delle gemme di piante che negli anni passati avevano mostrato sintomi di esca (ammalate) e di piante mai sintomatiche (sane). Gli stadi di sviluppo della gemma sono stati identificati in base alla scala fenologica BBCH (Lorenz *et al.*, 1994) (*tab. 1*).

All'inizio di marzo si è cominciato ad osservare il pianto, senza evidenziare differenze tra piante sane e ammalate [Bruno e Sparapano (2006b) hanno invece rilevato differenze piuttosto significative]. In data 7 marzo è stata realizzata la potatura registrando il peso totale del materiale eliminato delle diverse tesi. È stato quindi rilevato il peso fresco di campioni di tralci per determinare la percentuale di idratazione dei tessuti. Dopo una settimana in stufa (65°C) è stato rilevato il peso secco. Dai dati relativi ai pesi non sono emerse differenze significative tra le piante sane e quelle che nelle stagioni precedenti hanno manifestato i sintomi dell'esca (*fig. 1*). Tuttavia, nelle piante infette è stata rilevata la tendenza ad assumere pesi più elevati nonostante il grado di idratazione dei tralci fosse risultato simile a quello delle piante sane.

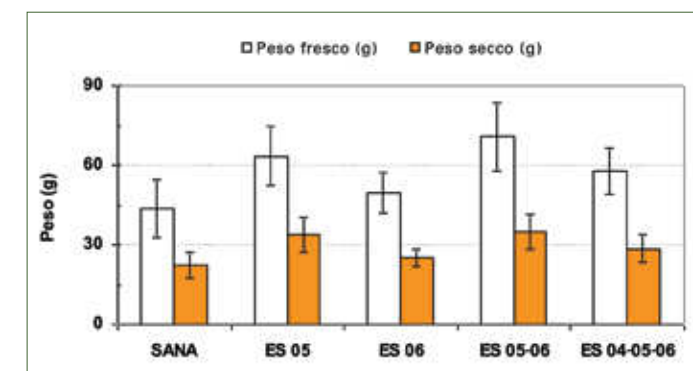
Dai dati raccolti durante le prime fasi del germogliamento (aprile) del 2006, in corrispondenza dello stadio di gemma cotonosa (stadio 05), è stato rilevato un significativo ritardo nello sviluppo delle gemme sulle piante di Chardonnay e Sangiovese (*fig. 2*), che nell'anno precedente (2005) erano state sintomatiche, rispetto alle gemme di piante sane.

**Tab. 1 - Valori numerici associati ai diversi stadi fenologici di sviluppo della gemma (BBCH)**

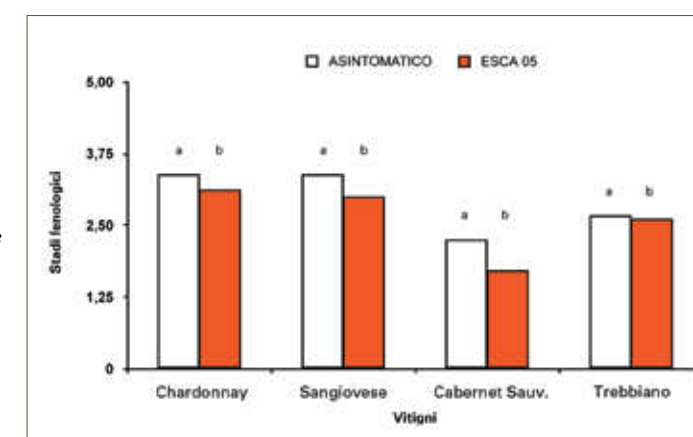
Stadio fenologico	Valore numerico	Valore di riferimento	Stadio fenologico	Valore numerico	Valore di riferimento
Gemma dormiente	00	1,0	Foglie visibili	09	4,0
Punta bianca	01	1,5	1° foglia distesa	11	4,5
Separazione perule	03	2,0	2° foglia distesa	12	5,0
Gemma cotonosa	05	3,0	Grappoli visibili	51	6,0
Bottone verde	07	3,5	Grappoli separati	53	6,5

\* Università di Pisa email: gscalabrelli@agr.unipi.it

*Fig. 1 - Peso medio fresco e secco degli scarti di potatura di piante di Cabernet Sauvignon sane, sintomatiche un solo anno (ES 05; ES 06), per due anni (ES 05-06) e tre anni (ES 04-05-06). Le barre rappresentano l'errore standard*



*Fig. 2 - Confronto dello stadio fenologico raggiunto dalle gemme di Chardonnay, Sangiovese, Cabernet Sauvignon e Trebbiano di piante colpite da mal dell'esca nel 2005 (ESCA 05) e di piante di controllo (sane) in corrispondenza delle prime fasi del germogliamento nel 2006 nel campo di Colignola (PI). Le lettere indicano differenze significative per  $P \leq 0,05$*



Le piante di Cabernet Sauvignon affette da mal dell'esca, non avevano ancora raggiunto lo stadio 05, e mostravano una tendenza ad un germogliamento ritardato rispetto alla tesi di controllo asintomatica, che tuttavia non risultava significativa. Infine in Trebbiano non era rilevata alcuna differenza tra le tesi (*fig. 2*).

Nel 2007, all'inizio della ripresa vegetativa (metà marzo), le gemme di Cabernet Sauvignon di piante sintomatiche nei tre anni di sperimentazione (ES 04-05-06) presentavano un sensibile ritardo nel risveglio vegetativo confermando il comportamento osservato l'anno precedente (*fig. 3*). Infatti, mentre le piante di controllo avevano pressoché raggiunto mediamente lo stadio 01, corrispondente alla comparsa della punta bianca (valore 1,43), le gemme delle piante infette, si trovavano ancora allo stadio di gemma dormiente 00 (valore 1,06). Dopo un mese (metà aprile) si osservava ancora un significativo ritardo nello sviluppo delle gemme nelle piante sintomatiche per più anni (ES 04-05-06). Le gemme di controllo avevano raggiunto lo stadio fenologico 09, quando è possibile riconoscere al disotto della lanugine bruna le nuove foglie, mentre la tesi infetta si trovava allo stadio precedente corrispondente al bottone verde (07). In seguito le due tesi non hanno più mostrato differenze significative nell'accrescimento del nuovo germoglio.

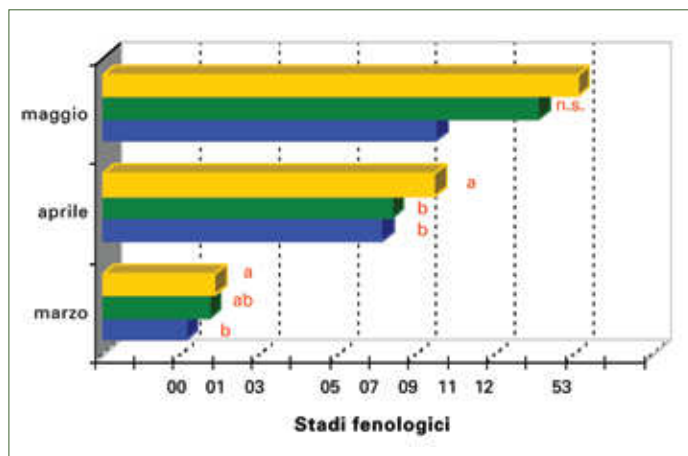


Fig. 3 - Andamento del germogliamento durante l'anno 2007 in condizioni di pieno campo (Colignola - PI). Confronto tra controllo (blu) e tesi sintomatiche due anni (ES 05-06 verde) e tre anni consecutivi (ES 04-05-06 arancio). A ogni stadio corrisponde un valore numerico attribuito (LSD test  $P \leq 0,05$ )

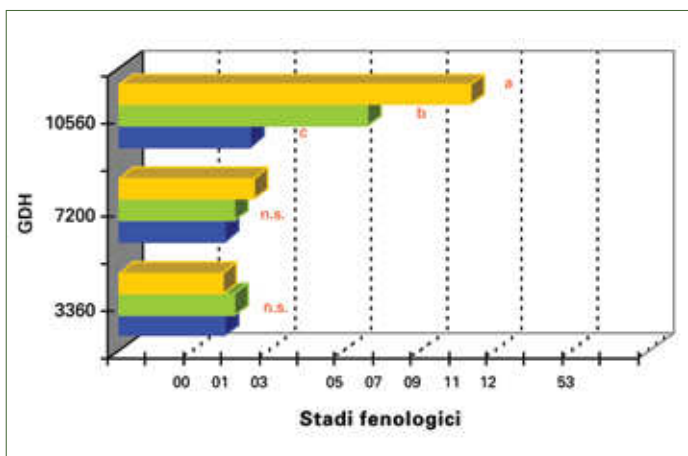


Fig. 4 - Andamento del germogliamento di talee uninodali prelevate alla terza decade di febbraio 2007 da piante di Cabernet Sauvignon rilevato dopo 7, 14, 21 giorni di permanenza in forzatura (rispettivamente 3360, 7200, 10560 GDH accumulate in condizioni controllate). Confronto tra controllo (blu) e tesi sintomatiche due anni consecutivi (ES 05-06 verde) e tre anni consecutivi (ES 04-05-06 arancio). A ogni stadio corrisponde un valore numerico attribuito (LSD test  $P \leq 0,05$ )

Ulteriore conferma della schiusura ritardata delle gemme di piante affette da mal dell'esca è stata fornita dal test della forzatura. Dopo 14 giorni di permanenza in ambiente controllato, quando erano state accumulate 7200 ore di caldo (GDH), non emergeva alcuna differenza significativa nello stadio fenologico raggiunto tra le diverse tipologie di gemme messe a confronto (fig. 4).

In seguito, dopo ulteriori sette giorni in forzatura (10560 GDH), le gemme di controllo si trovavano in corrispondenza dell'apertura delle prime foglioline (stadio 11). Le gemme, invece, appartenenti a piante sintomatiche per più anni consecutivi (ES 05-06; ES 04-05-06), mostravano, come osservato in pieno campo, un significativo ritardo nella schiusura. Le gemme relative a piante che hanno mostrato i sintomi dell'esca durante una sola stagione (ES 05, ES 06), hanno avuto un comportamento simile a quello riscontrato per le gemme di controllo.

## Conclusioni

Nel complesso i dati raccolti sembrano indicare una certa difficoltà nella ripresa vegetativa di piante ammalate di esca e sintomatiche l'anno precedente. L'effetto è apparso maggiormente evidente su piante di Chardonnay e Sangiovese; molto meno o del tutto assente su Cabernet Sauvignon e Trebbiano sintomatiche solo un anno. Un ritardo più evidente lo si è osservato su piante (gemme, nel test di forzatura) di Cabernet Sauvignon sintomatiche per tre anni. Il ritardo iniziale è stato comunque sempre recuperato dalla pianta nei mesi successivi di accrescimento. I dati raccolti sono un'ulteriore conferma del fatto che nell'anno asintomatico le piante ammalate di esca vegetano (e producono) regolarmente. Tuttavia, quando il sintomo si ripete per più anni consecutivi, la pianta potrebbe evidenziare ritardi significativi e, nei casi più gravi, "apoplezia nascosta" (mancato germogliamento in primavera: <sup>ES</sup> capitolo IV.7a).

## IV.8 Risposta di difesa al mal dell'esca nella zona di infezione

C. Amalfitano\*, D. Agrelli, A. Evidente

### IV.8.1 Introduzione

La difesa della pianta verso i patogeni ma anche verso stress ambientali ha in comune la sintesi di metaboliti di risposta (Mittler, 2002). Nell'ambito della risposta agli attacchi di patogeni l'ospite produce, fra l'altro, fitoalessine, che, sebbene non dotate di alcuna specificità, possono svolgere una attività di difesa se tossiche per il patogeno (Pearce, 1996; Morrisey e Osbourn, 1999; Deacon, 2000). Alla produzione di fitoalessine è anteposta la risposta ossidativa dell'ospite costituita dall'accumulo di specie reattive dell'ossigeno (ROS) che fungono da molecole segnale per l'attivazione della risposta fitoalessinica (Wojtaszek, 1997; Mittler, 2002). Sebbene sia di tipo ossidativo anche la risposta delle piante a stress ambientali (Mittler, 2002), negli stress causati dai patogeni essa sembra differenziarsi in alcuni aspetti: nel caso di stress ambientali vi è un certo controllo dell'accumulo dei ROS, in quello da patogeni la risposta sfocia in un loro massiccio accumulo (Mittler, 2002). Fra gli obiettivi che l'ospite può raggiungere producendo ROS c'è quello di ottenere, per arginare i danni, l'isolamento dei tessuti sottoposti a stress, sacrificando quell'area (morte programmata delle cellule) (Pearce, 1996; Mittler, 2002). Infatti, i ROS hanno la capacità di danneggiare, se in concentrazioni elevate, molte delle strutture dei tessuti fra cui le membrane e il DNA. In tal senso l'intensità e la durata della produzione di ROS e nel contempo l'attivazione di meccanismi di smaltimento di questi prodotti sono fattori fondamentali nella gestione della difesa da parte della pianta (Mittler, 2002). Per il controllo della concentrazione dei ROS la pianta, oltre ad attivare complessi enzimatici, produce specie antiossidanti direttamente coinvolte nello smaltimento come l'acido ascorbico e il glutatione. Anche i polifenoli, considerati in genere nella difesa al perimetro della pianta verso fenomeni ossidativi provenienti dall'ambiente circostante, possono svolgere un ruolo analogo.

Polifenoli stilbenici vengono prodotti dalle Vitacee in risposta sia a stress biotici sia a stress abiotici. Il più semplice di questi stilbeni è il resveratrolo (3, 5, 4'-triidrossi-stilbene) prodotto per deviazione della via biosintetica dei monomeri ligninici attraverso l'attivazione della resveratrolo sintasi (Cichewicz e Kouzi, 2002). Tuttavia, questo metabolita è da considerarsi un componente costitutivo nei tessuti legnosi (*heartwood*) (Langcake e Pryce, 1976; Soleas *et al.*, 1997; Borie *et al.*, 2004) presente indipendentemente da evidenti fenomeni di stress subiti dalla pianta, la cui concentrazione, però, generalmente incrementa in seguito ai comuni stress (Cichewicz e Kouzi,

2002). Il resveratrolo sarebbe una post-inibitina (o fitoanticipina secondo la definizione data da VanEtten *et al.* nel 1994), dunque, piuttosto che una vera fitoalessina. Associata al resveratrolo vi è la classe delle viniferine, metaboliti derivanti essenzialmente da condensazione ossidativa dello stesso resveratrolo che si ipotizza sia operata da perossidasi specifiche coadiuvate da proteine dirigenti (Cichewicz e Kouzi, 2002). Viste le proprietà antiossidanti e proossidanti dei polifenoli (Sakihama *et al.*, 2002), anche a quelli prodotti dalla vite possono attribuirsi, oltre a proprietà antimicrobiche, quelle di intervento nella risposta ossidativa dell'ospite.

### IV.8.2 Resveratrolo e viniferine

È stato diffusamente studiato l'accumulo di resveratrolo e di numerose viniferine in foglie e acini di *Vitis vinifera* in conseguenza a stress quali quelli da irraggiamento UV, idrico e da inoculi di patogeni come *Botrytis cinerea* e *Plasmopara viticola* (Langcake Pryce, 1976; Langcake e Pryce, 1977; Langcake e McCarty, 1979; Jeandet *et al.*, 2002; Borie *et al.*, 2004). È stata saggiata anche l'attività antifungina di queste fitoalessine verso vari patogeni che si è vista essere diversa a seconda delle viniferine considerate (Langcake e Price, 1976; Langcake, 1981; Gottstein e Gross, 1992; Jeandet *et al.*, 2002). Studi sugli accumuli nei legni di *Vitis vinifera* dovuti a cancri del legno non sono molto diffusi. In particolare è stato studiato l'accumulo di questi metaboliti nel tronco di viti affette da mal dell'esca (Amalfitano *et al.*, 2000).

È stato osservato in studi su *Vitis vinifera* cv. Sangiovese che insieme al resveratrolo nelle aree infette del legno, in particolare quello bruno rosso e con strie nere, vi è un accumulo di numerose viniferine dimere, trimere e tetramere del resveratrolo (*fig. 1*) ed è probabile che ve ne siano altre non identificate anche in forma glicosilata (Amalfitano *et al.*, 2009). Nel legno bruno-rosso tali viniferine, compreso il resveratrolo, costituivano il 3,4%, in quello con strie nere il 2,0%, mentre in quello asintomatico solo l'1,1%. Di alcune di esse (resveratrolo, *cis* e *trans*  $\epsilon$ -viniferina, ampelopsina B, opeafenolo e isoopeafenolo) ne è stata saggiata l'attività in prove di germinazione di spore di *Phaeoconiella chlamydospora* (*Pch*) e *Pheoacremonium aleophilum* (*Pal*), prevalentemente presenti nelle aree di legno bruno-rosso e con strie nere (Mugnai *et al.*, 1999). Queste sostanze post-infezionali non hanno mostrato una forte attività antifungina, anzi alcune ad alte concentrazioni sembrano stimolare addirittura la germinazione. Nelle *figg. 2 e 3* sono riportati alcuni risultati dei saggi biologici. Sono stati saggiati contro *Pch* anche gli estratti grezzi metanolici del legno, gli stessi dai quali sono state isolate le fitoalessine riportate in *fig. 1*, e sue frazioni parzialmente purificate. Questi estratti non hanno evidenziato una significativa attività antifungina analogamente ai polifenoli puri, suggerendo una loro scarsa attività fungicida anche in miscela e l'assenza fra i metaboliti non ancora identificati dell'estratto metanolico di specie particolarmente attive (*fig. 4*). D'altra parte saggi *in vitro* hanno mostrato la capacità di questi funghi di accrescersi su substrati fenolici (Mugnai *et al.*, 1997a), anche come unica fonte di carbonio. In ogni caso è stato osservato in prove di colture di cellule indifferenziate di *Vitis vinifera* inoculate con *Pch* che varietà suscettibili all'esca come il Semillon accumulano meno resveratrolo ed  $\epsilon$ -viniferina, e anche meno fenoli totali, rispetto a varietà più resistenti suggerendo che questo parametro può rappresentare un'utile indicazione della suscettibilità dell'ospite, così come viene rilevato per diverse cultivar di *Vitis vinifera* verso *B. cinerea* e *P.*

\* Università di Napoli "Federico II" email: amalfita@unina.it

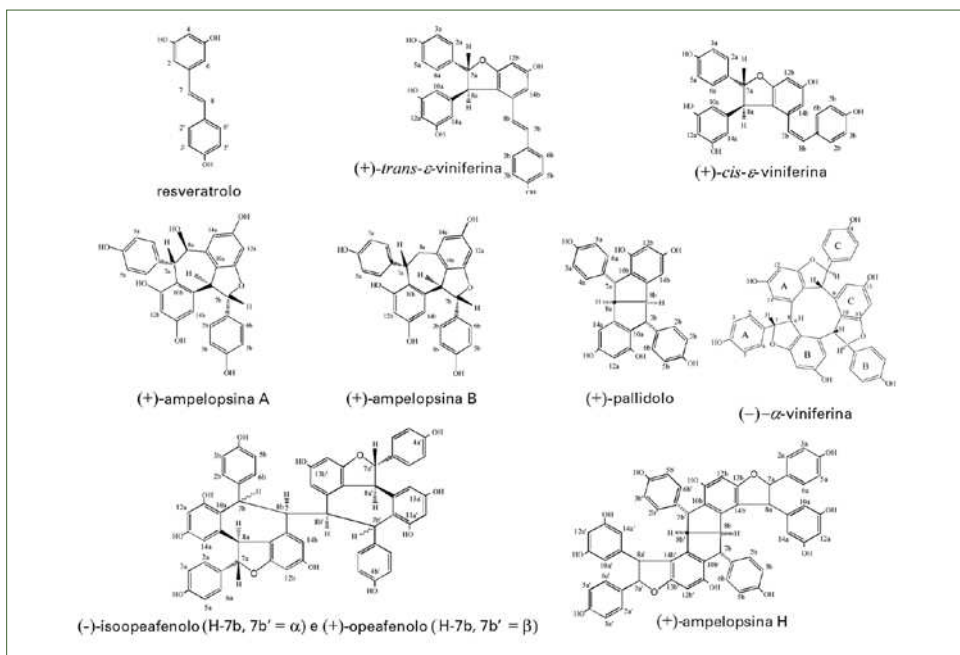


Fig. 1 - Formule di struttura delle viniferine identificate nel legno di vite (cv. Sangiovese)

viticola (Soleas *et al.*, 1997; Jeandet *et al.*, 2002). Tuttavia non sembra del tutto vero il contrario per il mal dell'esca, infatti il più alto accumulo degli stessi metaboliti e fenoli totali si è osservato nel Moscato, varietà mediamente suscettibile, rispetto alle varietà più resistenti saggiate in confronto, Roussanne e Colorino (fig. 5) (Amalfitano *et al.*, 2004). Ciò mette in evidenza che fattori di resistenza dell'ospite non possono essere ascritti solo all'accumulo di polifenoli, che d'altra parte rappresenta solo un aspetto della risposta dell'ospite.

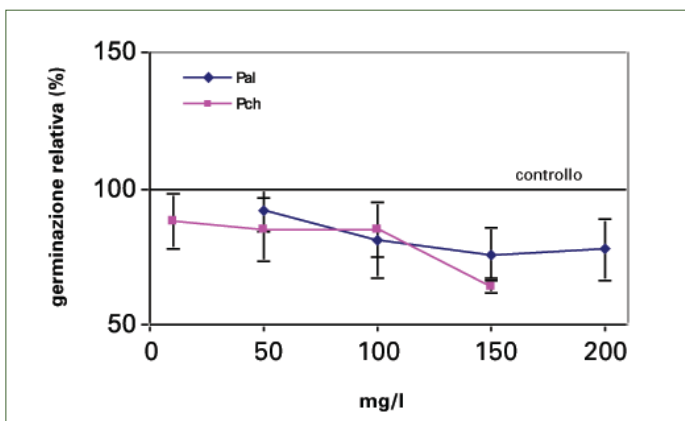


Fig. 2 - Prove di germinazione conidica di Pch e Pal in presenza di varie concentrazioni di resveratrolo. Il numero di conidi germinati in presenza di resveratrolo sono stati rapportati in percento a quelli germinati della prova di riferimento parallela di controllo senza metabolita. Le curve dei controlli hanno una SD 10 per Pal e 2 per Pch

Fig. 3 - Prove di germinazione conidica di Pch in presenza di varie concentrazioni di opeafenolo e isoopeafenolo. I conidi germinati in presenza dei due metaboliti sono stati rapportati in percentuale a quelli germinati della prova di riferimento parallela di controllo. Le curve dei controlli hanno una SD ≤ 4

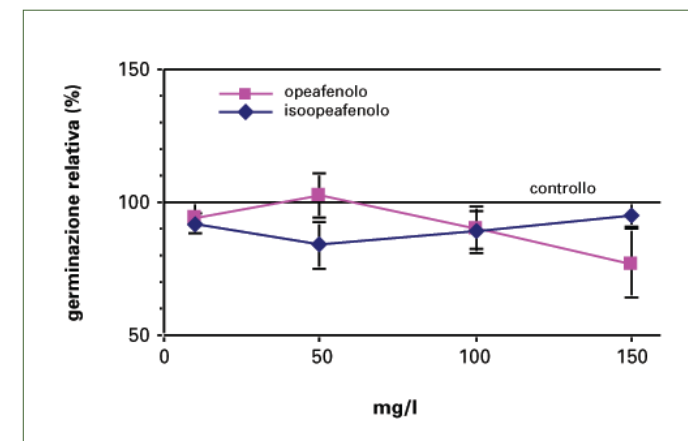


Fig. 4 - Prove di germinazione conidica di Pch in presenza di varie concentrazioni di frazioni grezze dell'eluato HPLC da colonna C18 semipreparativa dell'estratto metanolico di legno sintomatico. Ogni frazione dell'estratto conteneva uno o più dei polifenoli stilbenici isolati di fig. 1. L'estratto metanolico era costituito per il 33% in peso dai polifenoli stilbenici isolati

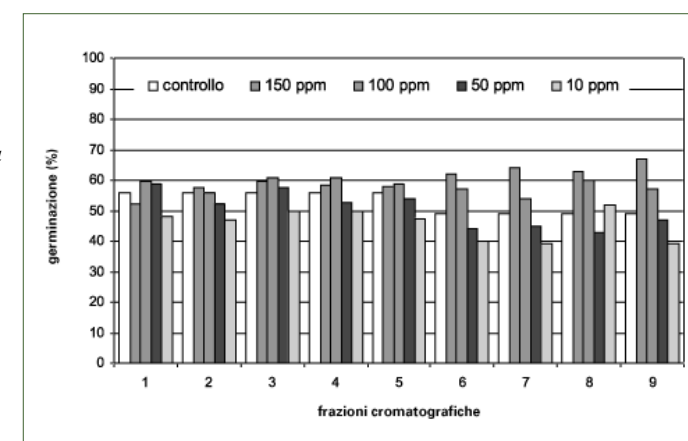
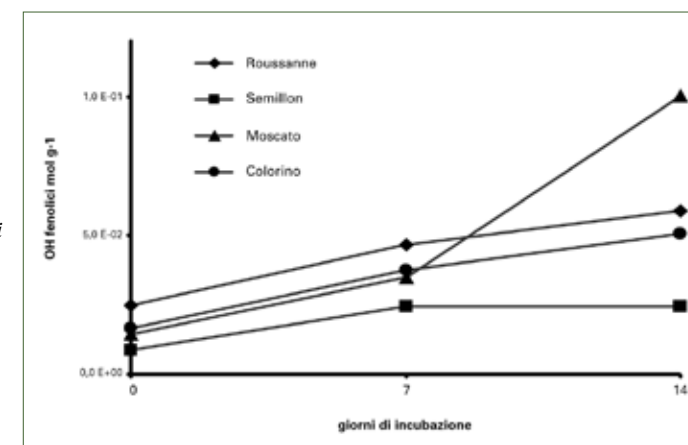


Fig. 5 - Accumuli di polifenoli totali nel tempo in colture cellulari indifferenziate di varie cultivar di Vitis vinifera con diversa suscettibilità al mal dell'esca (Semillon >> Moscato > Colorino = Roussanne) inoculate con Pch



### IV.8.3 Reazione di Fenton

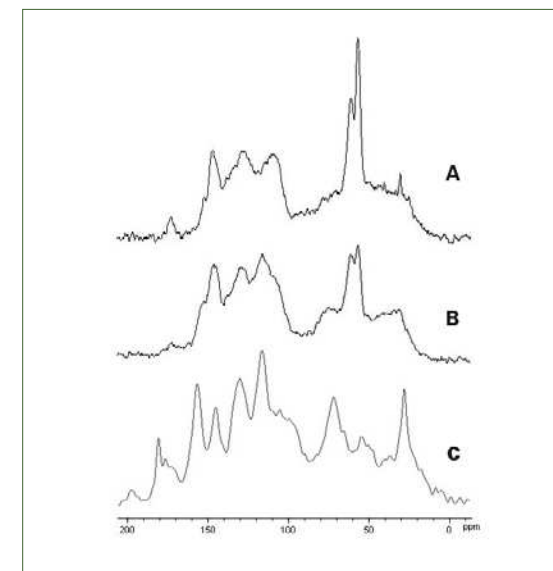
Un ruolo importante, tuttavia, può essere svolto *in vivo* dalle fitoanticipine della vite nel generare barriere di difesa che servano a rallentare piuttosto che a bloccare eventuali patogeni. Nell'ambito dell'esplosione ossidativa dell'ospite i polifenoli stilbenici oltre a poter svolgere un ruolo di regolatori delle concentrazioni dei ROS fungendo da trappole radicaliche, possono generare nel contempo strutture polifenoliche condensate. È stato osservato *in vitro* che i ROS, prodotti dalla reazione di Fenton con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e Fe<sup>2+</sup> in quantità catalitiche, reagiscono con i componenti degli estratti metanolici di legni di vite affetta da esca contenenti viniferine. Tale reazione induce la formazione di macromolecole polifenoliche ad alto peso molecolare essendo stata osservata la scomparsa della frazione delle viniferine dalla miscela di reazione e la produzione di un residuo macromolecolare di pari massa. La distribuzione di pesi molecolari di tali prodotti di condensazione (*tab. 1*) ha mostrato una scarsa omogeneità essendo prevalsi principalmente pesi molecolari elevati (>10000 Dalton) rispetto a quelli intermedi (<10000, >3000). Questo lascia ritenere che opportune quantità di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in rapporto ai polifenoli e concentrazioni catalitiche di Fe<sup>2+</sup> sono atte a innescare reazioni di formazione di radicali polifenolici preferenzialmente sui substrati polifenolici in progressiva condensazione piuttosto che su polifenoli a basso peso molecolare ancora presenti nella miscela di reazione. Ciò è stato attribuito alla delocalizzazione di radicali semichinonici favorita su macromolecole in quanto possono stabilizzare meglio i radicali (Amalfitano *et al.*, 2009). A tal riguardo è stato osservato anche che sono proprio le viniferine che hanno maggiore possibilità di stabilizzazione per risonanza dei radicali semichinonici ad avere maggiore reattività nei confronti dei ROS. Analoga reattività potrebbe essere ascritta anche a molti dei metaboliti secondari di *Pch* e *Pal* (Evidente *et al.*, 2000; Tabacchi *et al.*, 2000) che sono essenzialmente precursori DHN melaninici e pertanto predisposti ad attacchi radicalici. È stato inoltre osservato che nella reazione di Fenton su resveratrolo ed  $\epsilon$ -viniferina si ha la produzione di viniferine, fra l'altro quelle maggiormente accumulate nel legno bruno-rosso, lasciando ritenere che parte di esse *in vivo* siano anche derivanti da tali reazioni (Amalfitano *et al.*, 2009).

Lo studio preliminare della cinetica della reazione di Fenton condotta sull' $\epsilon$ -viniferina ha messo in evidenza che la reazione di questo polifenolo con i ROS segue una cinetica particolarmente veloce tanto da far supporre che essa agisca anche direttamente come specie riducente del catalizzatore redox Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup> accelerando la formazione di radicali che saranno quindi soggetti a condensazione. Ciò lascia ritenere che per le viniferine queste reazioni

Tab. 1 - Frazioni di diverso peso molecolare dell'estratto metanolico del legno sintomatico (% in peso) prima e dopo 24 h di reazione con i reagenti di Fenton*			
	>10000 Da	10000-3000 Da	<3000 Da
Prima della reazione	0,64	1,8	97,6
Dopo la reazione	17,2	5,4	77,4

\* Reagenti di Fenton: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:Fe<sup>2+</sup> 21:1 molare, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/estratto metanolico 2,55  $\mu$ mol/mg).  
Le frazioni sono state ottenute per filtrazione in cella Amicon.

Fig. 6 - Spettri <sup>13</sup>C NMR CP-MAS dei residui ligninici dei legni asintomatico (A) e bruno-rosso (B), e dell'estratto metanolico dal legno sintomatico contenente polifenoli sottoposto a reazione di Fenton (C). Nello spettro B si osserva rispetto a quello A un incremento notevole del segnale a 115 ppm e rigonfiamento di quello a 155 ppm verso shift più elevato. Tali segnali sono attribuibili alla deposizione di polifenoli condensati per reazioni radicaliche indotte dai ROS. Infatti essi sono particolarmente evidenti in C (Agrelli *et al.*, 2009)



sono molto probabili anche in condizioni di ridotte quantità di ferro o di altro ione metallico con caratteristiche redox analoghe. D'altra parte nella esplosione ossidativa dell'ospite sono contemplate anche reazioni di tipo Fenton (Mittler, 2002). Questo aspetto può rivestire un certo interesse perché per molti funghi demolitori, quali ad esempio i funghi agenti di marciumi bruni, si ipotizza che proprio l'attivazione iniziale di reazioni di tipo Fenton, operata da metaboliti secreti dai funghi capaci di iniziare la reazione per complessazione del ferro, rappresenti una via utile all'espansione del fungo. Probabilmente questo meccanismo agevola la successiva attività degli enzimi degradatori del fungo previa degradazione ossidativa parziale dei tessuti dell'ospite da parte dei ROS prodotti dalla Fenton (Illman, 1991; Goodell *et al.*, 1997; Hammel *et al.*, 2002).

Nei legni degradati da *Pch* e *Pal*, in particolare nel legno bruno rosso, è stata constatata la presenza di accumuli di sostanze polifenoliche del tutto simili a quelle prodotte da reazione di Fenton condotta sull'estratto metanolico dello stesso legno malato (Agrelli *et al.*, 2009). Questa componente polifenolica si presenta nella frazione ligninica del legno bruno rosso sovrappoendosi a quella del polimero ligninico (*fig. 6*) che non risulta alterato nella sua struttura aromatica ma essenzialmente solo demetilato (*tab. 2*), fenomeno questo che può essere anche ascritto a processi ossidativi operati da radicali come i ROS (Hammel *et al.*, 2002). Sono risultate assenti le tipiche demolizioni degli anelli aromatici della lignina (Agrelli *et al.*, 2009), con formazione di chetoacidi, comuni nelle rotture degli anelli operate da funghi demolitori come nel caso dei marciumi bianchi (Kirk *et al.*, 1980). D'altra parte nel legno bruno rosso la presenza di intrusioni di *Fomitiporia mediterranea* (*Fmed*), agente di marciume bianco, non sembrano comuni (Mugnai *et al.*, 1999). La mancata degradazione degli anelli aromatici ligninici, e forse anche la difficoltà a rinvenire *Fmed* nel legno bruno rosso, potrebbe anche dipendere dalla deposizione dei polifenoli di risposta che,

**Tab. 2 - Percentuali dei carboni appartenenti alle varie categorie di costituenti strutturali del legno ottenute dall'analisi <sup>13</sup>C CP-MAS NMR\*\*\***

Tipi di legno*	Legno			Residui ligninici		
	Carboidrati	Cellulosa crist./amorta**	CH <sub>3</sub> acetilico di emicellulose	Arile totale	Aril-O/Arile	OCH <sub>3</sub> #
AS	65,1	59,9	3,2	46,5	24,1	11,2
SN	58,3	71,8	2,4	49	24,8	9,9
BR	48,3	67,2	1,6	54,9	27,6	7,9

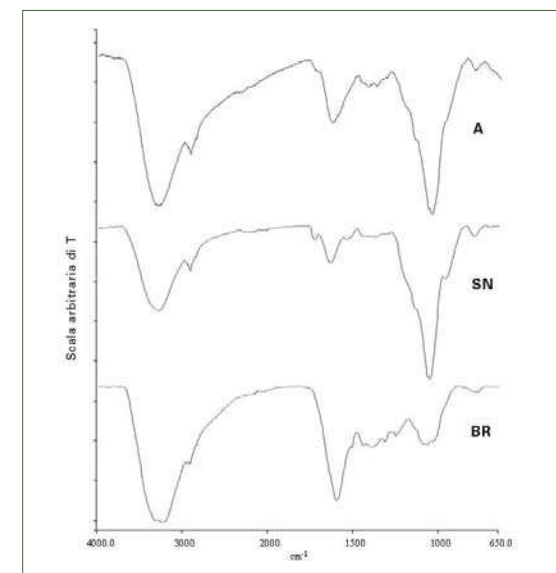
\* AS = legno asintomatico; SN = legno con strie nere; BR = legno bruno rosso; e rispettivi residui ligninici.  
 \*\* Determinato sul residuo del legno dopo idrolisi delle emicellulose. # Valori probabilmente in eccesso per problemi di risposta strumentale e sovrapposizione di ulteriori risonanze nell'analisi NMR.  
 \*\*\* Fonte: Agrelli *et al.*, 2009.

condensando anche con la lignina attraverso le reazioni radicaliche indotte dai ROS, aumenterebbero la formazione di eteri difenilici sui residui aromatici ligninici. Questa condizione renderebbe meno probabile la formazione di specie catecoliche per addizione di gruppi OH o demetilazione degli anelli aromatici ligninici, premessa importante per la degradazione operata da microrganismi (Kirk *et al.*, 1980). I funghi *Pch* e *Pal*, presenti di norma nel legno bruno rosso, hanno mostrato occasionalmente *in vitro* attività enzimatiche atte alla degradazione dei polifenoli e la capacità di accrescersi su substrati polifenolici particolari (Mugnai *et al.*, 1997c; Mugnai *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 2006b), tuttavia queste proprietà potrebbero non essersi manifestate *in vivo* sulla lignina sia per la resistenza alla degradazione suggerita prima, che per la presenza di substrati carboidratici residui. Ad esempio, in esperimenti condotti con lignina sintetica l'aggressione dei polifenoli da parte di funghi come agenti di marciumi soffici e bruni sembra avvenire quando vi è carenza di substrati carboidratici (Kirk *et al.*, 1980), mentre nel legno bruno rosso sebbene ci sia stata una certa demolizione di cellulosa non cristallina ed emicellulose nonché alterazione di pectine, resta ancora un abbondante presenza di carboidrati tra i quali cellulosa cristallina (tab. 2), anche se quest'ultima non sarebbe aggredibile dai funghi in quanto non è stata osservata mai *in vitro* attività esoglucanica da parte di *Pch* e *Pal* (Mugnai *et al.*, 1997b; Mugnai *et al.*, 1999), indispensabile per tale degradazione (Eriksson, 1981; Kirk e Cowling, 1984).

Nella degradazione del legno bruno rosso è stata osservata una particolare alterazione della frazione pectica, essa è apparsa costituita da strutture carboidratiche e fenoliche condensate (fig. 7) (Agrelli *et al.*, 2009). La componente carboidratica potrebbe essere costituita da polisaccaridi anche non specificamente di natura pectinica essendo stata evidenziata l'assenza di gruppi carbossilici tipici (fig. 7). D'altra parte l'attività pectinolitica *in vitro* di *Pch* e *Pal* risulta documentata (Marchi *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2006b). I polisaccaridi condensati con i polifenoli possono provenire dalla frammentazione dovuta all'attività dei funghi dalle varie strutture carboidratiche già unite a frammenti ligninici o condensate con specie radicaliche polifenoliche formate nella risposta ossidativa.

Per quanto riguarda le zone del legno con strie nere sono state riscontrate minori alterazioni (tab. 2) e un accumulo di pectine accompagnate anche da polifenoli di risposta (Agrelli *et al.*, 2009). Queste evidenze possono essere interpretate come comuni effetti di deposizione

Fig. 7 - Spettri FT-IR delle sostanze pectiche estratte dai legni asintomatico (A), con strie nere (SN) e bruno-rosso dopo estrazione con AcOEt (BR). Mentre gli spettri A e SN sono molto simili fra loro, quello BR presenta meno evidenti i segnali di carboidrati intorno a 1100 cm<sup>-1</sup> e evidenti segnali a 1603, 1514, 1446, 1383, e 1259 cm<sup>-1</sup> attribuibili a polifenoli. Nello spettro BR è inoltre assente la banda intorno a 1728 cm<sup>-1</sup> caratteristica dei gruppi carbossilici delle pectine



di materiali di ostruzione in vasi che hanno perso la loro funzione (Rioux *et al.*, 1998) e non necessariamente dovute alla intromissione delle ife di *Pch* e *Pal* per tutta l'estensione del vaso annerito. È stato anche evidenziato che vasi non ancora anneriti in prossimità delle zone di infezione risultano ostruiti (Edwards *et al.*, 2007b). D'altra parte fenomeni di embolia possono essersi propagati lungo colonne di vasi a partire dalla zona di infezione per le lesioni provocate dall'intrusione delle ife fungine. Nonostante l'accumulo di fitoalessine di debole attività antifungina nelle zone delle strie nere, probabilmente causa dell'annerimento, l'incremento di pectine potrebbe favorire l'espansione dei funghi pectinolitici *Pch* e *Pal* attraverso questi vasi ricchi di nutrienti (Agrelli *et al.*, 2009).

**IV.8.4 Conclusioni**

Il quadro generale della risposta postinfettiva e delle caratteristiche del deterioramento dei legni osservato porta a ritenere che la pianta espliciti una attiva risposta di difesa nelle zone di invasione dei patogeni. Tuttavia, la risposta della pianta non risulta sufficiente ad arginare l'attività degradativa dei funghi e la loro progressione nell'ospite. Tutt'al più essa potrebbe rallentare la diffusione, quanto meno di *Pch* e *Pal* nei tessuti.



## V. Diagnosi dei funghi dell'esca



## V.1 Tecniche di diagnosi applicabili ai funghi associati ad alterazioni del legno della vite

S. Pollastro\*, A. Carlucci, W. Habib, F. Lops, S. Frisullo, F. Faretra

### V.1.1 Introduzione

I funghi, fra i più importanti responsabili di malattie delle piante, sono caratterizzati da una grande complessità e diversità che li contraddistinguono dagli altri patogeni (Baker *et al.*, 1997).

L'identificazione corretta dei funghi agenti causali di malattia delle piante non sempre è immediata e scontata nonostante siano considerati microrganismi dotati di strutture morfologiche ben definite. L'applicazione di tecniche idonee all'individuazione di un patogeno anche quando esso è presente in bassissima quantità e/o in fase di latenza consente il riconoscimento precoce dello stato di malattia e prima che questa si manifesti e diffonda.

I problemi principali nella diagnosi fitopatologica sono dovuti alla capacità di rilevazione del patogeno, strettamente correlata alla tipologia di tecnica applicata, e all'identificazione a livello di specie che richiede la messa a punto di tecniche che abbiano un livello di sensibilità sufficiente a caratterizzare il microrganismo specifico (Kummert *et al.*, 1998).

Consistenti progressi sono stati compiuti negli ultimi anni grazie alla disponibilità di metodiche molecolari di identificazione di funghi che si sono affiancate alle tecniche tradizionali e che hanno motivato importanti cambiamenti nella tassonomia fungina (Hansen e Wick, 1993; Maclean *et al.*, 1993; Janse, 1995; Magnano di San Lio *et al.*, 1995; Putnam, 1995; Pecchia *et al.*, 1996; Martin *et al.*, 2000; Ghignone e Migheli, 2001).

Le tecniche diagnostiche più comunemente applicate nella diagnosi di funghi fitopatogeni possono essere suddivise in tradizionali, sierologiche, biochimiche e molecolari.

Le tecniche di diagnosi tradizionale prevedono l'isolamento del possibile agente causale da tessuti della pianta con sintomi di malattia su substrato agarizzato (generici o ove disponibili semiselettivi), l'ottenimento di colture pure e la successiva identificazione in base a criteri morfologici mediante osservazione di preparati a fresco al binocolare e/o al microscopio ottico.

Le tecniche sierologiche si basano sulla produzione di anticorpi in grado di riconoscere e legarsi in modo specifico a epitopi dell'antigene; tali tecniche sono poco applicate nella diagnosi di malattie fungine per le difficoltà con cui sono sviluppati anticorpi altamente specifici per l'organismo 'bersaglio'.

La diagnosi biochimica è basata sull'analisi dei profili elettroforetici di proteine, isoenzimi o altri metaboliti ottenuti da colture pure di estratti fungini (Magnano di San Lio *et al.*, 1995).

---

\* Università di Bari email: stefania.pollastro@agr.uniba.it

Le tecniche di diagnosi molecolare si basano sull'analisi degli acidi nucleici (DNA) mediante la reazione a catena della polimerasi (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) o l'ibridazione molecolare, sfruttando la capacità del diagnostico di riconoscere sequenze specifiche del DNA dell'organismo fitopatogeno. Tali tecniche consentono di rilevare il patogeno direttamente in tessuti vegetali o nel terreno. Problemi nell'identificazione dei patogeni possono tuttavia derivare dal rischio di ottenere risultati falsi positivi o falsi negativi, nonché dall'incapacità del metodo di distinguere organismi vivi o morti.

### V.1.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)

La PCR consente l'amplificazione di un qualsiasi frammento di DNA, di cui è nota la sequenza nucleotidica, a un numero di copie elevato. La tecnica sfrutta la replicazione del DNA mediante reazione enzimatica. Due oligonucleotidi omologhi a siti di orientazione opposta del DNA stampo fungono da innesco (*primer*) per l'azione di una DNA polimerasi termostabile in un'opportuna miscela di reazione. Durante i cicli d'incubazione (da 20 a 40) a temperatura variabile si verifica l'appaiamento dei primer ai siti omologhi, la sintesi del DNA complementare e la denaturazione delle doppie eliche. La lunghezza dei primer ne determina la specificità, poiché il grado di omologia con le regioni del DNA bersaglio è inversamente proporzionale alle loro dimensioni. Si possono ottenere primer con diverso livello di specificità dalla sequenza di sonde molecolari utili in esperimenti di ibridazione (Schesser *et al.*, 1991; Plyer *et al.*, 1999).

L'amplificazione diretta di regioni ricche di sequenze ripetute in tandem (*Directed Amplification of Minisatellite-region* DNA, DAMD; Heath *et al.*, 1993) può essere utile per ottenere, mediante l'ausilio di primer sintetici, profili di amplificazione aventi elevato livello di specificità in diverse specie, incluso funghi fitopatogeni (Stenlid *et al.*, 1994).

Nei funghi, i geni codificanti RNA ribosomiale (rRNA) sono di solito organizzati in tandem, identicamente ripetuti con 60-200 copie per genoma aploide (Bruns *et al.*, 1991). Nonostante l'elevata conservazione dell'rRNA, essi possono portare variazioni sufficienti a consentirne l'utilizzo in applicazioni di diagnostica e classificazione (Ghignone e Migheli, 2001). Qualsiasi organismo che possieda rDNA ripetuti può essere identificato in maniera specifica attraverso primer basati sulle regioni variabili degli spaziatori. Le caratteristiche delle regioni spaziatrici, infatti, rendono particolarmente interessanti queste sequenze ai fini della costruzione di primer e sonde dotati di elevato livello di specificità. Alcune di queste regioni sono, ad esempio, le ITS (*Internal Transcribed Spacer*) situate tra i geni codificanti gli rRNA (White *et al.*, 1990; O'Donnell, 1992), le regioni spaziatrici non trascritte (NTS) tra le unità ripetute dell'rRNA e le regioni spaziatrici intergeniche (IGS) (Appel e Gordon, 1996; Edell *et al.*, 1997).

Anche da particolari regioni del DNA mitocondriale (mtDNA), previo sequenziamento, si possono ottenere primer a elevato valore diagnostico. Nel mtDNA umano sono note da tempo le regioni ipervariabili HV1 e HV2 (Anderson *et al.*, 1981), sulla base delle quali si possono progettare primer in grado di distinguere con precisione singoli individui. Tali metodologie diagnostiche, che in genetica umana hanno raggiunto un fine livello di sofisticazione, sono ancora pressoché inesplorate in altri settori di ricerca e potrebbero essere un

interessante oggetto di ricerca anche in ambito fitopatologico (Ghignone e Migheli, 2001).

Nella tecnica *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), i primer hanno sequenza arbitraria in grado di amplificare casualmente in corrispondenza di regioni omologhe del DNA bersaglio; sono nucleotidi di sole 10-12 basi con concentrazione di G+C non inferiore al 50%; proprio in virtù della corta sequenza del nucleotide, esiste un'elevata probabilità che nel genoma ci siano due siti omologhi al primer, vicini tra loro e con orientazione invertita. I prodotti di amplificazione, costituiti da frammenti di DNA di diversa lunghezza, possono essere separati mediante elettroforesi su gel di agarosio (Williams *et al.*, 1990, 1991) e i profili elettroforetici ottenuti possono essere analizzati considerando l'intero profilo o soltanto le bande più evidenti (*major band*).

L'analisi RAPD è stata applicata con successo, ad esempio, in studi sulla variabilità genetica di popolazioni di *Fomitiporia mediterranea* M. Fischer, *Phomopsis viticola* (Sacc.) Sacc. e *Phaeoconiella chlamydospora* (W. Gams, Crous, M.J. Wingf. et L. Mugnai) Crous et Gams (Abbatecola, 2000; Pollastro *et al.*, 2000, 2001, 2004; Dongiovanni, 2001), miceti coinvolti nel determinismo di malattie del legno della vite. Sulla base dei risultati conseguiti è stato possibile individuare marcatori specie-specifici che hanno costituito il punto di partenza per la messa a punto di protocolli diagnostici per la rilevazione dei succitati miceti.

I marcatori RAPD possono essere utilizzati (previa marcatura o in seguito a clonaggio) per la produzione di sonde molecolari in esperimenti d'ibridazione, oppure previo sequenziamento di specifiche regioni (SCAR: *Sequence Characterized Amplified Region*; Michelmore *et al.*, 1993; McDermott e McDonald, 1993; Paran e Michelmore, 1993). Tramite clonaggio, è possibile risalire alla sequenza completa della regione amplificata e, sulla base di questa, progettare primer specifici costituiti da oligonucleotidi (18-24 mer) complementari all'estremità del marcatore RAPD originale che, usati in PCR con il DNA originale come stampo, permettono l'amplificazione di singoli loci SCAR (Wiglesworth *et al.*, 1994; Schilling *et al.*, 1996; Haymes *et al.*, 2000).

Una variante della tecnica RAPD è rappresentata dalla *DNA Amplification Fingerprinting* (DAF) (Caetano-Anollès *et al.*, 1991), basata sull'uso di oligonucleotidi molto corti (5-7 nucleotidi). Poiché questi primer hanno un'alta probabilità di incontrare regioni a essi omologhe nel DNA bersaglio, i prodotti di amplificazione che si ricavano sono molto più complessi e la loro separazione deve avvenire in gel di poliaccrilammide. L'analisi del DNA risulta però più complicata e pertanto la tecnica, pur essendo un sistema di identificazione ad alta precisione, non è stata ancora applicata su larga scala per il riconoscimento dei funghi fitopatogeni.

L'amplificazione a nido (*nested-PCR*) è una modificazione della PCR nata dall'esigenza di aumentare la sensibilità di rilevazione. Il metodo consiste nell'esecuzione di due reazioni di amplificazione successive, la prima amplifica una sequenza di DNA di alcune centinaia di paia di basi mentre con la seconda, utilizzando una nuova coppia di primer che fiancheggiano una sequenza interna del prodotto di amplificazione della prima reazione, si permette l'amplificazione di un segmento più ridotto. Aumentando con la seconda amplificazione il numero di sequenze bersaglio si incrementa in genere la sensibilità della tecnica.

A fronte di molti aspetti positivi, come l'elevata sensibilità, la riproducibilità dei risultati e la versatilità, la PCR presenta anche alcuni inconvenienti legati prevalentemente alle analisi post-amplificazione, tuttora indispensabili per rilevare i prodotti di reazione. Le analisi di post-amplificazione, infatti, comportano l'utilizzo di sostanze tossiche, quali il bromuro di etidio, e

richiedono lunghi tempi di esecuzione. Per superare tali inconvenienti, sono disponibili oggi metodi di PCR in tempo reale che consentono l'identificazione e la quantificazione del prodotto di amplificazione grazie a una corta sonda molecolare complementare a una parte interna della sequenza amplificata, inclusa nella miscela di reazione. L'amplicone è rivelato in tempo reale attraverso l'emissione di un segnale fluorescente, determinato dalla sonda, la cui attivazione dipende esclusivamente dall'ibridazione con la sequenza bersaglio (Finetti-Sialer e Gallitelli, 2001). Il sistema utilizza un processo detto FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*), che si verifica quando l'energia emessa da un fluoroforo eccitato da radiazione a una determinata lunghezza d'onda è intercettata da un accettore (*quencher*), situato a una distanza opportuna (Nazarenko *et al.*, 1997). L'accettore cattura il segnale dissipandone l'energia in forma di calore. Se durante la reazione avvengono modificazioni di struttura tali da incrementare la distanza tra le due molecole, l'accettore non è più in grado di intercettare l'energia emessa dal fluoroforo e la fluorescenza può essere percepita. Se la reazione viene realizzata in un termociclatore provvisto di fluorimetro, l'emissione di fluorescenza è captata in tempo reale e riportata su un grafico in corrispondenza del ciclo di PCR che l'ha generata.

Esistono diverse tecniche di applicazione di questo sistema. Nella tecnica TaqMan™ (Holland *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 1993), il fluoroforo e il quencher sono legati rispettivamente alle estremità 5' e 3' della sonda. Durante la PCR, se la sonda forma un ibrido stabile con la regione complementare dell'amplificato, l'estremità 5' della sonda può interagire con la DNA polimerasi che, provocandone l'idrolisi durante la sintesi del filamento di cDNA, separa il fluoroforo dal quencher, rendendo visibile la fluorescenza. Un secondo metodo è costituito dai Molecular beacons™ (Tyagi e Kramer, 1996) in cui la sonda ha una particolare conformazione ("hairpin"), in cui sono presenti un'ansa a singolo filamento, costituita dalla sonda, e uno stelo di basi appaiate, costituito da sequenze estranee all'amplicone e complementari tra loro. Fluoroforo e quencher sono legati all'estremità 5' e 3' terminali di tale stelo. Solo in presenza di ibridazione tra sonde e amplicone, il fluoroforo e il quencher vengono separati e il segnale fluorescente può essere percepito. Un'altra applicazione è la Scorpion™ (Whitcombe *et al.*, 1999), in cui la sonda ha una struttura tipo "hairpin" legata all'estremità 5' di uno dei primer tramite un monomero non amplificabile (ad esempio glicole exaetilenico, HEG), per impedire che la sonda e il relativo stelo siano copiati nel filamento complementare durante la sua sintesi. La sonda si potrà ibridare solo con il corrispondente segmento complementare dell'amplicone neosintetizzato emettendo fluorescenza.

### V.1.3 Ibridazione molecolare

Le tecniche basate sulla ibridazione tra acidi nucleici prevedono l'impiego di sonde molecolari marcate, complementari alle sequenze da rilevare e con specificità variabile a seconda delle esigenze. Il DNA da analizzare (DNA bersaglio), dopo essere stato denaturato viene depositato direttamente su una membrana di nylon o di nitrocellulosa (*dot blot*), oppure vi viene trasferito, mediante assorbimento per capillarità (*blotting*), previa digestione con endonucleasi di restrizione e separazione elettroforetica dei frammenti che ne derivano (*Southern blot*; Southern, 1975). Successivamente, la membrana è esposta a una soluzione contenente la sonda, denatu-

rata a sua volta; questa è rappresentata da un frammento di DNA o RNA marcato con isotopi radioattivi o con molecole non radioattive (digossigenina, biotina ecc.). A ibridazione avvenuta, dopo aver eliminato il residuo di sonda non legata specificamente alla sequenza bersaglio si individua la presenza dell'ibrido attraverso un segnale impresso su lastra autoradiografica.

La specificità del metodo può essere regolata da diversi fattori, quali la temperatura o la concentrazione salina, in modo che l'ibridazione avvenga fra sequenze con un maggiore o minore livello di omologia: la cosiddetta "stringenza" (Schildkraut *et al.*, 1961; Wetmur, 1991). La sonda ideale da impiegare come reattivo diagnostico dovrebbe riconoscere tutti gli isolati di uno stesso patogeno e, nel contempo, non formare ibridi con il DNA di altri organismi.

Le sonde possono derivare da frammenti clonati a caso dal DNA del microrganismo studiato (Manicom *et al.*, 1987; Martin, 1991; Sauer *et al.*, 1993), da sequenze altamente ripetute (Hamer *et al.*, 1989) o da frammenti di DNA mitocondriale (Kim *et al.*, 1993). Oltre a sonde omologhe, è possibile utilizzare sonde derivanti da altri organismi (Michelmore e Hulbert, 1987). Sono comunemente impiegati frammenti di DNA o RNA ribosomiale, altamente conservati tra gli eucarioti e presenti in centinaia di copie nel genoma, in grado di distinguere a livello specifico o subspecifico (Kasuga e Mitchelson, 1994). Per differenziare isolati della stessa specie provenienti da diverse aree geografiche o aventi differenti attitudini parassitarie si è diffuso l'impiego di sequenze di DNA ripetute in tandem dette VNTR (*Variable Number of Tandem Repeat*) o minisatelliti (Jeffreys *et al.*, 1985).

### V.1.4 Caratteristiche dei funghi associati ad alterazioni del legno della vite e protocolli di diagnosi

In questi ultimi anni, in diversi laboratori in Italia e all'estero, sono state intensificate le ricerche sulla diagnosi dei funghi dell'esca e di altri funghi comunque associati ad alterazioni osservate nel legno di piante di vite e assegnate a malattie diverse.

Di seguito sono brevemente descritte le principali caratteristiche morfotassonomiche dei funghi associati al mal dell'esca, alla malattia di Petri e alle altre alterazioni del legno della vite, nonché le tecniche biochimiche e molecolari disponibili per la loro identificazione e rilevazione.

#### ASCOMICETI

##### TOGNINIA / PHAEOCREMONIUM

Il genere *Phaeocremonium*, descritto da Crous *et al.* (1996), è morfologicamente intermedio tra *Phialophora* e *Acremonium* e include specie distribuite ovunque (Crous *et al.*, 1996; Larignon e Dubos, 1997; Morton, 1997; Pascoe, 1998, 1999; Mugnai *et al.*, 1999). Diverse specie del genere *Phaeocremonium* hanno il teleomorfo nel genere *Togninia* (Mostert *et al.*, 2003).

Diverse specie sono state isolate da viti affette da mal dell'esca; tra queste, *Phaeocremonium aleophilum* W. Gams, Crous, M.J. Wingf. & L. Mugnai sembra la più comune (Larignon e Dubos, 1997; Mugnai *et al.*, 1999; Groenewald *et al.*, 2001); tuttavia, diverse altre specie sono state rinvenute con differente incidenza in relazione all'area viticola oggetto di indagine (Dupont *et al.*, 2000, 2002). Nel genere sono distinti tre tipi di fialidi (☞ Mostert *et al.*, 2005).

■ ***Togninia austroafricana* L. Mostert, W. Gams & Crous**  
(anam. *Phaeoacremonium austroafricanum* L. Mostert, W. Gams & Crous)

Rinvenuta su *Vitis vinifera* in Sud Africa (Mostert *et al.*, 2001).

**Inquadramento tassonomico (Kirk *et al.*, 2008)**

Regno:	Fungi
Phylum:	Ascomycota
Classe:	Sordariomycetes
Sottoclasse:	Sordariomycetidae
Ordine:	Diaporthales
Famiglia:	Togniniaceae
Genere:	<i>Togninia</i>
Specie:	<i>Togninia austroafricana</i> L. Mostert, W. Gams & Crous (anam. <i>Phaeoacremonium austroafricanum</i> L. Mostert, W. Gams & Crous)

**Caratteristiche morfologiche e colturali (Crous *et al.*, 1996; Mostert *et al.*, 2006b)**

**Colonie:** raggiungono 10-16 mm di diametro in 8 giorni a 25°C (temperatura ottimale 25°C, minima 15°C, massima 30°C). Su MEA, colonie da fiocose a cotonose, lieviformi, micelio aereo molto rado, margine intero; dopo 8 giorni bianco-giallastre superiormente e gialle sul rovescio della piastra; dopo 16 giorni da arancio-bruno a bianco-giallo sul margine, sul fondo da grigio-arancio ad arancio chiaro. Specie eterotallica differenzia periteci in 20-32 settimane.

**Periteci:** generalmente aggregati e subemergenti, subglobosi, talvolta obpiriformi, diametro (64)66-175(181) µm, lunghezza (88)92-193(201) µm; parete costituita da due regioni di *textura angularis*: la più esterna è bruno-scura con cellule più piccole e più arrotondate di quelle dello strato superiore, costituita da circa 4-5 cellule, dello spessore di 6-10 µm; lo strato più interno è ialino nella porzione centrale, leggermente scuro verso la periferia, costituito da 3-4 cellule, di 56 µm; la superficie è ricoperta di appendici ifali settate e brune che divengono più chiare nella porzione apicale (più abbondanti nei periteci più vecchi).

**Collo:** nero, 1-2 per peritecio, da diritto a curvato, verrucato, lungo 490-1470 µm e largo 34-54 µm alla base e 25-44 µm all'apice, talvolta diviso in due all'apice.

**Parafisi:** ialine, settate, cilindriche, più strette alla punta, lunghe 30-105 (media 68) µm e larghe 2,5-4 (media 3) µm alla base e 1,5-3 (media 2) µm all'apice, persistenti.

**Aschi:** a forma di spiga a maturità, ialini, clavati, con apici arrotondati, (16)17-21(22) × 4-5 (media 19 × 4) µm.

**Ife ascogene:** ialine, ramificate, a parete liscia, reniformi alla base, 4 × 2-2,5 µm.

**Ascospore:** non settate, ialine, reniformi, oblunghe-ellissoidi con apici arrotondati e spesso con piccole guttule alle estremità, biseriate, 3-5 × 1,5-2 (media 4 × 2) µm.

**Micelio:** ife ramificate, settate, singole o in fasci fino a 10, tubercolate con tubercoli di 1 µm di diametro, verrucose, da bruno chiaro a ialine, larghe 2-3 µm.

**Conidiofori:** generalmente corti, semplici, emergenti da ife aeree o sub-emergenti, eretti, al massimo con 4 setti, spesso terminanti con un'unica fialide, bruno chiaro, più chiari all'apice, da lisci a verrucosi, lunghi (15)16-42(60) (av. 25) µm e larghi 1,5-2,5(3) (av. 2) µm.

**Fialidi:** terminali o laterali, generalmente monofalidi, da lisce a verrucose, da sub-ialine a ialine; collaretti 1-2 × 1 µm; fialidi di tipo I cilindriche, occasionalmente più ampie alla base, 2-7 × 1(2) (media 5 × 1) µm; fialidi di tipo II allungate-ampolliformi e allargate alla base, o subcilindriche, affusolate all'apice 6-12(13) × 1,5-2(2,5) (media 9 × 1,5) µm; fialidi di tipo III, le più comuni, subcilindriche o navicolari, lunghe 13-19 (media 16) µm.

**Conidi:** ialini, generalmente oblunghe-ellissoidali o allantoidi, 5-9 × 1,5-2(2,5) (media 5 × 2) µm.

**Principali caratteri distintivi da specie simili**

*P. austroafricanum* può essere distinto dalle altre specie per il colore rosso assunto dalla colonia su OA. La crescita delle colonie è più lenta (10-16 mm di diametro dopo 8 giorni) di quella di *Phaeoacremonium angustius*, che su OA assume la stessa colorazione rossastra. Le fialidi di tipo III sono predominanti mentre in *P. angustius* prevalgono quelle di tipo I.

**Substrati semiselettivi**

Rosa Bengala Cloramfenicolo Agar (Rooney *et al.*, 2001) (☞ *Appendice I*, 1).

**Protocolli per la diagnosi molecolare**

- Primer specie-specifici disegnati sui geni codificanti la  $\beta$ -tubulina e l'actina (Mostert *et al.*, 2006b) (☞ *Appendice II*, 1).  
*Primer:* senso T1 (O'Donnell e Cigelnik, 1997); antisenso Pbr6\_2 (Mostert *et al.*, 2006b)  
*Dimensioni del prodotto di amplificazione:* 257 bp.

■ ***Togninia fraxinopennsylvanica* (T.E. Hinds) Hausner, Eijolfsdottir & J. Reid**  
(anam. *Phaeoacremonium mortoniae* Crous & W. Gams)

Specie isolata da vite e frassino in Spagna, Svezia e Stati Uniti (Groenewald *et al.*, 2001; Gramaje *et al.*, 2007) e da olivo in Italia (Carlucci *et al.*, 2008a; 2008b).

**Inquadramento tassonomico (Kirk *et al.*, 2008)**

Regno:	Fungi
Phylum:	Ascomycota
Classe:	Sordariomycetes
Sottoclasse:	Sordariomycetidae
Ordine:	Diaporthales
Famiglia:	Togniniaceae
Genere:	<i>Togninia</i>
Specie:	<i>Togninia fraxinopennsylvanica</i> (T.E. Hinds) Hausner, Eijolfsdottir & J. Reid (anam. <i>Phaeoacremonium mortoniae</i> Crous & W. Gams)

**Caratteristiche morfologiche e colturali (Crous *et al.*, 1996; Mostert *et al.*, 2006b)**

**Colonie:** 20-26 mm di diametro in 8 giorni a 25°C (temperatura ottimale 25-30°C, minima 15°C, massima 35°C). Su MEA, da fiocose a cotonose con margine intero; dopo 8 giorni, bianche con rade aree giallo-grigie che diventano bianco-giallo sul margine, sul fondo da

grigio-arancio ad arancio chiaro. Specie eterotallica, differenzia periteci in 20-32 settimane.

**Periteci:** singoli o a grappoli, subglobosi talvolta obpiriformi, (181)185-252(270) µm di diametro e lunghi (181)187-258(270) µm. Parete costituita da due regioni di *textura angularis*: la più esterna è bruno scuro con cellule più piccole e più arrotondate di quelle dello strato superiore, costituito da circa 4-8 cellule dello spessore di 10-13(17) µm; lo strato più interno, ialino nella porzione centrale, è invece leggermente più scuro verso la periferia, 3-8 cellule di 8-15 µm; la superficie è ricoperta di appendici ifali settate e brune che divengono più chiare nella porzione apicale (più abbondanti nei periteci più vecchi).

**Collo:** nero, 1-2(3) per peritecio, da diritto a curvato, verrucato, lungo (390)410-1115(1125) µm e largo 40-60(65) µm alla base e 25-34 µm all'apice, talvolta diviso in due all'apice.

**Parafisi:** ialine, settate, cilindriche, più strette alla punta, lunghe 45-100 (media 66) µm e larghe 2-5 (media 3) µm alla base e 1-2,5 (media 2) µm all'apice, persistenti.

**Aschi:** a forma di spiga a maturità, ialini, clavati, con apici arrotondati, 15-20 × 4(5) (media 17 × 4 µm).

**Ife ascogene:** ialine, ramificate, a parete liscia, larghe alla base 4 × 2-2,5 µm.

**Ascospore:** senza setti, ialine, reniformi, oblunghe-ellissoidi con apici arrotondati e spesso con piccole guttule alle estremità, biseriali, 3,5-5 × 1 (media 4 × 1) µm.

**Micelio:** ife ramificate, settate, singole o in fasci fino a 19, tubercolate con tubercoli di 0,5 µm di diametro, verrucose, da bruno chiaro a ialine, larghe 1,5-2,5 µm.

**Conidiofori:** generalmente corti, semplici, emergenti da ife aeree o subemergenti, eretti, con al massimo 2 setti, spesso terminanti con un'unica fialide, bruno chiaro più chiari all'apice, da lisci a verrucosi, (16)20-30(40) (media 26) µm × (1,5)2(2,5) (media 2) µm.

**Fialidi:** terminali o laterali, generalmente monofalidi, da lisce a verrucose, da bruno chiaro a ialine, fialidi di tipo I e II più comuni, collaretti lunghi 1 µm; fialidi di tipo I cilindriche, occasionalmente più ampie alla base 2-9(10) × 1-1,5(2) (media 5 × 1,5) µm; fialidi di tipo II allungate-ampolliformi e allargate alla base, o sub cilindriche, affusolate all'apice, 7-12 × 1,5-2 (media 10 × 2) µm; fialidi di tipo III sub-cilindriche o navicolari, 13-29 × 1,5-2 (media 24 × 2) µm, affusolate.

**Conidi:** generalmente oblunghe-ellissoidi o reniformi, 3-4(5) × 1(1,5) (media 4 × 1) µm.

#### Principali caratteri distintivi da specie simili

*Phaeoacremonium mortoniae* si distingue dalle altre specie per il colore generalmente bianco-grigio pallido delle colonie su MEA e bianco-giallo su PDA e OA. Fialidi predominanti sono quelle di tipo I e II, con quelle di tipo II che hanno aspetto "corto e tozzo".

#### Substrati semiselettivi

Rosa Bengala Cloramfenicolo Agar (Rooney *et al.*, 2001) (☞ *Appendice I, I*).

#### Protocolli per la diagnosi molecolare

- Primer specie-specifici disegnati sui geni codificanti la β-tubulina e l'actina (Mostert *et al.*, 2006b) (☞ *Appendice II, I*)

*Primer:* senso T1 (O'Donnell e Cigelnik, 1997); antisense Pbr11 (Mostert *et al.*, 2006b)

*Dimensioni del prodotto di amplificazione:* 257 bp.

- Primer genere-specifici disegnati sulle regioni ITS1 e ITS2 (Aroca e Raposo, 2007) (☞ *Appendice II, 2*)  
*Primer:* senso Pm1; antisense Pm2 (Aroca e Raposo, 2007)  
*Dimensioni del prodotto di amplificazione:* 415 bp.
- Nested-PCR (Aroca e Raposo, 2007) (☞ *Appendice II, 3*)  
Prima amplificazione – *Primer:* senso ITS1F; antisense ITS4 (White *et al.*, 1990)  
Seconda amplificazione – *Primer:* senso Pm1; antisense Pm2 (Aroca e Raposo, 2007)  
*Dimensioni del prodotto di amplificazione:* 415 bp.
- Real-time PCR SYBR®Green con coppie di primer genere-specifici disegnati sulla regione ITS (Overton *et al.*, 2004) (☞ *Appendice II, 4*)  
*Primer:* senso Pac1f; antisense Pac2r (Overton *et al.*, 2004)  
*Dimensioni del prodotto di amplificazione:* 428 bp.
- Altri protocolli non dettagliati: PCR-RFLP (Aroca e Raposo, 2007).

■ **Togninia krajdienii L. Mostert, W. Gams & Crous**  
(anam. *Phaeoacremonium krajdienii* L. Mostert, Summerb. & Crous)  
Specie isolata dall'uomo e da vite in Sud Africa (Mostert *et al.*, 2005).

#### Inquadramento tassonomico (Kirk *et al.*, 2008)

Regno:	Fungi
Phylum:	Ascomycota
Classe:	Sordariomycetes
Sottoclasse:	Sordariomycetidae
Ordine:	Diaporthales
Famiglia:	Togniniaceae
Genere:	<i>Togninia</i>
Specie:	<i>Togninia krajdienii</i> L. Mostert, W. Gams & Crous (anam. <i>Phaeoacremonium krajdienii</i> L. Mostert, Summerb. & Crous)

#### Caratteristiche morfologiche e colturali (Crous *et al.*, 1996; Mostert *et al.*, 2006b)

**Colonie:** di 18-28 mm di diametro dopo 8 giorni a 25°C (temperatura ottimale 30°C, minima 15°C, massima 37°C). Su MEA, fiocose con margine intero; dopo 8 giorni da bruno divengono biondo-scuro anche sul fondo; dopo 16 giorni bruno-grigie superiormente e bruno-nere sul fondo. Specie eterotallica, differenzia periteci in 12-20 settimane.

**Periteci:** generalmente a grappoli, sub-epidermici o epidermici; subglobosi, talvolta obpiriformi, (197)203-275 µm di diametro, (202)203-284(287) µm di lunghezza. Parete costituita da due regioni di *textura angularis*: la più esterna bruno-scura dello spessore di 8-11 µm con 4-6 cellule più piccole e più arrotondate di quelle dello strato superiore; lo strato più interno ialino nella porzione centrale, leggermente scuro verso la periferia, (4)5-7 cellule di 7-12 µm; superficie ricoperta di appendici ifali settate e brune che divengono più chiare nella porzione apicale (più abbondanti nei periteci più vecchi).

**Collo:** nero, 1-2 per peritecio, da diritto a curvato, verrucoso, lungo 220-440 µm e largo 39-69 µm alla base e 34-54 µm all'apice, talvolta diviso in due all'apice e con noduli di 17 µm di diametro.

**Parafisi:** ialine, settate, cilindriche, più strette e a contatto alla punta, lunghe 40-290 (media 95) µm e larghe 2,5-4,5 (media 3) µm alla base e 1-3 (media 2) µm all'apice, persistenti.

**Aschi:** a forma di spiga a maturità, ialini, clavati, con apici arrotondati, (16)18-22(23) × 4-5 (media 21 × 4 µm).

**Ife ascogene:** ialine, ramificate, a parete liscia, alla base 5 × 1,5-4 µm.

**Ascospore:** non settate, ialine, allantoidi, oblunghe-ellissoidi con apici arrotondati e talvolta con piccole guttule alle estremità, bisierate, 4-5(6) × 1-1,5 µm (media 5 × 1) µm.

**Micelio:** ife ramificate e settate, singole o in fasci sino a 8, fortemente tubercolate con tubercoli di 1 µm di diametro, verrucose, da nere a brune, larghe 2-3 µm.

**Conidiofori:** corti e generalmente non ramificati, occasionalmente più stretti in prossimità del setto basale al massimo con 5 setti, spesso terminanti con una seconda fialide laterale alla fialide apicale, lunghi (16)20-45(76) (media 28) µm e larghi 1,5-3 (media 2) µm.

**Fialidi:** terminali o laterali, spesso polifialidi, da tubercolari a verrucose, raramente lisce, da bruno chiaro a ialine; collaretti lisci, lunghi 1-3 µm e larghi 1-2 µm; fialidi di tipo I cilindriche, occasionalmente allargate alla base e filiformi all'apice (2)4-13(17) × 1-1,5(2) (media 7 × 1) µm; fialidi di tipo II, prevalenti, allungate-ampolliformi e allargate alla base, o sub cilindriche, (8)8,5-14 × 1,5-2(2,5) (media 12 × 2) µm; fialidi di tipo III sub-cilindriche o navcolari, talvolta allungate-ampolliformi più ampie alla base 14-21(25) × 1-2(2,5) (media 17 × 2) µm e gradualmente assottigliate all'apice.

**Conidi:** oblunghe-ellissoidali o allantoidi, da subialini a ialini 3-5(5,5) × 1-1,5(2) (media 4 × 1) µm.

#### Principali caratteri distintivi da specie simili

*Phaeoacremonium krajdenui* è distinto da *P. parasiticum*, *P. tardicrescens* e *P. sphinctrophorum* perché frequentemente polifialidico. *P. krajdenui* ha conidiofori corti generalmente semplici, mentre quelli di *P. parasiticum* sono molto lunghi. *P. krajdenui* ha tubercoli più piccoli (fino a 1 µm di diametro) di quelli di *P. parasiticum* (fino a 3 µm di diametro). *P. krajdenui* si distingue da *P. tardicrescens* perché cresce più velocemente e il colore della colonia è più scuro su MEA.

#### Substrati semiselettivi

Rosa Bengala Cloramfenicolo Agar (Rooney *et al.*, 2001) (☞ *Appendice I*, 1).

#### Protocolli per la diagnosi molecolare

- Primer specie-specifici disegnati sui geni codificanti la β-tubulina e l'actina (Mostert *et al.*, 2006b) (☞ *Appendice II*, 1)  
Primer: senso T1 (O'Donnell e Cigel'nik, 1997); antisense Pbr13 (Mostert *et al.*, 2006b)  
Dimensioni del prodotto di amplificazione: 272 bp.
- Primer genere-specifici disegnati sulle regioni ITS1 e ITS2 (Aroca e Raposo, 2007) (☞ *Appendice II*, 2)  
Primer: senso Pm1; antisense Pm2 (Aroca e Raposo, 2007)  
Dimensioni del prodotto di amplificazione: 415 bp.

- Nested-PCR (Aroca e Raposo, 2007) (☞ *Appendice II*, 3)  
Prima amplificazione – Primer: senso ITS1F; antisense ITS4 (White *et al.*, 1990)  
Seconda amplificazione – Primer: senso Pm1; antisense Pm2 (Aroca e Raposo, 2007)  
Dimensioni del prodotto di amplificazione: 415 bp.
- Altri protocolli non dettagliati: PCR-RFLP (Aroca e Raposo, 2007).

#### ■ *Togninia minima* (Tul. & C. Tul.) Berl.

(anam. *Phaeoacremonium aleophilum* W. Gams, Crous, M.J. Wingf. & L. Mugnai)

Specie isolata da diversi ospiti, olivo e vite inclusi, in Argentina, Australia, Austria, Canada, Cile, Francia, Iran, Italia, ex Jugoslavia, Spagna, Sud Africa, Turchia, USA (Scheck *et al.*, 1998; Mugnai *et al.*, 1999; Dupont *et al.*, 2002; Mostert *et al.*, 2006b, Carlucci *et al.*, 2008a; 2008b).

#### Inquadramento tassonomico (Kirk *et al.*, 2008)

Regno:	Fungi
Phylum:	Ascomycota
Classe:	Sordariomycetes
Sottoclasse:	Sordariomycetidae
Ordine:	Diaporthales
Famiglia:	Togniniaceae
Genere:	<i>Togninia</i>
Specie:	<i>Togninia minima</i> (Tul. & C. Tul.) Berl. (anam. <i>Phaeoacremonium aleophilum</i> W. Gams, Crous, M.J. Wingf. & L. Mugnai)

#### Caratteristiche morfologiche e colturali (Crous *et al.*, 1996; Mostert *et al.*, 2006b)

**Colomie:** 5-22 mm di diametro in 8 giorni a 25°C (temperatura ottimale 30°C, minima 10°C, massima 37-40°C); su MEA generalmente a tessitura feltrosa con margine intero; dopo 8 giorni bianco-giallastre o grigio-arancio; sul fondo, da giallo chiaro a bruno-arancio; dopo 16 giorni superiormente da giallo chiaro a grigio e sul fondo da giallo chiaro a marrone; produce un pigmento giallo su PDA e OA. Specie eterotallica, forma periteci in 3-4 settimane.

**Periteci:** generalmente aggregati, talvolta singoli, di solito sub-epidermici o epidermici, globosi-subglobosi o piriformi, con diametro di (160)250-285(420) µm e lunghi (200)285-325(400) µm. Pareti costituite da due regioni di *textura angularis*: la regione più esterna è bruno-scura con cellule più piccole e più arrotondate di quelle dello strato sovrastante, costituito da circa 8-10 cellule (cellule singole non visibili) dello spessore di 20-40 µm; la regione sottostante è ialina nella porzione centrale, marrone chiaro verso la periferia, 5-7 cellule di 12-28 µm; superficie coperta di appendici ifali settate e brune che divengono ialine all'apice (più abbondanti su periteci vecchi).

**Collo:** nero, 1-3(6) per peritecio, cilindrico, da diritto a curvo, verrucato, lungo 800-1800 µm e largo alla base 35-130 µm e all'apice 20-60 µm, talvolta diviso in due all'apice. Non è raro trovare periteci con più colli che presentano all'interno una leggera parete che divide le camere periteciali.

**Parafisi:** ialine, settate, cilindriche, ristrette all'apice, lunghe 45-125 (media 83)  $\mu\text{m}$  e larghe alla base 2-4  $\mu\text{m}$  (media 3) e all'apice 1,5-2 (media 2)  $\mu\text{m}$ , persistenti.

**Aschi:** a forma di spiga a maturità, ialini, clavati, con apici smussati.

**Ife ascogene:** ialine e ramificate.

**Ascospore:** settate, ialine, oblunghe da ellissoidali ad allantoidi con apici arrotondati, talvolta contenenti piccole guttule all'apice, biseriate, (4)4,5-5(6,5)  $\times$  1-2 (media 5  $\times$  2)  $\mu\text{m}$ .

**Micelio:** ife settate e ramificate, singole o a fasci fino a 25, con tubercoli sino a 1,5  $\mu\text{m}$   $\varnothing$ .

**Conidiofori:** generalmente corti e non ramificati, emergenti da ife aeree o sommerse, eretti, semplici e spesso ridotti a cellule conidiogene, raramente con 3 setti, subcilindrici, marrone chiaro e più chiari all'apice, lisci o verrucosi, diritti o leggermente curvati all'apice spesso portanti una singola fialide come cellula apicale, lunghi (15)17-42(46) (media 29)  $\mu\text{m}$  e larghi 1,5-2,5 (media 2)  $\mu\text{m}$ .

**Fialidi:** terminali o laterali, generalmente monofalidi, subialine, collareto lungo 1-1,5  $\mu\text{m}$  e largo 1,5-2  $\mu\text{m}$ ; le fialidi di tipo II e III sono le più comuni; fialidi di tipo I cilindriche, occasionalmente allargate alla base (1,5)2-9(11)  $\times$  1-1,5 (media 5  $\times$  1)  $\mu\text{m}$ ; fialidi di tipo II da allungate ad ampolliformi (6)9-14(15)  $\times$  1,5-2 (2,5) (media 11  $\times$  2)  $\mu\text{m}$ ; fialidi di tipo III subcilindriche o allungate, ampolliformi e attenuate alla base, (14)15-22  $\times$  1,5-2 (media 18  $\times$  2)  $\mu\text{m}$ , affusolate.

**Conidi:** aggregati all'apice di cellule conidiogene, ialini, da ellissoidali ad allungati, occasionalmente reniformi, 3-5  $\times$  1-2 (media 4  $\times$  1,5)  $\mu\text{m}$ , se vecchi possono presentare 2 guttule.

#### Principali caratteri distintivi da specie simili

A causa del lento sviluppo delle colonie su substrato artificiale, l'identificazione su base morfologica non è molto facile. *P. aleophilum* si distingue da *P. parasiticum* e *P. inflatipes* per i piccoli rami conidiofori che non presentano ramificazioni nonché per le sue caratteristiche colturali e le dimensioni dei conidi (Crous *et al.*, 1996).

#### Substrati semiselettivi

- Rosa Bengala Cloramfenicolo Agar (Rooney *et al.*, 2001) (☞ Appendice I, 1).
- Estratto di Malto Agar Streptomycin (Giménez-Jaime *et al.*, 2006) (☞ Appendice I, 2).

#### Protocolli per la diagnosi molecolare

- Primer specie-specifici disegnati sui geni codificanti la  $\beta$ -tubulina e l'actina (Mostert *et al.*, 2006b) (☞ Appendice II, 1)  
Primer: senso T1 (O'Donnell e Cigelnik, 1997); antisenso Pbr13 (Mostert *et al.*, 2006b)  
Dimensioni del prodotto di amplificazione: 272 bp.
- Primer genere-specifici disegnati sulle regioni ITS1 e ITS2 (Aroca e Raposo, 2007) (☞ Appendice II, 2)  
Primer: senso Pm1; antisenso Pm2 (Aroca e Raposo, 2007)  
Dimensioni del prodotto di amplificazione: 415 bp.
- Nested-PCR (Aroca e Raposo, 2007) (☞ Appendice II, 3)  
Prima amplificazione – Primer: senso ITS1F; antisenso ITS4 (White *et al.*, 1990)

Seconda amplificazione – Primer: senso Pm1; antisenso Pm2 (Aroca e Raposo, 2007)

Dimensioni del prodotto di amplificazione: 415 bp.

- Real-time PCR SYBR<sup>®</sup>Green con coppie di primer genere-specifici disegnati sulla regione ITS (Overton *et al.*, 2004) (☞ Appendice II, 4)  
Primer: senso Pac1f; antisenso Pac2r (Overton *et al.*, 2004)  
Dimensioni del prodotto di amplificazione: 428 bp.
- Primer specie-specifici disegnati sulla regione ITS (Tegli *et al.*, 2000) (☞ Appendice II, 5)  
Primer: senso Pal1N; antisenso Pal2 (Tegli *et al.*, 2000)  
Dimensioni del prodotto di amplificazione: 400 bp.
- Altri protocolli non dettagliati:  
PCR-RFLP (Aroca e Raposo, 2007; Tegli *et al.*, 2000; Dupont *et al.*, 2002).

#### Metaboliti per la diagnosi biochimica

- Pullulani (Sparapano *et al.*, 1998; Bruno e Sparapano, 2007)  
Substrato: 4 liquidi nutritivi a base di soluzione di Czapeck diversi per fonti di azoto e carbonio, per 21 giorni  
Solvente di estrazione: Etanolo assoluto  
Metodo di separazione: Analisi cromatografica.
- Scitalone e isosclerone (Evidente *et al.*, 2000; Bruno *et al.*, 2007)  
Substrato: 150 ml Czapek modificato contenente 0,1% di lievito e 0,1% di estratto di malto (pH 5,8)  
Condizioni di allevamento: 25 °C per 28 giorni  
Filtri: Miracloth (Calbiochem, La Jolla, CA-USA) e filtri Millipore (Millipore, Bedford, MA-USA, 0,45 mm)  
Solvente di estrazione: etil-acetato  
Purificazione: cromatografia su colonne di gel di silice  
Eluzione: cloroformio:isopropanolo (9:1)  
Analisi: TLC in cloroformio:isopropanolo (9:1).
- *p*-idrossibenzaldeide e scitalone (Tabacchi *et al.*, 2000)  
Substrato: Eriksson e Petersson, 1975  
Condizioni di allevamento: 25 °C per 28 giorni  
Filtro: celite  
Solvente di estrazione: etil-acetato  
Purificazione: colonna per cromatografia (silica gel; gradiente esano/EtOAc)  
Ulteriore purificazione: HPLC, colonna RP-C-18 (gradiente MeOH-H<sub>2</sub>O).
- Composti fenolici: acido gallico, acido protocatecuico, 2,5-diidrossibenzaldeide, siringaldeide, acido *p*-cumarico, acido ferulico, rutina, *trans*-resveratrolo, miricetina, quercetina-3-ramnoside, quercetina e caempferolo (Bruno e Sparapano, 2006a)  
Substrato: colture duali calli di vite-fungo o filtrati colturali ottenuti allevando il fungo su MEA per 28 giorni a 25 °C  
Solvente di estrazione: dietil-etere; etil-acetato  
Metodo di separazione: analisi cromatografica in HPLC.



■ **Togninia parasitica** L. Mostert, W. Gams & Crous  
(anam. *Phaeoacremonium parasiticum* (Ajello, Georg & C.J.K. Wang)  
W. Gams, Crous & M.J. Wingf.)

Specie rinvenuta su *Actinidia*, *Phoenix dactylifera*, *Prunus armeniaca*, *Vitis vinifera* e uomo in: Australia, Brasile, Canada, Finlandia, Iraq, Italia, Sud Africa, Tunisia e Stati Uniti (Crous *et al.*, 1996; Mostert *et al.*, 2001).

**Inquadramento tassonomico (Kirk *et al.*, 2008)**

Regno:	Fungi
Phylum:	Ascomycota
Classe:	Sordariomycetes
Sottoclasse:	Sordariomycetidae
Ordine:	Diaporthales
Famiglia:	Togniniaceae
Genere:	<i>Togninia</i>
Specie:	<i>Togninia parasitica</i> L. Mostert, W. Gams & Crous (anam. <i>Phaeoacremonium parasiticum</i> (Ajello, Georg & C.J.K. Wang) W. Gams, Crous & M.J. Wingf.)

**Caratteristiche morfologiche e colturali (Crous *et al.*, 1996; Mostert *et al.*, 2006b)**

**Colonie:** 21-23 mm di diametro in 8 giorni a 25°C (temperatura ottimale 30°C, minima 15°C, massima 40°C). Su MEA, feltrosa con margine intero, dopo 8 giorni da grigio-giallo a marrone-grigio sul bordo, sul fondo grigio-beige; dopo 16 giorni, da marrone-oliva a grigio-beige sia sul margine che sul fondo. Specie eterotallica, differenzia periteci in 8-12 settimane.

**Periteci:** generalmente aggregati, talvolta singoli, generalmente sottoepidermici, si rinvengono meno frequentemente sulla superficie dell'epidermide; sub-globosi, talvolta obpiriformi, diametro di (180)200-345(370) µm, nella parte basale raggiungono uno spessore di (215)230-380(410) µm. La parete consiste di due regioni di *textura angularis*: regione esterna di colore bruno scuro con cellule piuttosto piccole e più arrotondate di quelle esterne, circa 7-9 cellule (cellule singole non sono visibili) con spessore di 15-24 µm; la regione più interna è ialina nella parte centrale, marrone chiaro alla periferia, 5-9 cellule con (10)14-20 µm di spessore, ricoperte da appendici ifali settate, di color marrone che divengono ialine all'apice (più abbondanti nei periteci più vecchi).

**Collo:** nero, 1-2 per peritecio, può essere allungato o curvo, verrucato, lungo 215-810 µm e largo alla base 29-44 µm e all'apice 20-44 µm, talvolta diviso in due in prossimità dell'apice, può essere anche proliferante.

**Parafisi:** ialine, settate, cilindriche, lunghe 35-150 (media 85) µm, e larghe 2-4,5 (media 3) µm alla base e 1-3 (media 1) all'apice, persistenti.

**Aschi:** a forma di spiga in maturità, ialini, clavati, con apici arrotondati, (12)14-18 × (3,5)4-5 (media 16 × 4 µm), spessi 2-3 µm nella regione apicale.

**Ife ascogene:** ialine, ramificate.

**Ascospore:** non settate, ialine, allantoidi con punte rotonde talvolta contenenti piccole guttule agli apici, biseriata, 4-5 × 1-1,5 (media 4,5 × 1 µm).

**Micelio:** ife settate e ramificate, si presentano singolarmente o in fasci fino a 20, densamente tubercolate con tubercoli di 3 µm di diametro.

**Conidiofori:** in genere lunghi e ramificati, marroncini, divengono più chiari all'apice, hanno 1-7 setti, talvolta non ramificati, spesso con singole fialidi lunghe (24)27-80(130) (media 47) µm e larghe 1,5-2,5 (media 2) µm.

**Fialidi:** terminali o laterali, collaretti lunghi 0,5-2 µm e larghi 1-2 µm; fialidi di tipo I cilindriche, occasionalmente allargate alla base (2)4-17 × 1-2 (media 11 × 1) µm; fialidi di tipo II, più rare, sub-cilindriche, affusolate all'apice, 14-15 × 1,5-2 (media 14,5 × 2) µm; fialidi di tipo III, predominanti, cilindriche alla base e affusolate all'apice 19-29(37) × 1,5-2(2,5) (media 23 × 2) µm.

**Conidi:** generalmente ellissoidali, talvolta allantoidi, 3-4(4,5) × (1)1,5-2 (media 3,5 × 1,5) µm, spesso aggregati per la copiosa presenza di sostanze mucillaginose.

**Principali caratteri distintivi da specie simili**

*Phaeoacremonium parasiticum* è facilmente distinguibile dalle altre specie di *Phaeoacremonium* per la presenza di conidiofori lunghi e ramificati, per le lunghe fialidi di tipo II e III, con ife bruno scuro, e larghi tubercoli fino a 3 µm di diametro.

**Substrati semiselettivi**

Rosa Bengala Cloramfenicolo Agar (Rooney *et al.*, 2001) (☞ *Appendice I*, 1).

**Protocolli per la diagnosi molecolare**

- Primer specie-specifici disegnati sui geni codificanti la β-tubulina e l'actina (Mostert *et al.*, 2006b) (☞ *Appendice II*, 1)  
*Primer:* senso T1 (O'Donnell e Cigelnik, 1997); antisenso Pbr2\_2 (Mostert *et al.*, 2006b)  
*Dimensioni del prodotto di amplificazione:* 446 bp.
- Primer genere-specifici disegnati sulle regioni ITS1 e ITS2 (Aroca e Raposo, 2007) (☞ *Appendice II*, 2)  
*Primer:* senso Pm1; antisenso Pm2 (Aroca e Raposo, 2007)  
*Dimensioni del prodotto di amplificazione:* 415 bp.
- Nested-PCR (Aroca e Raposo, 2007) (☞ *Appendice II*, 3)  
Prima amplificazione – *Primer:* senso ITS1F; antisenso ITS4 (White *et al.*, 1990)  
Seconda amplificazione – *Primer:* senso Pm1; antisenso Pm2 (Aroca e Raposo, 2007)  
*Dimensioni del prodotto di amplificazione:* 415 bp.
- Altri protocolli non dettagliati: PCR-RFLP (Aroca e Raposo, 2007; Tegli *et al.*, 2000; Dupont *et al.*, 2002).

■ ***Togninia viticola* L. Mostert, W. Gams & Crous**  
(anam. *Phaeoacremonium viticola* J. Dupont)

Specie rinvenuta su *Vitis vinifera* e *Sorbus intermedia* in Francia, Germania e Sud Africa (Dupont *et al.*, 2000; Overton *et al.*, 2005; Mostert *et al.*, 2005).

**Inquadramento tassonomico (Kirk *et al.*, 2008)**

Regno:	Fungi
Phylum:	Ascomycota
Classe:	Sordariomycetes
Sottoclasse:	Sordariomycetidae
Ordine:	Diaporthales
Famiglia:	Togniniaceae
Genere:	<i>Togninia</i>
Specie:	<i>Togninia viticola</i> L. Mostert, W. Gams & Crous (anam. <i>Phaeoacremonium viticola</i> J. Dupont)

**Caratteristiche morfologiche e colturali (Dupont *et al.*, 2000; Mostert *et al.*, 2006b)**

**Colonie:** 12-24 mm di diametro in 8 giorni a 25°C (temperatura ottimale 25-30°C, minima 15°C, massima 30-35°C); su MEA, da lanose a feltrose, margini interi, superiormente grigio-rosso o grigio-bianche dopo 8 giorni, sul fondo bruno-violetto o bianco-giallo; dopo 16 giorni da bruno-grigio a grigio-rosso superiormente e bruno-violetto sul fondo. Specie eterotallica, differenzia periteci in 12 settimane.

**Periteci:** generalmente aggregati e subepidermici, da globosi a subglobosi, diametro 225-362(377) µm, lunghezza (211)222-324(328) µm. Pareti consistenti di due regioni di *textura angularis*: la regione più esterna è bruno scuro con cellule più piccole e più arrotondate di quelle dello strato più interno, costituita da circa 5-8 cellule di 10-25 µm di spessore (non sono visibili cellule singole); la regione più interna, ialina al centro, diviene bruno-chiara in periferia, 5-10 cellule con uno spessore di 10-20 µm; la superficie è coperta da appendici ifali settate, brune che divengono ialine all'apice (più abbondanti nei periteci vecchi).

**Collo:** nero, 1(3) per peritecio, da diritto a curvato, verrucoso, lungo 360-1030 µm e largo 20-60 µm alla base e 12-32 µm all'apice, talvolta è diviso in due verso l'apice.

**Parafisi:** ialine, settate, cilindriche, assottigliate all'apice, lunghe 55-115 (media 82) µm e larghe alla base 1,5-4 (media 2) µm e 2-4 (media 2,5) µm all'apice, persistenti.

**Aschi:** a forma di spiga a maturità, ialini, clavati, con apici arrotondati (17)18-24(26) × (3)3,5-4(5) (media 21 × 4) µm.

**Ife ascogene:** ialine, ramificate alla base, di 4-5 × 2,5-3 µm.

**Ascospore:** non settate, ialine, da oblunghe-ellissoidali a reniformi, con apici arrotondati, talvolta contenenti piccole guttule alle estremità, biseriali o in singola linea, 3-5 × 1,5-2(2,5) (media 4 × 2) µm.

**Micelio:** ife ramificate e settate, singole o in fasci fino a 14, tubercolate con tubercoli fino a 2 µm di diametro, verrucose, da bruno-pallido a bruno, larghe 1,5-2 µm.

**Conidiofori:** generalmente corti e semplici, emergenti da ife aeree o sub-emergenti, eretti, semplici, con sino a 3 setti, spesso portanti una singola fialide come cellula apicale, bruno-pallido, più chiari alla punta, lunghi (15)18-49(80) (media 31) µm e larghi 1,5-2(2,5) (media 2) µm.

**Fialidi:** terminali o laterali, generalmente monofialidi, subialine, collaretti 1,5-2,5 × 1-1,5 µm; le più comuni sono quelle di tipo II e III; fialidi di tipo I cilindriche, occasionalmente più ampie alla base, 3-9 × 1-1,5(2) (media 6 × 1) µm; fialidi di tipo II allungate-ampolliformi e allargate alla base, o subcilindriche affusolate all'apice, (8)9-12(14) × 1,5-2 (media 10 × 1,5) µm; fialidi di tipo III subcilindriche, talvolta allungate-ampolliformi e allargate alla base, 12-17(18) × 1,5-2 (media 14 × 2) µm, gradualmente assottigliate.

**Conidi:** reniformi o obovoidi, 2-4 × 1(1,5) (media 3 × 1) µm.

**Principali caratteri distintivi da specie simili**

*Phaeoacremonium viticola* non cresce a 35°C e la temperatura ottimale è a 25°C e presenta un colore chiaro di ife e conidiofori. Il fungo, inoltre presenta un collareto lungo sino a 2,5 µm.

**Substrati semiselettivi**

Rosa Bengala Cloramfenicolo Agar (Rooney *et al.*, 2001) (☞ *Appendice I*, 1).

**Protocolli per la diagnosi molecolare**

- Primer specie-specifici disegnati sui geni codificanti la β-tubulina e l'actina (Mostert *et al.*, 2006b) (☞ *Appendice II*, 1)  
*Primer:* senso T1 (O'Donnell e Cigel'nik, 1997); antisenso Pbr8 (Mostert *et al.*, 2006b)  
*Dimensioni del prodotto di amplificazione:* 542 bp.
- Primer genere-specifici disegnati sulle regioni ITS1 e ITS2 (Aroca e Raposo, 2007) (☞ *Appendice II*, 2)  
*Primer:* senso Pm1; antisenso Pm2 (Aroca e Raposo, 2007)  
*Dimensioni del prodotto di amplificazione:* 415 bp.
- Nested-PCR (Aroca e Raposo, 2007) (☞ *Appendice II*, 3)  
Prima amplificazione – *Primer:* senso ITS1F; antisenso ITS4 (White *et al.*, 1990)  
Seconda amplificazione – *Primer:* senso Pm1; antisenso Pm2 (Aroca e Raposo, 2007)  
*Dimensioni del prodotto di amplificazione:* 415 bp.
- Real-time PCR SYBR®Green con coppie di primer genere-specifici disegnati sulla regione ITS (Overton *et al.*, 2004) (☞ *Appendice II*, 4)  
*Primer:* senso Pac1f; antisenso Pac2r (Overton *et al.*, 2004)  
*Dimensioni del prodotto di amplificazione:* 428 bp.
- Altri protocolli non dettagliati: PCR-RFLP (Aroca e Raposo, 2007; Dupont *et al.*, 2002).

### ■ *Phaeoacremonium angustius* W. Gams, Crous & M.J. Wingf.

Specie rinvenuta su *Vitis vinifera* in Portogallo e USA (Chicau *et al.*, 2000; Mostert *et al.*, 2005) e su olivo in Italia (Carlucci *et al.*, 2008a; 2008b).

#### Inquadramento tassonomico (Kirk *et al.*, 2008)

Regno:	Fungi
Phylum:	Ascomycota
Classe:	Sordariomycetes
Sottoclasse:	Sordariomycetidae
Ordine:	Diaporthales
Famiglia:	Togniniaceae
Genere:	<i>Phaeoacremonium</i>
Specie:	<i>Phaeoacremonium angustius</i> W. Gams, Crous & M.J. Wingf.

#### Caratteristiche morfologiche e colturali della forma anamorfa (Crous *et al.*, 1996; Mostert *et al.*, 2006b)

**Colonie:** 18-20 mm di diametro in 8 giorni a 25°C (temperatura ottimale 25°C, minima 15°C, massima 30°C); su MEA feltrose con margini interi; dopo 8 giorni di colore bianco-giallo chiaro nella parte superiore e giallo-chiaro sul fondo; dopo 16 giorni sia superiormente che sul fondo da bianche a grigiastre; su PDA e OA presenza di pigmenti gialli. Specie eterotallica, periteci differenziati in 12 settimane.

**Micelio:** ife ramificate e settate che corrono singolarmente o in fasci (sino a 9), tubercolate con tubercoli fino a 1 µm di diametro, verrucose, da bruno-pallido a ialine, larghe 1-3 µm.

**Conidiofori:** generalmente corti e semplici, emergenti da ife aeree o sub-emergenti, eretti, con un solo setto, spesso terminanti con una fialide, di colore bruno-pallido a ialino alla punta, da lisci a verrucosi, lunghi (15)16-42(60) (media 25) µm e larghi 1,5-2 (media 1,5) µm.

**Fialidi:** terminali o laterali, generalmente monofialidi, da lisce a verrucose, subialine con collaretti lunghi 0,5-1 µm e larghi 1-1,5 µm; fialidi di tipo I, le più comuni, cilindriche, occasionalmente più ampie alla base, (2,5)3-8,5(10) × 1(1,5) (media 6 × 1) µm; fialidi di tipo II cilindriche o navicolari, affusolate all'apice, (6)7-12 × 1,5 (media 11 × 1,5) µm; fialidi di tipo III subcilindriche, talvolta allungate-ampolliformi e allargate alla base, (11)12-19,5(20) × 1,5-2 (media 15 × 1,5) µm, gradualmente assottigliate.

**Conidi:** oblungo-ellissoidali o allantoidi 4-6 × 1 (1,5) (media 5 × 1) µm.

#### Principali caratteri distintivi da specie simili

*Phaeoacremonium angustius* e *P. austroafricanum* possono essere distinti dalle altre specie di *Phaeoacremonium* per il colore rossastro della colonia su OA. *P. angustius* cresce più velocemente (18-20 mm di diametro dopo 8 giorni al buio su agar-estratto di malto) di *P. austroafricanum* (10-16 mm nelle stesse condizioni). Le fialidi di tipo I sono prevalenti in *P. angustius* mentre quelle di tipo III prevalgono in *P. austroafricanum*. I conidi di *P. angustius*, prodotti su e nell'agar, sono più stretti di quelli prodotti da *P. austroafricanum*.

#### Substrati semiselettivi

Rosa Bengala Cloramfenicolo Agar (Rooney *et al.*, 2001) (☞ *Appendice I*, 1).

#### Protocolli per la diagnosi molecolare

- Primer specie-specifici disegnati sui geni codificanti la  $\beta$ -tubulina e l'actina (Mostert *et al.*, 2006b) (☞ *Appendice II*, 1)  
*Primer:* senso T1 (O'Donnell e Cigelnik, 1997); antisenso Pbr4\_1 (Mostert *et al.*, 2006b)  
*Dimensioni del prodotto di amplificazione:* 556 bp.
- Primer genere-specifici disegnati sulle regioni ITS1 e ITS2 (Aroca e Raposo, 2007) (☞ *Appendice II*, 2)  
*Primer:* senso Pm1; antisenso Pm2 (Aroca e Raposo, 2007)  
*Dimensioni del prodotto di amplificazione:* 415 bp.
- Nested-PCR (Aroca e Raposo, 2007) (☞ *Appendice II*, 3)  
Prima amplificazione – *Primer:* senso ITS1F; antisenso ITS4 (White *et al.*, 1990)  
Seconda amplificazione – *Primer:* senso Pm1; antisenso Pm2 (Aroca e Raposo, 2007)  
*Dimensioni del prodotto di amplificazione:* 415 bp.
- Real-time PCR SYBR<sup>®</sup>Green con coppie di primer genere-specifici disegnati sulla regione ITS (Overton *et al.*, 2004) (☞ *Appendice II*, 4)  
*Primer:* senso Pac1f; antisenso Pac2r (Overton *et al.*, 2004)  
*Dimensioni del prodotto di amplificazione:* 428 bp.
- Altri protocolli non dettagliati: PCR-RFLP (Tegli *et al.*, 2000; Dupont *et al.*, 2002; Aroca e Raposo, 2007).

### ■ *Phaeoacremonium australiense* L. Mostert, Summerb. & Crous

Specie rinvenuta su *Vitis vinifera* in Australia (Gramaje *et al.*, 2007).

#### Inquadramento tassonomico (Kirk *et al.*, 2008)

Regno:	Fungi
Phylum:	Ascomycota
Classe:	Sordariomycetes
Sottoclasse:	Sordariomycetidae
Ordine:	Diaporthales
Famiglia:	Togniniaceae
Genere:	<i>Phaeoacremonium</i>
Specie:	<i>Phaeoacremonium australiense</i> L. Mostert, Summerb & Crous

#### Caratteristiche morfologiche e colturali della forma anamorfa (Mostert *et al.*, 2005, 2006)

**Colonie:** 18-20 mm di diametro in 8 giorni a 25°C (temperatura ottimale 30°C, minima 15°C, massima 35-37°C); su MEA generalmente di consistenza feltrosa con margini interi; dopo 8 giorni di colore bianco scuro nella porzione centrale e bianco-arancio alla periferia, sul fondo sono da grigio-arancio ad arancio verso il margine; dopo 16 giorni da grigio-arancio a bruno-giallo superiormente, sul fondo da arancio scuro ad arancione chiaro o bruno-giallastro; produzione di pigmenti gialli su OA.

*Micelio*: ife ramificate e settate, singole o in fasci sino a 6, tubercolate con tubercoli fino a 1 µm di diametro, verrucose, da bruno pallido a ialine, larghe 1,5-3 µm.

*Conidiofori*: generalmente corti e semplici, spesso ristretti in prossimità dei setti (fino a 4), talvolta portanti 2 fialidi laterali vicino a quella terminale, lunghi (14)17-50(64) (media 26) µm e larghi 1,5-2,5 (media 2) µm.

*Fialidi*: terminali o laterali, generalmente monofialidi, rade, da tubercolate a verrucose, raramente lisce, da subialine a ialine con collaretti lisce, lunghi 2-2,5 µm e larghi 1,5-2,5 µm; le fialidi di tipo I sono cilindriche, occasionalmente più ampie alla base e filiformi all'apice 3-8 × 1-1,5(2) (media 5 × 1,5) µm; quelle di tipo II possono essere sia allungate-ampolliformi, più ampie alla base, o navicolari, affusolate all'apice, (8)8,5-14 × 1,5-2 (2,5) (media 11 × 2) µm; le fialidi di tipo III sono subcilindriche o navicolari, (12)13,5-20(22) × 1,5-2(2,5) (media 17 × 2) µm, gradualmente assottigliate a terminare con un lungo e stretto collo. Tutti e tre i tipi di fialidi sono presenti in egual misura.

*Conidi*: da oblunghi-ellissoidali a ovoidali, occasionalmente cilindrici o reniformi (2,5)3-4 × 1-2 (media 3 × 1,5) µm.

#### Principali caratteri distintivi da specie simili

È ben evidente un'area centrale bruna con un ampio alone arancione chiaro fuori dal margine della colonia che si sviluppa dopo 16 giorni su PDA. Le altre specie simili, *P. inflatipes* e *P. parasiticum*, formano conidiofori lunghi o frequentemente ramificati, chiaramente distinguibili da quelli corti e non ramificati di *P. australiense*. *P. australiense* ha micelio verrucato, distinto da quello delle altre tre specie pigmentate di bruno, quali *P. krajdenui*, *P. sphinctrophorum* e *P. tardicrescens*. *P. australiense* è facilmente distinta da *P. aleophilum* per la sua attitudine a rilasciare pigmenti gialli in PDA. La presenza di tutte le tre le tipologie di fialidi in uguale misura poi rende facile il riconoscimento di tale specie da *P. iranianum* in cui prevalgono solo le fialidi di tipo III.

#### Substrati semiselettivi

Rosa Bengala Cloramfenicolo Agar (Rooney *et al.*, 2001) (☞ *Appendice I*, 1).

#### Protocolli per la diagnosi molecolare

- Primer specie-specifici disegnati sui geni codificanti la β-tubulina e l'actina (Mostert *et al.*, 2006b) (☞ *Appendice II*, 1)  
*Primer*: senso T1 (O'Donnell e Cigelnik, 1997); antisenso Pbr1\_1 (Mostert *et al.*, 2006b)  
*Dimensioni del prodotto di amplificazione*: 583 bp.

#### ■ *Phaeoacremonium inflatipes* W. Gams, Crous & M.J. Wingf.

Specie rinvenuta su *Nectandra* sp., *Quercus virginiana* e *Vitis vinifera* in Costa Rica e Stati Uniti e su olivo in Italia (Dupont *et al.*, 2002; Auger *et al.*, 2005; Eskalen *et al.*, 2005a, 2005b; Mostert *et al.*, 2005; Carlucci *et al.*, 2008a; 2008b).

#### Inquadramento tassonomico (Kirk *et al.*, 2008)

Regno:	Fungi
Phylum:	Ascomycota
Classe:	Sordariomycetes
Sottoclasse:	Sordariomycetidae
Ordine:	Diaporthales
Famiglia:	Togniniaceae
Genere:	<i>Phaeoacremonium</i>
Specie:	<i>Phaeoacremonium inflatipes</i> W. Gams, Crous & M.J. Wingf.

#### Caratteristiche morfologiche e culturali della forma anamorfa

##### (Crous *et al.*, 1996; Mostert *et al.*, 2006b)

*Colonie*: 25-26 mm di diametro in 8 giorni a 25°C (temperatura ottimale 25-30°C, minima 10°C, massima 35°C); su MEA, generalmente di consistenza feltrosa o polverulenta, margini interi; dopo 8 giorni da marrone a grigio-arancione e sul margine grigio-giallo, sul fondo marrone scuro; dopo 16 giorni grigio-arancione o grigio bruno nella parte superiore mentre sul fondo da grigio-giallo a olivacea.

*Micelio*: ife ramificate e settate che corrono singolarmente o in fasci sino a 10, alcune sono scarsamente tubercolate, tubercoli fino a 0,5 µm di diametro, verrucose, da bruno pallido a ialine, larghe 1,5-3 µm.

*Conidiofori*: generalmente ramificati nella regione basale, da bruno chiaro a ialini, frequentemente con una base liscia, fino a 5 setti, spesso portano vicino all'apice 2 fialidi laterali, sono lunghi (14)18-40(43) (media 28) µm e larghi 1,5-2 (media 2) µm.

*Fialidi*: terminali o laterali, generalmente monofialidi, rade e leggermente tubercolate sino a divenire verrucose, occasionalmente lisce e bruno-chiare, generalmente ialine; collaretti lunghi 1,5-3 µm e larghi 1-1,5 µm; fialidi di tipo I cilindriche e filiformi all'apice (2)3-13(16) × 1-1,5(2) (media 7 × 1) µm; fialidi di tipo II allungate e ampolliformi, più ampie alla base o navicolari, affusolate all'apice, (7,5)10-15 × 1,5-2 (media 13 × 2) µm; fialidi di tipo III, le più frequenti, da subcilindriche a navicolari, (10)12-25(28) × 1,5-2(2,5) (media 18 × 2) µm, gradualmente assottigliate all'apice.

*Conidi*: generalmente oblunghi-ellissoidali o ovoidali, occasionalmente reniformi o allantoidi 3-4(5) × 1-2 (media 4 × 1,5) µm.

#### Principali caratteri distintivi da specie simili

*P. inflatipes* può essere identificato per i conidiofori ramificati e per il marrone della colonia.

#### Substrati semiselettivi

Rosa Bengala Cloramfenicolo Agar (Rooney *et al.*, 2001) (☞ *Appendice I*, 1).

**Protocolli per la diagnosi molecolare**

- Primer specie-specifici disegnati sui geni codificanti la  $\beta$ -tubulina e l'actina (Mostert *et al.*, 2006b) (☞ *Appendice II*, 1)  
*Primer*: senso T1 (O'Donnell e Cigelnik, 1997); antisenso Pbr7\_2 (Mostert *et al.*, 2006b)  
*Dimensioni del prodotto di amplificazione*: 262 bp.
- Primer genere-specifici disegnati sulle regioni ITS1 e ITS2 (Aroca e Raposo, 2007) (☞ *Appendice II*, 2)  
*Primer*: senso Pm1; antisenso Pm2 (Aroca e Raposo, 2007)  
*Dimensioni del prodotto di amplificazione*: 415 bp.
- Nested-PCR (Aroca e Raposo, 2007) (☞ *Appendice II*, 3)  
Prima amplificazione – *Primer*: senso ITS1F; antisenso ITS4 (White *et al.*, 1990)  
Seconda amplificazione – *Primer*: senso Pm1; antisenso Pm2 (Aroca e Raposo, 2007)  
*Dimensioni del prodotto di amplificazione*: 415 bp.
- Altri protocolli non dettagliati: PCR-RFLP (Tegli *et al.*, 2000; Dupont *et al.*, 2002; Aroca e Raposo, 2007).

**■ *Phaeoacremonium iranianum* L. Mostert, Gräfenhan, W. Gams & Crous**

Specie rinvenuta su *Actinidia chinensis*, *Vitis sylvestris* e *Vitis vinifera* in Iran e Italia (Mostert *et al.*, 2005).

**Inquadramento tassonomico (Kirk *et al.*, 2008)**

Regno:	Fungi
Phylum:	Ascomycota
Classe:	Sordariomycetes
Sottoclasse:	Sordariomycetidae
Ordine:	Diaporthales
Famiglia:	Togniniaceae
Genere:	<i>Phaeoacremonium</i>
Specie:	<i>Phaeoacremonium iranianum</i> L. Mostert, Gräfenhan, W. Gams & Crous

**Caratteristiche morfologiche e colturali della forma anamorfa (Mostert *et al.*, 2006b)**

*Colonie*: 5-9 mm di diametro in 8 giorni a 25°C (temperatura ottimale 30°C, minima 15°C, massima 37°C); su MEA colonie piatte da feltrose a cotonose, margini interi; dopo 8 giorni colore da arancio scuro ad arancione chiaro sul margine, mentre sul fondo assumono colore arancione scuro; dopo 16 giorni diventano da grigio bruno a grigio-arancione o colore oliva scuro nella parte superiore, mentre sul fondo presentano colorazione grigio scuro o olivacea.

*Micelio*: ife ramificate e settate che corrono singolarmente o in fasci sino a 27, tubercolate con tubercoli fino a 1  $\mu$ m di diametro, verrucosi, da bruno-pallido a ialine, larghe 1,5-2,5  $\mu$ m.

*Conidiofori*: generalmente corti e non ramificati emergenti da ife aeree o subemergenti, eretti, semplici, con sino a 3 setti, spesso terminanti con una fialide che porta 1-2 fialidi

lateralmente, marrone chiaro più chiari all'apice, da lisci a verrucosi, lunghi (17)20-50 (media 30)  $\mu$ m e larghi 1-2 (media 2)  $\mu$ m.

*Fialidi*: terminali o laterali, soprattutto di tipo III; le fialidi di tipo I sono cilindriche, occasionalmente allargate alla base (2)3-12(13)  $\times$  1-1,5 (media 6  $\times$  1,5)  $\mu$ m; le fialidi di tipo II sono subcilindriche, alcune allungate-ampolliformi, più ampie alla base e affusolate all'apice, 8-11  $\times$  1,5-2 (media 10  $\times$  2)  $\mu$ m; le fialidi di tipo III sono invece subcilindriche, talvolta navicolari, (13)14-22(26)  $\times$  1-2 (media 18  $\times$  2)  $\mu$ m, gradualmente assottigliate all'apice sino a terminare con un lungo collo.

*Conidi*: oblungo-ellissoidali 3-4(5)  $\times$  (1)1,5(2) (media 4  $\times$  1,5)  $\mu$ m.

**Principali caratteri distintivi da specie simili**

*Phaeoacremonium iranianum* è filogeneticamente e morfologicamente vicina a *P. aleophilum*. Può essere distinta da questa specie per la maggiore abbondanza di fialidi di tipo III e per la forma subcilindrica delle fialidi di tipo II.

**Substrati semiselettivi**

Rosa Bengala Cloramfenicolo Agar (Rooney *et al.*, 2001) (☞ *Appendice I*, 1).

**Protocolli per la diagnosi molecolare**

- Primer specie-specifici disegnati sui geni codificanti la  $\beta$ -tubulina e l'actina (Mostert *et al.*, 2006b) (☞ *Appendice II*, 1)  
*Primer*: senso T1 (O'Donnell e Cigelnik, 1997); antisenso Pbr12 (Mostert *et al.*, 2006b)  
*Dimensioni del prodotto di amplificazione*: 545 bp.

**■ *Phaeoacremonium scolyti* L. Mostert, Summerb. & Crous**

Specie rinvenuta su *Vitis vinifera* e *Quercus robur* in Francia, Repubblica Ceca e Sud Africa (Mostert *et al.*, 2005).

**Inquadramento tassonomico (Kirk *et al.*, 2008)**

Regno:	Fungi
Phylum:	Ascomycota
Classe:	Sordariomycetes
Sottoclasse:	Sordariomycetidae
Ordine:	Diaporthales
Famiglia:	Togniniaceae
Genere:	<i>Phaeoacremonium</i>
Specie:	<i>Phaeoacremonium scolyti</i> L. Mostert, Summerb. & Crous

**Caratteristiche morfologiche e colturali della forma anamorfa (Mostert *et al.*, 2005; 2006b)**

*Colonie*: 21-24 mm di diametro in 8 giorni a 25°C (temperatura ottimale 25-30°C, minima 10°C, massima 37°C); su MEA, consistenza feltrosa, margini interi; dopo 8 giorni di

rosata a ialina traslucida nella parte superiore, sul fondo assume colorazione grigio-rosastra; dopo 16 giorni grigio-rosata superiormente e rosa sul fondo.

**Micelio:** ife ramificate e settate che corrono singolarmente o in fasci fino a 7, tubercolate, tubercoli fino a 1 µm di diametro, occasionalmente verrucose, da bruno a bruno-pallido, larghe 1-2 µm.

**Conidiofori:** generalmente corti e solitamente non ramificati, da subcilindrici a navicolari, con sino a 3 setti, spesso terminanti con una fialide che porta 1-2 fialidi laterali, lunghi (15)17-35(39) (media 26) µm e larghi 1,5-2,5 (media 2) µm.

**Fialidi:** terminali o laterali, occasionalmente polifialidi, raramente lisce, da bruno chiaro a ialine con collaretti lunghi 1,5-2 µm e larghi 1-1,5 µm; le fialidi di tipo I sono cilindriche, occasionalmente allargate alla base (2)3-7 × 1-1,5 (media 5 × 1) µm; le fialidi di tipo II, predominanti, sono allungate-ampolliformi o navicolari, più ampie o ristrette alla base, affusolate all'apice, 7-14 × 1,5-2(2,5) (media 10 × 2) µm; le fialidi di tipo III sono subcilindriche, allungate-ampolliformi, (10)14-20 × 1,5-2(2,5) (media 16 × 2) µm, gradualmente assottigliate all'apice.

**Conidi:** oblungo-ellissoidali o ovoidali, occasionalmente reniformi o allantoidi 2,5-4(4,5) × 1-2 (media 3 × 1,5) µm.

#### Principali caratteri distintivi da specie simili

*Phaeocremonium scolyti* può essere facilmente riconosciuta per la colorazione da rosa a traslucida delle colonie su MEA e per la forma allungata e ampolliforme delle fialidi di tipo II che sono spesso marcatamente ristrette alla base.

#### Substrati semiselettivi

Rosa Bengala Cloramfenicolo Agar (Rooney *et al.*, 2001) (☞ *Appendice I*, 1).

#### Protocolli per la diagnosi molecolare

- Primer specie-specifici disegnati sui geni codificanti la β-tubulina e l'actina (Mostert *et al.*, 2006b) (☞ *Appendice II*, 1)  
*Primer:* senso T1 (O'Donnell e Cigelnik, 1997); antisenso Pbr3\_2 (Mostert *et al.*, 2006b)  
*Dimensioni del prodotto di amplificazione:* 455 bp.
- Primer genere-specifici disegnati sulle regioni ITS1 e ITS2 (Aroca e Raposo, 2007) (☞ *Appendice II*, 2)  
*Primer:* senso Pm1; antisenso Pm2 (Aroca e Raposo, 2007)  
*Dimensioni del prodotto di amplificazione:* 415 bp.
- Nested-PCR (Aroca e Raposo, 2007) (☞ *Appendice II*, 3)  
Prima amplificazione – *Primer:* senso ITS1F; antisenso ITS4 (White *et al.*, 1990)  
Seconda amplificazione – *Primer:* senso Pm1; antisenso Pm2 (Aroca e Raposo, 2007)  
*Dimensioni del prodotto di amplificazione:* 415 bp.
- Altri protocolli non dettagliati: PCR-RFLP (Aroca e Raposo, 2007).

### ■ *Phaeocremonium subulatum* L. Mostert, Summerb. & Crous

Specie rinvenuta su vite in Sud Africa (Mostert *et al.*, 2005).

#### Inquadramento tassonomico (Kirk *et al.*, 2008)

Regno:	Fungi
Phylum:	Ascomycota
Classe:	Sordariomycetes
Sottoclasse:	Sordariomycetidae
Ordine:	Diaporthales
Famiglia:	Togniniaceae
Genere:	<i>Phaeocremonium</i>
Specie:	<i>Phaeocremonium subulatum</i> L. Mostert, Summerb. & Crous

#### Caratteristiche morfologiche e culturali della forma anamorfa (Mostert *et al.*, 2005; 2006b)

**Colonie:** 17-23 mm di diametro in 8 giorni a 25°C (temperatura ottimale 25-30°C, minima 15°C, massima 37°C); su MEA, consistenza feltrosa, margini interi; dopo 8 giorni da colore giallo pallido a traslucido sia superiormente che sul fondo; dopo 16 giorni da bruno chiaro a bianco-arancione superiormente, mentre sul fondo presenta in corrispondenza del margine colorazione da bruna ad arancione chiaro.

**Micelio:** ife ramificate e settate che corrono singolarmente o in fasci sino a 10, tubercolate con tubercoli fino a 0,8 µm di diametro, verrucosi, da arancione a bruno pallido, larghi 1,5-2,5 µm.

**Conidiofori:** generalmente corti e usualmente non ramificati, 1-7 settati, spesso portanti una fialide addizionale prossima a quella terminale, lunghi (17)18-32(45) (media 25) µm e larghi 1,5-2,5 (media 2) µm.

**Fialidi:** terminali o laterali, occasionalmente polifialidi, con tubercoli sparsi sino a verrucose, raramente lisce, da subialine a ialine; collaretti lunghi 1 µm e larghi 1-1,5 µm; tutti e tre i tipi di fialidi sono egualmente presenti; fialidi di tipo I cilindriche, occasionalmente allargate alla base e affusolate all'apice 3-9 × 1-1,5 (media 6 × 1) µm; fialidi di tipo II da subcilindriche a subulate occasionalmente allungate e ampolliformi, più ampie alla base e affusolate all'apice, (7)9-13 × 1,5-2 (media 11 × 2) µm; fialidi di tipo III da subcilindriche a subulate (12)12,5-20(21) × 1,5-2 (media 16 × 2) µm, gradualmente assottigliate all'apice sino a terminare con un lungo collo.

**Conidi:** oblungo-ellissoidali, cilindrici, occasionalmente reniformi 3-5 × 1-1,5(2) (media 4 × 1) µm.

#### Principali caratteri distintivi da specie simili

*Phaeocremonium subulatum* può essere identificato facilmente per la presenza di un pigmento giallo su MEA, OA e PDA e per le fialidi di tipo II e III da subcilindriche a subulate.

#### Substrati semiselettivi

Rosa Bengala Cloramfenicolo Agar (Rooney *et al.*, 2001) (☞ *Appendice I*, 1).

**Protocolli per la diagnosi molecolare**

- Primer specie-specifici disegnati sui geni codificanti la  $\beta$ -tubulina e l'actina (Mostert *et al.*, 2006b) (☞ *Appendice II*, 1)  
*Primer*: senso T1 (O'Donnell e Cigelnik, 1997); antisenso Pbr7\_1 (Mostert *et al.*, 2006b)  
*Dimensioni del prodotto di amplificazione*: 553 bp.

**■ *Phaeoacremonium venezuelense* L. Mostert, Summerb. & Crous**

Specie isolata da vite e dall'uomo in Canada, Venezuela e Sud Africa (Mostert *et al.*, 2005).

**Inquadramento tassonomico (Kirk *et al.*, 2008)**

Regno:	Fungi
Phylum:	Ascomycota
Classe:	Sordariomycetes
Sottoclasse:	Sordariomycetidae
Ordine:	Diaporthales
Famiglia:	Togniniaceae
Genere:	<i>Phaeoacremonium</i>
Specie:	<i>Phaeoacremonium venezuelense</i> L. Mostert, Summerb. & Crous

**Caratteristiche morfologiche e colturali della forma anamorfa (Mostert *et al.*, 2005; 2006b)**

*Colonie*: 18-32 mm di diametro in 8 giorni a 25°C (temperatura ottimale 30°C, minima 15°C, massima 40°C); su MEA, da feltrosa a polverulenta, margini interi, dopo 8 giorni bianco-arancione o arancione-grigio superiormente e bianco-giallo o bruno-arancione sul fondo; dopo 16 giorni da bruno-arancione a grigio-arancione superiormente, sul fondo, da bruno grigio al verde-arancione sul margine.

*Micelio*: ife ramificate e settate, singole o in fasci sino a 6; fortemente tubercolate, tubercoli fino a 1  $\mu$ m di diametro, verrucose, da bruno-arancio a bruno chiaro, larghe 1-3  $\mu$ m.

*Conidiofori*: generalmente corti e occasionalmente ramificati, 1-4 settati, spesso portanti una fialide addizionale prossima a quella terminale, lunghi (20)28-34(52) (media 31)  $\mu$ m e larghi 1-2,5 (media 2)  $\mu$ m.

*Fialidi*: terminali o laterali, generalmente monofalidi, con tubercoli sparsi sino a verrucose occasionalmente, da bruno chiaro a subialine, collaretti lunghi 1-3  $\mu$ m e larghi 1-2  $\mu$ m, fialidi di tipo I cilindriche affusolate all'apice (4,5)5-14(16)  $\times$  1-1,5(2) (media 9  $\times$  1,5)  $\mu$ m, fialidi di tipo II generalmente da subcilindriche a navicolari, affusolate all'apice, 12-14  $\times$  1,5-2(2,5) (media 13  $\times$  2)  $\mu$ m, fialidi di tipo III, prevalenti, da navicolari a subulate (14)15-23(24)  $\times$  (1)1,5-2 (media 18  $\times$  1,5)  $\mu$ m, molto gradualmente assottigliate all'apice.

*Conidi*: oblunghe-ellissoidali o fusiformi-ellissoidali, occasionalmente reniformi-allantoidi 3-4(5)  $\times$  1-1,5(2) (media 4  $\times$  1)  $\mu$ m.

**Principali caratteri distintivi da specie simili**

*Phaeoacremonium venezuelense* e le specie simili (*P. amstelodamense* e *P. argentinense*) possono essere discriminate dalle altre specie di colore bruno chiaro perché non rilasciano alcun pigmento giallo su OA. *P. amstelodamense* presenta una tipica colorazione verde oliva della colonia su OA. I conidiofori di *P. venezuelense* sono ramificati più frequentemente di quelli di *P. argentinense*. Le fialidi di tipo II sono subcilindriche, mentre quelle di *P. argentinense* sono più spesso allungate e ampolliformi.

**Substrati semiselettivi**

Rosa Bengala Cloramfenicolo Agar (Rooney *et al.*, 2001) (☞ *Appendice I*, 1).

**Protocolli per la diagnosi molecolare**

- Primer specie-specifici disegnati sui geni codificanti la  $\beta$ -tubulina e l'actina (Mostert *et al.*, 2006b) (☞ *Appendice II*, 1)  
*Primer*: senso T1 (O'Donnell e Cigelnik, 1997); antisenso Pbr3\_1 (Mostert *et al.*, 2006b)  
*Dimensioni del prodotto di amplificazione*: 568 bp.
- Primer genere-specifici disegnati sulle regioni ITS1 e ITS2 (Aroca e Raposo, 2007) (☞ *Appendice II*, 2)  
*Primer*: senso Pm1; antisenso Pm2 (Aroca e Raposo, 2007)  
*Dimensioni del prodotto di amplificazione*: 415 bp.
- Nested-PCR (Aroca e Raposo, 2007) (☞ *Appendice II*, 3)  
Prima amplificazione – *Primer*: senso ITS1F; antisenso ITS4 (White *et al.*, 1990)  
Seconda amplificazione – *Primer*: senso Pm1; antisenso Pm2 (Aroca e Raposo, 2007)  
*Dimensioni del prodotto di amplificazione*: 415 bp.
- Altri protocolli non dettagliati: PCR-RFLP (Aroca e Raposo, 2007).

## PHAEOMONIELLA

### ■ *Phaeomoniella chlamydospora* (W. Gams, Crous, M.J. Wingf. & L. Mugnai) Crous & W. Gams

(Basion. *Phaeoacremonium chlamydosporum* W. Gams, Crous, M.J. Wingf. & L. Mugnai)

Specie rinvenuta su vite in diversi paesi, come Argentina (Gatica *et al.*, 2001), Australia (Edwards e Pascoe, 2004), Francia (Borie *et al.*, 2002), Grecia (Rumbos e Rumbou, 2001), Italia (Mugnai *et al.*, 1999; Zanzotto *et al.*, 2007), Portogallo (Chiau *et al.*, 2000) e Nuova Zelanda (Ridgway *et al.*, 2002), e su olivo in Italia (Carlucci *et al.*, 2008b).

#### Inquadramento tassonomico (Kirk *et al.*, 2008)

Regno:	Fungi
Phylum:	Ascomycota
Classe:	Eurotiomycetes
Sottoclasse:	Chaetothyriomycetidae
Ordine:	Chaetothyriales
Famiglia:	Herpotrichiellaceae
Genere:	<i>Phaeomoniella</i>
Specie:	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i> (W. Gams, Crous, M.J. Wingf. & L. Mugnai) Crous & W. Gams (Basion.: <i>Phaeoacremonium chlamydosporum</i> W. Gams, Crous, M.J. Wingf. & L. Mugnai)

#### Caratteristiche morfologiche e colturali della forma anamorfa (Crous *et al.*, 1996; Crous e Gams, 2000)

**Colonie:** 10-12 mm di diametro a 25°C al buio in 8 giorni; crescita lievitiforme, su AA prodotti clamidoconidi e microsclerozi; su MEA, sul rovescio della piastra, di colore da grigio-olivaceo a olivaceo scuro, micelio aereo.

**Micelio:** ife ramificate, settate, singole o riunite in gruppi fino a 10 elementi, da tubercolate a verrucate, con pareti verde-marrone e setti più scuri, che diventano più chiare verso la regione conidiogena. Le ife sono larghe 2-4 µm. I clamidoconidi sono globosi o subglobosi, singoli, raramente riuniti in catene di 5, di tonalità olivacea, lisci o tubercolati, lunghi 7-15 µm e con diametro di 5-17 µm.

**Conidiofori:** macrofiliformi, emergenti da ife aeree o sommerse, eretti, semplici, cilindrici con una cellula apicale, da allungata ampolliforme a lageniforme, di colore verde marrone, con parete più spessa alla base e più sottile all'apice. I conidiofori sono di tonalità più chiara, verrucati o lisci, 1-3 settati, alti 12-70 µm e larghi 1,5-4,0 µm. Le cellule conidiogene sono singole, terminali, monofialidiche, di colore da verde chiaro a ialino, lisce, da allungate-ampolliformi a lageniformi o subcilindriche, lunghe 8-20 µm, larghe 1,5-4,0 µm nella parte più ingrossata, larghe 1,0-1,5 µm all'apice, con un collare terminale a forma di imbuto lungo e largo 0,5-2,0 µm.

**Conidi:** monomorfici, riuniti in mazzetti, mucilluginosi portati all'apice delle cellule conidiogene, subialini, da oblungo-ellissoidali a ovoidali, diritti, misuranti (1,5)3,0-4,0(4,5) × 1,0-1,5(2,0) µm.

**Picnidi:** prodotti su CLA (Fisher *et al.*, 1982) e su tralci infetti incubati in camera umida a 10°C ed esposti a luce ultravioletta (Crous *et al.*, 1996); simile a *Phoma* sp., a maturità vengono estrusi conidi in cirri.

**Conidiofori:** marrone chiaro, subcilindrici, lisci, con 1 o più setti, 5-18 × 2-3 µm.

**Cellule conidiogene:** monofialidiche, terminali e intercalari, di forma variabile, ma frequentemente da subcilindriche a oblungo-ellissoidali, 3-9 × 2-3 µm.

**Picnoconidi:** ialini, da oblungo-ellissoidali a ovati, lisci, misuranti (1,5) 2,0-2,5 × 1,0-1,5 µm.

#### Principali caratteri distintivi da specie simili

*Phaeomoniella chlamydospora* può essere discriminata dalle altre specie di *Phaeomoniella*: da *P. zymoides* per il colore delle clamidospore (più scuro in *P. chlamydospora*) e per la forma delle fialidi che in *P. zymoides* sono a base più ampia. *P. pinifoliorum* non forma micelio aereo nella porzione più vecchia della colonia e presenta conidi che divengono a maturità allungati e talvolta allantoidi (Lee *et al.*, 2006).

#### Substrati semiselettivi

- Agar Rosa Bengala Cloramfenicolo (Rooney *et al.*, 2001) (☞ Appendice I, 1).
- Agar Estratto di Malto Streptomicina (Giménez-Jaime *et al.*, 2006) (☞ Appendice I, 2).
- Agar Patate Destrosio, Rosa Bengala (0,15 g/l), Streptomicina (1 g/l) (Gaforio e Tello, 2007).
- Agar Patate Destrosio, Folpet (10 ppm), Streptomicina (1 g/l) (Gaforio e Tello, 2007).
- Agar Estratto di Malto, Rosa Bengala, Acido Gallico, Streptomicina (Mugnai, dati non pubblicati).

#### Protocolli per la diagnosi molecolare

- Primer specie-specifici disegnati sulla regione ITS (Tegli *et al.*, 2000)  
*Primer:* senso Pch1; antisenso Pch2 (Tegli *et al.*, 2000)  
*Dimensioni del prodotto di amplificazione:* 360 bp.
- Nested-PCR impiegando coppie di primer specie-specifici disegnati su marcatori RAPD (Pollastro *et al.*, 2001) (☞ Appendice II, 6)  
Prima amplificazione – *Primer:* senso OPA-1<sub>291</sub>for; antisenso OPA-1<sub>291</sub>rev  
Seconda amplificazione – *Primer:* senso OPA-13<sub>844</sub>for; antisenso OPA-13<sub>844</sub>rev  
*Dimensioni del prodotto di amplificazione:* 191 bp.
- Nested-PCR (Whiteman *et al.*, 2002) (☞ Appendice II, 7)  
Prima amplificazione – *Primer:* senso NS-1; antisenso ITS-4 (White *et al.*, 1990)  
Seconda amplificazione – *Primer:* senso Pch1; antisenso Pch2 (Tegli *et al.*, 2000)  
*Dimensioni del prodotto di amplificazione:* 360 bp.
- Real-time PCR SYBR®Green con coppie di primer genere-specifici disegnati sulla regione ITS (Overton *et al.*, 2004) (☞ Appendice II, 4)  
*Primer:* senso Pmo1f; antisenso Pmo2r (Overton *et al.*, 2004)  
*Dimensioni del prodotto di amplificazione:* 320 bp.
- Altri protocolli non dettagliati: PCR-RFLP (Tegli *et al.*, 2007); PCR con primer specie-specifici (Groenewald *et al.*, 2000; Ridgway *et al.*, 2002; Damm e Fourie, 2005; Retief *et al.*, 2006).



**Metaboliti per la diagnosi biochimica**

- Pullulani (Sparapano *et al.*, 1998; Bruno e Sparapano, 2007)  
*Substrato*: 4 liquidi nutritivi a base di soluzione di Czapeck diversi per fonti di azoto e di carbonio, per 21 giorni  
*Solvente di estrazione*: etanolo assoluto  
*Metodo di separazione*: analisi cromatografica.
- *p*-idrossibenzaldeide e scitalone (Tabacchi *et al.*, 2000)  
*Substrato*: Eriksson e Petersson, 1975  
*Condizioni di allevamento*: a 25°C per 28 giorni  
*Filtro*: celite  
*Solvente di estrazione*: etil-acetato  
*Purificazione*: colonna per cromatografia (silica gel; gradiente esano/EtOAc)  
*Ulteriore purificazione*: HPLC, colonna RP-C-18 (gradiente MeOH-H<sub>2</sub>O).
- Scitalone e isosclerone (Bruno *et al.*, 2007)  
*Substrato*: 150 ml Czapek modificato contenente 0,1% lievito e 0,1% estratto di malto (pH 5,8)  
*Condizioni di allevamento*: 25°C per 28 giorni  
*Filtri*: Miracloth (Calbiochem, La Jolla, CA-USA) e filtri Millipore (Millipore, Bedford, MA-USA, 0,45 mm)  
*Solvente di estrazione*: etil-acetato  
*Purificazione*: cromatografia su colonne di gel di silice  
*Eluzione*: cloroformio:isopropanolo (9:1)  
*Analisi*: TLC in cloroformio:isopropanolo (9:1).
- Composti fenolici: acido gallico, acido protocatecuico, 2,5-diidrossibenzaldeide, acido siringico, siringaldeide, acido *p*-cumarico, rutina, *trans*-resveratrolo, miricetina, quercetina-3-ramnoside, quercetina, apigenina e caempferolo (Bruno e Sparapano, 2006a)  
*Substrato*: colture duali calli di vite- fungo o filtrati colturali ottenuti allevando il fungo su MEA per 28 giorni a 25°C  
*Solvente di estrazione*: dietilere; etil-acetato  
*Metodo di separazione*: analisi cromatografica in HPLC.

**BOTRYOSPHAERIACEAE**

La famiglia delle Botryosphaeriaceae comprende numerose specie fungine polifaghe a volte scarsamente specializzate nei processi patogenetici, sebbene abbondantemente e frequentemente isolate da numerose specie vegetali arboree, erbacee e arbustive, tra cui vite e olivo (von Arx e Müller, 1954; Frisullo *et al.*, 2000; Lazzizzera *et al.*, 2008a; 2008b).

Dal punto di vista tassonomico il genere *Botryosphaeria*, introdotto nel 1863 da Cesari e De Notaris, e successivamente rivisto da Saccardo (1877), è stato abbondantemente studiato e sottoposto a continue revisioni. Infatti, Denman *et al.* (2000) attraverso uno studio dei caratteri morfologici condotti su 18 generi anamorfici, associa al genere teleomorfo *Botryo-*

*sphaeria* solo due generi: *Fusicoccum* e *Diplodia*. Crous *et al.*, (2006), mediante l'analisi della sequenza parziale dell'rDNA 28S (gene LSU), riferiscono al genere *Botryosphaeria* solo le specie *B. corticis* (Demaree & Wilcox) von Arx & Müll. e *B. dothidea* (Moug.: Fr.) Ces. & De Not., mentre, per i restanti generi anamorfici, gli autori ritengono opportuno usare il nome dello stato agamico anche nel caso fosse conosciuto il relativo stato gamico. In seguito all'analisi multigenica (SSU, ITS, LSU, EF1- $\alpha$  e  $\beta$ -tubulina), Phillips *et al.* (2008) forniscono un'ulteriore conferma definendo e puntualizzando lo status filogenetico e tassonomico dei generi teleomorfici delle Botryosphaeriaceae che producono spore scure.

All'interno di questa famiglia tutte le specie nuove o recentemente riclassificate vengono indicate, sia per la forma teleomorfa che anamorfa, con il nome che fino a pochi anni fa veniva usato solo per la forma anamorfa (ad esempio, *Lasiodiplodia theobromae* comprende adesso sia la forma teleomorfa che veniva denominata "*Botryosphaeria*" *rodhina* che la forma anamorfa *L. theobromae*).

Di seguito saranno descritte le caratteristiche della forma anamorfa (quella che si trova più frequentemente in natura e in coltura artificiale) delle specie isolate da vite appartenenti alla famiglia delle Botryosphaeriaceae riportate in questo lavoro, secondo le indicazioni tassonomiche sulla nomenclatura proposte da Crous *et al.* (2006) e Phillips *et al.* (2008). Sulla base di queste indicazioni in *tab. 1* viene riassunta la corretta denominazione delle varie specie isolate da vite attualmente in uso e la denominazione con cui la forma teleomorfa di ciascuna specie corrispondente veniva (e talvolta erroneamente è ancora) citata in letteratura prima di tali indicazioni.

Le specie di Botryosphaeriaceae vengono ora indicate, sia nella forma anamorfa che teleomorfa, unicamente con quello che era il nome della forma anamorfa, con l'eccezione, fra le specie isolate da vite, di *B. dothidea*.

Tab. 1 - Attuale denominazione di specie di Botryosphaeriaceae isolate da vite		
Denominazione corretta*	Nomi usati fino al 2006	
	Teleomorfa	Anamorfa
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	<i>Fusicoccum aesculi</i>
<i>Diplodia corticola</i>	<i>Botryosphaeria corticola</i>	<i>Diplodia corticola</i>
<i>Diplodia mutila</i>	<i>Botryosphaeria stevensii</i>	<i>Diplodia mutila</i>
<i>Diplodia seriata</i>	<i>Botryosphaeria obtusa</i>	—
<i>Dothiorella iberica</i>	<i>Botryosphaeria iberica</i>	<i>Dothiorella iberica</i>
<i>Dothiorella sarmentorum</i>	<i>Botryosphaeria sarmentorum</i>	<i>Diplodia sarmentorum</i>
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	<i>Botryosphaeria rhodina</i>	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
<i>Neofusicoccum luteum</i>	<i>Botryosphaeria lutea</i>	<i>Fusicoccum luteum</i>
<i>Neofusicoccum parvum</i>	<i>Botryosphaeria parva</i>	<i>Fusicoccum parvum</i>
<i>Spencermartinsia viticola</i> **		<i>Botryosphaeria viticola</i>

\* Denominazione corretta, in uso al 2010 (secondo Crous *et al.*, 2006; Phillips *et al.*, 2008).

\*\* Specie descritta in Phillips *et al.*, nel 2008.

### ■ *Botryosphaeria dothidea* (Moug.: Fr.) Ces. & De Not.

(anam. *Fusicoccum aesculi* Corda)

Il fungo è considerato uno dei più importanti patogeni dell'*Eucalyptus* e *P. persica*, causando mortalità di giovani piante al momento del trapianto, deperimenti del legno e cancri in queste e altre specie di alberi da frutto (Smith *et al.*, 1994; Caponero *et al.*, 2001), nonché patogeno della vite in Italia (Frisullo *et al.*, dati non pubblicati), Portogallo, California (USA) e Australia (Phillips, 2002; Úrbez-Torres *et al.*, 2006; Qiu *et al.*, 2008). È stato inoltre annoverato tra i funghi responsabili del marciume delle drupe di olivo nei paesi del Mediterraneo (Phillips *et al.*, 2005; Lazzizzera *et al.*, 2008a).

#### Inquadramento tassonomico (Kirk *et al.*, 2008)

Regno:	Fungi
Phylum:	Ascomycota
Classe:	Dothideomycetes
Sottoclasse:	<i>Incertae sedis</i>
Ordine:	Botryosphaerales
Famiglia:	Botryosphaeriaceae
Genere:	<i>Botryosphaeria</i>
Specie:	<i>Botryosphaeria dothidea</i> (Moug.: Fr.) Ces. & De Not. (anam. <i>Fusicoccum aesculi</i> Corda)

#### Caratteristiche morfologiche e culturali della forma anamorfa (Phillips, 2002)

**Colonie:** su PDA 8,5 cm di diametro in 6 giorni a 22°C, inizialmente bianche con abbondante micelio aereo, gradualmente virano dal grigio al grigio scuro; sul retro dapprima bianco, quindi nei successivi 2-3 giorni da verde scuro a verde oliva partendo dalla parte centrale fino a diventare nera.

**Picnidi:** su AA con aghi di pino, appaiono globosi, maggiormente solitari e coperti da micelio. Su OA la produzione di conidi si ottiene dopo 8-25 giorni. Generalmente isolati, possono occasionalmente essere aggregati, esternamente neri, le pareti mostrano una spessa *textura angularis* che diventa progressivamente chiara e più sottile spostandosi verso gli strati interni.

**Conidiofori:** rivestono internamente il corpo fruttifero; si presentano ialini, lisci, ramificati alla base, 0-1 settati e misurano 14-24 × 2-3 μm.

**Cellule conidiogene:** inizialmente oloblastiche, diventano enteroblastiche proliferanti con conseguenti formazioni di ispessimenti periclinali.

**Conidi:** di forma allungata (18)21-28,5(30) × (3,5)4-4,5(6) μm, media e deviazione standard di 50 conidi = 24,7±1,9, 4,4±0,4 μm; rapporto lunghezza/larghezza 3,8-6,3, media e deviazione standard di 5,3±0,6. Ialini a pareti sottili, e lisce, da fusiformi a fusiformi-ellittici, apice subobtusato, base troncata; dimensioni massime, minime e intervallo di confidenza del 95% pari a (18)21-28,5(30) × (3,5)4-4,5(6) μm, media e deviazione standard relativi a 50 conidi di 23,5±2,1 × 5,8±0,5 μm e rapporto lunghezza/larghezza 4,1; raramente formano setti prima della germinazione.

**Microconidi:** raramente osservati.

#### Principali caratteri distintivi da specie simili

*Botryosphaeria dothidea* è spesso riportata come *Neofusicoccum ribis* (prima noto come "*Botryosphaeria*" *ribis*) ed è tuttora in corso un chiarimento sulla sinonimia o sulla reale esistenza di due specie distinte. Sembra, comunque, impossibile distinguere le due specie sulla base delle caratteristiche morfologiche dell'anamorfo (Phillips, 2002).

#### Substrati semiselettivi

- Agar Estratto di Malto Cloramfenicolo (Martin e Cobos, 2007) (☞ *Appendice I*, 5).

#### Protocolli per la diagnosi molecolare

- Protocolli non dettagliati:
  - PCR impiegando primer disegnati sulla regione ITS; la regione D1/D2, il gene EF1- $\alpha$ , il gene della  $\beta$ -tubulina, mt SSU rDNA; sequenziamento del prodotto PCR; confronto con le sequenze disponibili in banca dati GenBank (Zhou *et al.*, 2001; Alves *et al.*, 2004; Úrbez-Torres *et al.*, 2006; Phillips *et al.*, 2007).
  - PCR fingerprinting: MSP-PCR (Micro-Satellite-Primed Polymerase Chain Reaction) e rep-PCR (Repetitive-Sequence-Based Polymerase Chain Reaction), (Alves *et al.*, 2007).
  - ARDRA: Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (Alves *et al.*, 2005).

#### Metaboliti per la diagnosi biochimica

- Metaboliti idrofili con alto peso molecolare, probabilm. esopolisaccaridi (Martos *et al.*, 2008)
  - Substrato:** Czapeck-Dox con 0,5% estratto di lievito e 0,5% estratto di malto
  - Solventi di eluzione:** cloroformio/iso-propanolo (8:2 o 9:1, v/v) ed etil-acetato/n-esano (6:4, v/v)
  - Metodo di separazione:** analisi cromatografica TLC su Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, 0,25 mm, silica gel (Merck, Darmstadt, Germania).

### ■ *Diplodia corticola* A.J.L. Phillips, Alves & Luque

La specie è associata alla quercia, come "*Botryosphaeria*" *corticola* (Alves *et al.*, 2004). In Puglia è stata identificata su piante di vite (Carlucci e Frisullo, 2009).

#### Inquadramento tassonomico (Kirk *et al.*, 2008)

Regno:	Fungi
Phylum:	Ascomycota
Classe:	Dothideomycetes
Sottoclasse:	<i>Incertae sedis</i>
Ordine:	Botryosphaerales
Famiglia:	Botryosphaeriaceae
Genere:	<i>Diplodia</i>
Specie:	<i>Diplodia corticola</i> A.J.L. Phillips, Alves & Luque

**Caratteristiche morfologiche e culturali della forma anamorfa (Alves et al., 2004)**

**Conidiomi:** separati o aggregati, globosi, di colore dal marrone scuro al nero, con produzione di conidi oloblastici. Pareti consistenti di *textura angularis*, marrone scuro che diventa più chiaro e sottile avvicinandosi alla zona interna fertile. Ostioli circolari e papillati.

**Conidiofori:** ridotti a cellule conidiogene.

**Cellule conidiogene:** cilindriche, ialine, piccole, con proliferazione determinata o indeterminata con una o due distinte anellazioni.

**Conidi:** piccoli, unicellulari, cilindrici con le estremità arrotondate, alcuni con una zona centrale guttulata, liscia, inizialmente ialini con una sorta di doppia parete, poi di colore marrone chiaro con uno o due setti dalle dimensioni di  $(23,5)26-35(41) \times (10)11-17(18,5)$   $\mu\text{m}$  con media di 250 conidi =  $29,9 \pm 2,6 \leftrightarrow 13,6 \pm 1,4$   $\mu\text{m}$ . Rapporto lunghezza/larghezza =  $(1,6)2,2-2,3(3,1)$  con media e deviazione standard di  $2,2 \pm 0,3$ .

**Principali caratteri distintivi da specie simili**

Non sempre facilmente discriminata da *D. mutila* e "*Botryosphaeria*" *quercuum*. Si differenzia da *D. mutila* per avere conidi più grandi e da "*B.*" *quercuum* per la forma e la dimensione dei conidi.

**Protocolli per la diagnosi molecolare**

- Protocolli non dettagliati:
  - PCR impiegando primer disegnati sulla regione ITS; la regione D1/D2, il gene *EF1- $\alpha$* , il gene della  $\beta$ -tubulina; sequenziamento del prodotto PCR; confronto con le sequenze disponibili in banca dati GenBank (Alves et al., 2004; Phillips et al., 2007).
  - PCR fingerprinting: MSP-PCR (Micro-Satellite-Primed Polymerase Chain Reaction) e rep-PCR (Repetitive-Sequence-Based Polymerase Chain Reaction), (Alves et al., 2007).
  - ARDRA: Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (Alves et al., 2005).

**■ *Diplodia mutila* Fries in Montagne**

Frequentemente associato a deperimenti del legno di vite (Lehoczky, 1974; van Niekerk et al., 2004; Frisullo et al., dati non pubblicati), nota anche come "*Botryosphaeria*" *stevensii* Shoemaker.

**Inquadramento tassonomico (Kirk et al., 2008)**

Regno:	Fungi
Phylum:	Ascomycota
Classe:	Dothideomycetes
Sottoclasse:	<i>Incertae sedis</i>
Ordine:	Botryosphaerales
Famiglia:	Botryosphaeriaceae
Genere:	<i>Diplodia</i>
Specie:	<i>Diplodia mutila</i> Fries in Montagne

**Caratteristiche morfologiche e culturali (Alves et al., 2004)**

**Colonie:** su PDA da verde scuro a marrone con denso micelio aereo.

**Picnidi:** in OA di 1-2 mm di diametro, poche unità per piastra, cominciano a formarsi dopo 7 giorni a 23°C, mentre i conidi vengono espulsi non prima di 21 giorni, isolati o aggregati in gruppi di 5 o più unità, immersi, parzialmente erompenti quando maturi, dal marrone scuro al nero, più o meno globosi con diametro superiore ai 600  $\mu\text{m}$ . Pareti composte da tre strati: lo strato più esterno, abbastanza doppio, appare marrone scuro formato da *textura angularis*; strato intermedio composto da cellule parietali sottili marrone scuro; cellule ialine compongono un sottile strato interno.

**Conidiofori:** assenti.

**Cellule conidiogene:**  $(11)12-15 \times 4-5$   $\mu\text{m}$ , oloblastiche, cilindriche, ialine, lisce, proliferanti allo stesso livello generando ispessimenti periclinali o si accrescono formando 1 o 2 anellazioni indistinte.

**Conidi:** ialini, asettati, con pareti lisce e spesse; da oblungi a ovoidali con entrambe le estremità arrotondate,  $(23,5)25,1-25,7(27,4) \times (12,4)13,2-13,5(14,3)$   $\mu\text{m}$ , media e deviazione standard di 50 conidi =  $25,4 \pm 1,0 \times 13,4 \pm 0,5$   $\mu\text{m}$ ; rapporto lunghezza/larghezza =  $1,9 \pm 0,1$ . Raramente virano sul marrone chiaro e differenziano setti a maturità (Alves et al., 2004). I conidi restano ialini e asettati per lungo tempo, anche dopo essere stati rilasciati dai picnidi; ma spesso alcuni conidi diventano marrone e 1-settati dopo l'espulsione (Stevens, 1933; Shoemaker, 1964; Lehoczky, 1974; Sutton, 1980; Alves et al., 2004).

**Principali caratteri distintivi da specie simili**

*Diplodia mutila* si differenzia da *D. seriata* per i conidi che diventano scuri solo poco tempo dopo il distacco dal picnidio e per le cellule conidiogene con anellazioni indistinte. Delle due caratteristiche, l'anellazione è la più distintiva, tranne che nei casi in cui i conidi sono bordati di scuro e divengono settati. La specie potrebbe includere un complesso di entità specifiche.

**Substrati semiselettivi**

- Agar Estratto di Malto Cloramfenicolo (Martin e Cobos, 2007) (☞ Appendice I, 5).

**Protocolli per la diagnosi molecolare**

- PCR impiegando primer disegnati sulla regione ITS; la regione D1/D2, il gene *EF1- $\alpha$* , il gene della  $\beta$ -tubulina, mt SSU rDNA; sequenziamento del prodotto PCR; confronto con le sequenze disponibili in banca dati GenBank (Zhou et al., 2001; Alves et al., 2004; Úrbez-Torres et al., 2006; Phillips et al., 2007).
- PCR fingerprinting: MSP-PCR (Micro-Satellite-Primed Polymerase Chain Reaction) e rep-PCR (Repetitive-Sequence-Based Polymerase Chain Reaction), (Alves et al., 2007).
- ARDRA: Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (Alves et al., 2005).

### ■ *Diplodia seriata* De Not.

Importante patogeno del melo, su cui causa deperimenti del legno, cancri e marciumi, per molti anni noto come "*Botryosphaeria obtusa*"; è stato isolato da almeno 34 ospiti differenti (Punithalingam e Walker, 1973), incluso olivo (Lazzizzera *et al.*, 2008) e vite in Australia (Castillo-Pando *et al.*, 2001), Italia (Cristinzio, 1978; Rovesti e Montermini, 1987), Francia (Larignon, 2001a; 2001b), Portogallo (Phillips, 1998; Phillips *et al.*, 2007) e Sud Africa (van Niekerk *et al.*, 2004; 2006). In passato spesso è stata riportata su vite come *Sphaeropsis malorum*.

#### Inquadramento tassonomico (Kirk *et al.*, 2008)

Regno:	Fungi
Phylum:	Ascomycota
Classe:	Dothideomycetes
Sottoclasse:	<i>Incertae sedis</i>
Ordine:	Botryosphaerales
Famiglia:	Botryosphaeriaceae
Genere:	<i>Diplodia</i>
Specie:	<i>Diplodia seriata</i> De Not.

#### Caratteristiche morfologiche e colturali della forma anamorfa (Phillips, 2002)

**Colonie:** su PDA 8,5 cm di diametro in 5 giorni a 22°C, grigio-marrone, denso micelio aereo, i picnidi iniziano a formarsi su OA dopo 4-5 giorni a 23°C, piccoli e numerosi, distribuiti sulla superficie del substrato. I conidi sono rinvenibili in colonie di 7-15 g.

**Picnidi:** separati o aggregati, confluenti, immersi nel tessuto dell'ospite, parzialmente emergenti a maturità, da marrone scuro a nero, 0,2-1,0 mm di diametro, ostiolati centralmente, papillati; le pareti formate da strati esterni di *textura angularis* marrone scuro, mentre internamente da strati più sottili ialini.

**Cellule conidiogene:** oloblastiche, proliferanti, 3-5,5 × 7-10(15) µm, ialine, pareti sottili e lisce, cilindriche e allargate alla base; producono singoli conidi all'apice formando una o due distinte anellazioni.

**Conidi:** (21,5)22-27(28) × (11)11,5-14,5(15,5) µm, 95% limite di confidenza = 24,3-25,4 × 12,6-13,2 µm; media e deviazione standard di 50 conidi = 24,9±1,9 × 12,9±1,1 µm; rapporto lunghezza/larghezza = 1,9±0,1. Inizialmente ialini, diventano di color marrone, con parete moderatamente spessa (0,5 µm), esternamente liscia, rugosa nella parte interna; assetati, ovoidali, più larghi nel mezzo, apice obtuso, base troncata o rotondeggiante.

#### Principali caratteri distintivi da specie simili

La specie è distinta per la formazione di conidi larghi e di colore bruno scuro e da cellule conidiogene chiaramente anellate.

#### Substrati semiselettivi

- Agar Estratto di Malto Streptomycin (Giménez-Jaime *et al.*, 2006) (☞ *Appendice I*, 2).
- Agar Estratto di Malto Cloramfenicolo (Martin e Cobos, 2007) (☞ *Appendice I*, 5).

#### Protocolli per la diagnosi molecolare

- PCR impiegando primer disegnati sulla regione ITS; la regione D1/D2, il gene EF1- $\alpha$ , il gene della  $\beta$ -tubulina, mt SSU rDNA; sequenziamento del prodotto PCR; confronto con le sequenze disponibili in banca dati GenBank (Zhou *et al.*, 2001; Alves *et al.*, 2004; Úrbez-Torres *et al.*, 2006; Phillips *et al.*, 2007).
- PCR fingerprinting: MSP-PCR (Micro-Satellite-Primed Polymerase Chain Reaction) e rep-PCR (Repetitive-Sequence-Based Polymerase Chain Reaction), (Alves *et al.*, 2007).
- ARDRA: Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (Alves *et al.*, 2005).

#### Metaboliti per la diagnosi biochimica

- Metaboliti idrofili con alto peso molecolare, probabilmente esopolisaccaridi (Martos *et al.*, 2008).
- *Fitotossine*: melleina, 4-idrossimelleina, 5-idrossimelleina, tirosol, *p*-idrossibenzaldeide (Venkatasubbaiah e Chilton, 1990).

### ■ *Dothiorella iberica* A.J.L. Phillips, Luque & Alves

Frequentemente associata a deperimenti del legno di vite (Phillips *et al.*, 2002; 2005; Frisullo *et al.*, dati non pubblicati) e olivo (von Arx e Müller, 1954), come "*Botryosphaeria iberica*" A.J.L. Phillips.

#### Inquadramento tassonomico (Kirk *et al.*, 2008)

Regno:	Fungi
Phylum:	Ascomycota
Classe:	Dothideomycetes
Sottoclasse:	<i>Incertae sedis</i>
Ordine:	Botryosphaerales
Famiglia:	Botryosphaeriaceae
Genere:	<i>Dothiorella</i>
Specie:	<i>Dothiorella iberica</i> A.J.L. Phillips, Luque & Alves

#### Caratteristiche morfologiche e colturali della forma anamorfa (Luque *et al.*, 2005)

**Colonie:** su PDA di colore verde olivaceo scuro con scarso micelio aereo. I picnidi su OA hanno meno di 1 mm di diametro, superficiali e cosparsi sull'intera colonia, iniziano a formarsi dopo 7 giorni di incubazione a 23°C.

**Picnidi:** solitari, globosi, larghi circa 450 µm, pareti di *textura angularis* spessa e scura che diventa progressivamente chiara e più sottile verso gli strati interni.

**Conidiofori:** ridotti a cellule conidiogene.

**Cellule conidiogene:** ialine, subcilindriche, rivestono l'intera cavità dei picnidi, originano conidi oloblastici.

**Conidi:** dalle dimensioni di (17,2)23,0-23,4(28,6) × (8,1)10,8-11,0(16,0) µm, con media e deviazione standard di 400 conidi di 23,2±1,9 × 10,9±1,2 µm, rapporto lunghezza/lar-

ghezza = 2,2, con pareti scure, unisetati, lievemente costretti nella zona del setto, ovoidi con l'apice arrotondato e la base tronca.

*Spermazi*: assenti.

#### Principali caratteri distintivi da specie simili

Simile a *D. sarmentorum*, può essere distinta per le caratteristiche di aschi, ascospore e conidi. *D. iberica* presenta aschi più corti e più clavati, ascospore affusolate verso la base e, in media, conidi leggermente più lunghi.

#### Substrati semiselettivi

Agar Estratto di Malto Cloramfenicolo (Martin e Cobos, 2007) (☞ *Appendice I*, 5).

#### Protocolli per la diagnosi molecolare

- Protocolli non dettagliati:
  - PCR impiegando primer disegnati sulla regione ITS; la regione D1/D2, il gene EF1- $\alpha$ , il gene della  $\beta$ -tubulina; sequenziamento del prodotto PCR; confronto con le sequenze disponibili in banca dati GenBank (Úrbez-Torres *et al.*, 2006; Phillips *et al.*, 2005, 2007).
  - PCR fingerprinting: MSP-PCR (Micro-Satellite-Primed Polymerase Chain Reaction) e rep-PCR (Repetitive-Sequence-Based Polymerase Chain Reaction) (Alves *et al.*, 2007).

#### Metaboliti per la diagnosi biochimica

Metaboliti idrofili con alto peso molecolare, probabilmente esopolisaccaridi (Martos *et al.*, 2008).

### ■ *Dothiorella sarmentorum* (Fr.) A.J.L. Phillips, Alves & Luque

Molto diffusa in Europa dove è rinvenuta nel suo stato anamorfo su un ampio numero di ospiti legnosi (von Arx e Müller, 1954). In Puglia è stata rinvenuta su vite (Frisullo *et al.*, dati non pubblicati). Non è ancora accertata la patogenicità di questa specie.

#### Inquadramento tassonomico (Kirk *et al.*, 2008)

Regno:	Fungi
Phylum:	Ascomycota
Classe:	Dothideomycetes
Sottoclasse:	<i>Incertae sedis</i>
Ordine:	Botryosphaerales
Famiglia:	Botryosphaeriaceae
Genere:	<i>Dothiorella</i>
Specie:	<i>Dothiorella sarmentorum</i> (Fr.) A.J.L. Phillips, Alves & Luque

#### Caratteristiche morfologiche e colturali della forma anomorfa (Phillips *et al.*, 2005)

*Colonie*: su PDA verde olivaceo scuro con scarso micelio aereo.

*Picnidi*: su OA meno di 1 mm di diametro, superficiali e cosparsi sull'intera colonia, iniziano

a formarsi dopo 7 giorni a 23°C, solitari, globosi, provvisti di ostiolo, con pareti spesse rivestite di cellule allungate, ialine, lisce e cilindriche che all'apice originano *cellule conidiogene* piccole e ialine, con pareti sottili, dalle dimensioni di 8-15 × 3,5  $\mu$ m. Le pareti sono formate da spessa *textura angularis* che diventa progressivamente chiara e più sottile verso gli strati interni.

*Conidiofori*: assenti e ridotti a cellule conidiogene.

*Conidi*: prodotti oblasticamente dalle cellule conidiogene, ialini da giovani e bruno scuro a maturità, con apice arrotondato a base troncata di dimensioni (19,6)22,5-23,4(27,0) × (9,9)11,2-11,6(12,9)  $\mu$ m con media e deviazione standard di 22,9±1,5 × 11,4±0,7  $\mu$ m.

*Cellule spermatogene*: distinte o aggregate, ialine, piccole e cilindriche.

*Spermazi*: ialini, piccoli, asettati, con estremità arrotondate, 4-5,5 × 2  $\mu$ m.

#### Principali caratteri distintivi da specie simili

Simile a *D. iberica* può essere distinta per le caratteristiche di aschi, ascospore e conidi. *D. iberica* presenta aschi più corti e più clavati, ascospore affusolate verso la base e, in media, conidi leggermente più lunghi.

#### Substrati semiselettivi

- Agar Estratto di Malto Cloramfenicolo (Martin e Cobos, 2007) (☞ *Appendice I*, 5).

#### Protocolli per la diagnosi molecolare

- PCR impiegando primer disegnati sulla regione ITS; la regione D1/D2, il gene EF1- $\alpha$ , il gene della  $\beta$ -tubulina; sequenziamento del prodotto PCR; confronto con le sequenze disponibili in banca dati GenBank (Úrbez-Torres *et al.*, 2006; Phillips *et al.*, 2005, 2007).
- PCR fingerprinting: MSP-PCR (Micro-Satellite-Primed Polymerase Chain Reaction) e rep-PCR (Repetitive-Sequence-Based Polymerase Chain Reaction), (Alves *et al.*, 2007).
- ARDRA: Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (Alves *et al.*, 2005).

### ■ *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl.

*L. theobromae* è stata associata frequentemente, spesso come "*Botryosphaeria*" *rhodina*, a sintomi di malattia osservati su piante di pesco (Frisullo *et al.*, dati non pubblicati) e vite (Taylor *et al.*, 2005; Úrbez-Torres *et al.*, 2006; Burrano *et al.*, 2008).

#### Inquadramento tassonomico (Kirk *et al.*, 2008)

Regno:	Fungi
Phylum:	Ascomycota
Classe:	Dothideomycetes
Sottoclasse:	<i>Incertae sedis</i>
Ordine:	Botryosphaerales
Famiglia:	Botryosphaeriaceae
Genere:	<i>Lasiodiplodia</i>
Specie:	<i>Lasiodiplodia theobromae</i> (Pat.) Griff. & Maubl.

**Caratteristiche morfologiche e colturali della forma anamorfa (Taylor *et al.*, 2005)**

**Colonie:** su PDA di 8,5 cm di diametro in 7 giorni a 23°C, grigio scuro; su OA dal grigio-marrone al nero con denso micelio aereo.

**Picnidi:** separati o aggregati, scuri, uniloculati, spessi o con parete sottile, pareti spesse e scure di *textura angularis*.

**Parafisi:** ialine, flessuose, cilindriche, settate, lunghe fino a 50 µm.

**Ostioli:** centrali, singoli o papillati.

**Conidiofori:** ridotti a cellule conidiogene.

**Cellule conidiogene:** ialine, piccole cilindriche o subpiriformi, hanno proliferazione determinata o indeterminata con una o due distinte anellazioni, rivestono l'intera cavità dei picnidi, producono conidi oloblasticamente.

**Conidi:** oblungi, inizialmente ialini e asettati poi scuri e unisetati con irregolari striature longitudinali, arrotondati all'apice e con base tronca, (20)24-28(33) × (10)12-15(18) µm.

**Principali caratteri distintivi da specie simili**

*Lasioidiplodia* si distingue da *Diplodia* per le parafisi all'interno dei picnidi, e per le tipiche striature longitudinali dei conidi (Taylor *et al.*, 2005).

**Protocolli per la diagnosi molecolare**

- PCR impiegando primer disegnati sulla regione ITS; la regione D1/D2, il gene EF1- $\alpha$ , il gene della  $\beta$ -tubulina, mt SSU rDNA; sequenziamento del prodotto PCR; confronto con le sequenze disponibili in banca dati GenBank (Zhou *et al.*, 2001; Alves *et al.*, 2004; Úrbez-Torres *et al.*, 2006; Phillips *et al.*, 2007).
- PCR fingerprinting: MSP-PCR (Micro-Satellite-Primed Polymerase Chain Reaction) e rep-PCR (Repetitive-Sequence-Based Polymerase Chain Reaction), (Alves *et al.*, 2007).
- ARDRA: Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (Alves *et al.*, 2005).

**Metaboliti per la diagnosi biochimica**

- $\beta$ -glucano: (Selbmann *et al.*, 2003; Crognale *et al.*, 2003; 2007)  
**Substrato:** acque reflue di frantoio con 0,5 g/l estratto di lievito e 1,5 g/l NaNO<sub>3</sub> (Crognale *et al.*, 2003)  
**Condizioni di crescita:** substrato liquido in agitazione orbitale (180 rpm per 120 ore a 28°C) (Crognale *et al.*, 2003)  
**Estrazione:** 2 vol. etanolo  
**Determinazione con fenolo:** acido solforico (Selbmann *et al.*, 2003, 2004).

**■ *Neofusicoccum luteum* (Pennycook & Samuels)****Crous, Slippers & A.J.L. Phillips)**

Patogeno delle colture forestali e da frutto già isolato in precedenza in Portogallo e Nuova Zelanda, ma identificato erroneamente come *B. dothidea* (Fr.: Moug.) Ces. & De Not. (Phillips *et al.*, 2002). Su vite è stato segnalato come "*Botryosphaeria*" *lutea* A.J.L. Phillips in Sud-Africa, Portogallo, Australia (van Niekerk *et al.*, 2006); in Italia è stato rinvenuto in Puglia da Frisullo *et al.* (dati non pubblicati).

**Inquadramento tassonomico (Kirk *et al.*, 2008)**

Regno:	Fungi
Phylum:	Ascomycota
Classe:	Dothideomycetes
Sottoclasse:	<i>Incertae sedis</i>
Ordine:	Botryosphaerales
Famiglia:	Botryosphaeriaceae
Genere:	<i>Neofusicoccum</i>
Specie:	<i>Neofusicoccum luteum</i> (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips

**Caratteristiche morfologiche e colturali della forma anamorfa (Phillips, 2002)**

**Colonie:** su PDA inizialmente non colorate, dopo circa 3 giorni a 25°C diffonde in tutto il substrato un pigmento giallo; dopo 6-7 giorni da violacea a grigia-grigio scura, micelio denso; su OA, conidiomi uniloculari; spore espulse dagli ostioli entro 5-7 giorni a 23°C. Anche oltre 800 conidiomi prodotti mediamente in una piastra Petri (90 mm).

**Picnidi (Conidiomi):** parzialmente immersi nel substrato, globosi, generalmente papillati, eustromatici, separati o confluenti, dal marrone scuro al nero, uni o multiloculari immersi nel tessuto dell'ospite; loculi superiori ai 150 µm di diametro. Pareti consistenti in *textura angularis* marrone scuro che diventa più chiara e sottile avvicinandosi alla zona interna fertile. Ostioli circolari e papillati.

**Conidiofori:** ialini, cilindrici, lisci a pareti sottili, raramente ramificati alla base, misurano 8-19 × 3-4 µm.

**Cellule conidiogene:** separate, ialine, lisce, cilindriche; il primo conidio è prodotto in maniera oloblastica, mentre i successivi attraverso conidiogenesi enteroblastica; la cellula conidiogena può accrescersi dopo la produzione del primo conidio, originando anellazioni non distinguibili, o prolifera in modo enteroblastico, generando ispessimenti periclinali tipici delle fialidi, dimensioni (6)8-16(18) × (2,5)3-4(4,5) µm.

**Conidi:** ialini a pareti sottili, asettati, lisci, ellissoidali, più larghi nel mezzo o nel terzo superiore, apice subobtusato, base troncata, (15)16,5-22,5(24) × 4,5-6(7,5) µm; limite di confidenza (95%) di 242 conidi = 19,4-19,9 µm; media e deviazione standard di 242 conidi pari a 19,7±1,8 × 5,6±0,6 µm; rapporto lunghezza/larghezza 3,6±0,5; limite di confidenza (95%) pari a 3,5; di forma e dimensioni simili a quelli osservati in natura possono sviluppare un singolo setto (occasionalmente due) prima della germinazione, ma restano ialini.

**Microconidi:** prodotti da alcuni isolati, ialini, reniformi con estremità sia troncate che arrotondate; 3-5 × 1 µm.

**Principali caratteri distintivi da specie simili**

*Neofusicoccum luteum* si differenzia da *N. parvum* e *B. dothidea* esclusivamente per l'anamorfo. La principale caratteristica distintiva è la produzione di pigmento giallo che diffonde nel substrato agarizzato in giovani colture. Un'ulteriore caratteristica che differenzia *N. luteum* da *N. parvum* e *B. dothidea* è la produzione su OA di conidiomi uniloculari.

**Substrati semiselettivi**

Agar Estratto di Malto Streptomycin (Giménez-Jaime *et al.*, 2006) (☞ *Appendice I*, 2).

**Protocolli per la diagnosi molecolare**

- PCR impiegando primer disegnati sulla regione ITS; la regione D1/D2, il gene EF1- $\alpha$ , il gene della  $\beta$ -tubulina, mt SSU rDNA; sequenziamento del prodotto PCR; confronto con le sequenze disponibili in banca dati GenBank (Zhou *et al.*, 2001; Alves *et al.*, 2004; Úrbez-Torres *et al.*, 2006; Phillips *et al.*, 2007).
- PCR fingerprinting: MSP-PCR (Micro-Satellite-Primed Polymerase Chain Reaction) e rep-PCR (Repetitive-Sequence-Based Polymerase Chain Reaction), (Alves *et al.*, 2007).
- ARDRA: Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (Alves *et al.*, 2005).

**Metaboliti per la diagnosi biochimica**

- Metaboliti idrofili con alto peso molecolare, probabilmente esopolisaccaridi (Martos *et al.*, 2008).
- Fitotossine lipofile con basso peso molecolare (Martos *et al.*, 2008).

**■ *Neofusicoccum parvum* (Pennycook & Samuels)****Crous, Slippers & A.J.L. Phillips**

Patogeno di piante forestali, incluso *Eucalyptus* spp. (Frezzi, 1952; Davison e Tay, 1983; Shearer *et al.*, 1987; Crous *et al.*, 1989; Ahumada, 2003; Rodas, 2003; Slippers *et al.*, 2004a, 2004b, 2004c), è riportato anche su olivo (Lazzizzera *et al.*, 2008) e, frequentemente, come "*Botryosphaeria*" *parva*, anche su vite, come una delle specie più aggressive su questo ospite (Phillips *et al.*, 2002; van Niekerk *et al.*, 2006).

**Inquadramento tassonomico (Kirk *et al.*, 2008)**

Regno:	Fungi
Phylum:	Ascomycota
Classe:	Dothideomycetes
Sottoclasse:	<i>Incertae sedis</i>
Ordine:	Botryosphaeraiales
Famiglia:	Botryosphaeriaceae
Genere:	<i>Neofusicoccum</i>
Specie:	<i>Neofusicoccum parvum</i> (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips)

**Caratteristiche morfologiche e culturali della forma anamorfa (Phillips, 2002)**

**Colonie:** su PDA 8,5 cm di diametro in 6 giorni a 22°C, inizialmente bianche con abbondante micelio aereo, gradualmente virano dal grigio al grigio scuro; sul retro dapprima bianco, quindi nei successivi 2-3 giorni da verde scuro a verde oliva partendo dalla parte centrale fino a diventare nera, scarsamente differenti da quelle di *B. dothidea*.

**Picnidi (Conidiomi):** in OA multiloculari, non papillati, in numero di 35-50 per piastra, esternamente indistinguibili dai periteci; uni o multiloculari, isolati o associati agli ascomi nell'ambito dello stesso stroma. Da globosi e non papillati a piriformi con una corta, acuta, papilla che si apre attraverso un ostiolo non perifisato.

**Conidiofori:** ridotti a cellule conidiogene che rivestono la parete interna del picnidio.

**Cellule conidiogene:** ialine, con formazione di conidi all'apice in modo oloblastico formando una o due anellazioni periclinali.

**Conidi:** espulsi attraverso gli ostioli dopo 13-15 giorni di incubazione a 23°C; pareti sottili e lisce, ialini, guttulati, unicellulari; da fusiformi ad ellissoidali con apice sub-obtuso e base troncata o arrotondata, più larghi nel mezzo o nel terzo superiore con le dimensioni di (12)15-20(24) × (4)4,5-6(7,5)  $\mu$ m; media e deviazione standard di 320 conidi = 17,2±1,6 × 5,6±0,6  $\mu$ m. Rapporto lunghezza/larghezza di (1,8)2,5-4(5) con media e deviazione standard pari a 3,2±0,4. Frequentemente diventano olivacei o marrone chiaro e sviluppano uno o due setti; la cellula centrale assume una colorazione più scura.

**Microconidi:** quando presenti, sono ialini, lisci, troncati in entrambe le estremità, 3-5 × 1-1,5  $\mu$ m.

**Principali caratteri distintivi da specie simili**

*Neofusicoccum parvum* è molto simile a *B. dothidea*, ma si differenzia per avere conidi più corti ed ellissoidali. Su OA produce conidiomi multiloculari più grandi e meno numerosi rispetto a *B. dothidea*. La caratteristica che distingue *N. parvum* da *N. luteum* è l'assenza di pigmenti gialli in coltura.

**Substrati semiselettivi**

- Agar Estratto di Malto cloramfenicolo (Martin e Cobos, 2007) (☞ *Appendice I*, 5).

**Protocolli per la diagnosi molecolare**

- PCR impiegando primer disegnati sulla regione ITS; la regione D1/D2, il gene EF1- $\alpha$ , il gene della  $\beta$ -tubulina, mt SSU rDNA; sequenziamento del prodotto PCR; confronto con le sequenze disponibili in banca dati GenBank (Zhou *et al.*, 2001; Alves *et al.*, 2004; Úrbez-Torres *et al.*, 2006; Phillips *et al.*, 2007; Lazzizzera *et al.*, 2008b).
- PCR fingerprinting: MSP-PCR (Micro-Satellite-Primed Polymerase Chain Reaction) e rep-PCR (Repetitive-Sequence-Based Polymerase Chain Reaction), (Alves *et al.*, 2007).
- ARDRA: Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (Alves *et al.*, 2005).

**Metaboliti per la diagnosi biochimica**

- Metaboliti idrofili con alto peso molecolare, probabilmente esopolisaccaridi (Martos *et al.*, 2008).
- Fitotossine lipofile a basso peso molecolare (Martos *et al.*, 2008).

### ■ *Spencermartinsia viticola* (A.J.L. Phillips & Luque)

#### A.J.L. Phillips, Alves & Crous

Principalmente osservata come "*Botryosphaeria*" *viticola* su tralci di vite in deperimento tanto da farla ritenere più un fungo saprofito che responsabile di malattia (Phillips *et al.*, 2002; 2005; 2008; van Niekerek *et al.*, 2004) e olivo (von Arx e Müller, 1954).

#### Inquadramento tassonomico (Kirk *et al.*, 2008)

Regno:	Fungi
Phylum:	Ascomycota
Classe:	Dothideomycetes
Sottoclasse:	<i>Incertae sedis</i>
Ordine:	Botryosphaeriales
Famiglia:	Botryosphaeriaceae
Genere:	<i>Spencermartinsia</i>
Specie:	<i>Spencermartinsia viticola</i> (A.J.L. Phillips & Luque) A.J.L. Phillips, Alves & Crous

#### Caratteristiche morfologiche e colturali della forma anamorfa (Luque *et al.*, 2005)

**Colonie:** su PDA di colore verde scuro con scarso micelio aereo in superficie e di colore rosso scuro sul fondo. I picnidi su OA hanno meno di 1 mm di diametro, superficiali e cosparsi sull'intera colonia, iniziano a formarsi dopo 7 giorni di incubazione a 23°C.

**Picnidi:** solitari o aggregati, globosi, larghi circa 360 µm, pareti di *textura angularis* spessa e scura che diventa progressivamente chiara e più sottile verso gli strati interni.

**Conidiofori:** ialini, cilindrici ramificati che terminano in cellule conidiogene.

**Cellule conidiogene:** ialine, subcilindriche con 1-2 anellazioni, rivestono l'intera cavità dei picnidi, originano conidi oloblastici.

**Conidi:** dalle dimensioni di (16)20,2-20,6(26) × (7)9,2-9,4(12) µm, con media e deviazione standard di 200 conidi di 20,4±0,1 × 9,3±0,1 µm, rapporto lunghezza/larghezza = 2,2±0,02, con pareti scure, unisetati, lievemente costretti nella zona del setto, ovoidi con entrambe le estremità arrotondate, spesso con base tronca.

**Spermazi:** assenti.

#### Principali caratteri distintivi da specie simili

Simile a *D. sarmentorum* e *D. iberica* può essere distinta per le caratteristiche di aschi, ascospore e conidi. *D. viticola* presenta ascospore affusolate e apiculatate su entrambe le estremità, in media, conidi sono leggermente più corti.

#### Substrati semiselettivi

Nessuno in particolare.

#### Protocolli per la diagnosi molecolare

- Protocolli non dettagliati:
- PCR impiegando primer disegnati sulla regione ITS; la regione D1/D2, il gene EF1- $\alpha$ , il gene della  $\beta$ -tubulina; sequenziamento del prodotto PCR; confronto con le sequenze disponibili in banca dati GenBank (Phillips *et al.*, 2005; 2007; 2008).

### NEONECTRIA / CYLINDROCARPON

Il genere *Cylindrocarpon* (teleomorfo: *Neonectria*) include numerose specie (Mantiri *et al.*, 2001). Diverse specie sono note quali agenti causali del "piede nero della vite" (Grasso e Magnano di San Lio, 1975; Grasso, 1984; Rego *et al.*, 1998, Alaniz *et al.*, 2007) e sono ritenute responsabili degli imbrunimenti vascolari di piante di vite in diversi paesi (Maluta e Larignon, 1991; Scheck *et al.*, 1998). L'identificazione è generalmente basata sui caratteri morfologici, come la colorazione delle colonie, la velocità di crescita, la produzione di clamidospore, nonché la dimensione e la forma di micro e macroconidi (Booth, 1966; Halleen *et al.*, 2006a, 2006b).

### ■ *Neonectria liriodendri* Halleen, Rego & Crous

#### (anam. *Cylindrocarpon liriodendri* J.D. MacDon. & E.E. Butler)

Su vite in Francia, Nuova Zelanda, Portogallo e Sud Africa (Halleen *et al.*, 2006a, 2006b).

#### Inquadramento tassonomico (Kirk *et al.*, 2008)

Regno:	Fungi
Phylum:	Ascomycota
Classe:	Sordariomycetes
Sottoclasse:	Sordariomycetidae
Ordine:	Hypocreales
Famiglia:	Nectriaceae
Genere:	<i>Neonectria</i>
Specie:	<i>Neonectria liriodendri</i> Halleen, Rego & Crous (anam. <i>Cylindrocarpon liriodendri</i> J.D. MacDon. & E.E. Butler)

#### Caratteristiche morfologiche e colturali (Halleen *et al.*, 2006a, 2006b)

**Colonie:** su PDA (sia superiormente che sul fondo della colonia) da color cannella a seppia, micelio aereo sparso, su OA da mattone scuro a fulvo; su PDA 30-42 mm di diametro dopo 7 giorni al buio a 20-25°C (ottimale, minima < 4°C, massima 30-35°C).

**Periteci:** apparentemente non differenziati in natura, ottenibili *in vitro*, disposti singolarmente o in gruppi fino a un massimo di 6, direttamente sulla superficie dell'agar, da ovoidali a sub-piriformi, con un apice appiattito, ampi fino a 70 µm, da arancio a rosso, divengono rosso porpora in 3% KOH, da lisci a tubercolati, fino a 300 µm diametro con un piccolo stroma di cellule parenchimatose rosso scuro; parete costituita da due regioni, la più esterna spessa 15-30 µm è composta da 1-3 strati di cellule angolari o subglobose, 10-25 × 8-17 µm; cellule della parete spesse sino a 1 µm; la regione più interna, spessa 10-15 µm, è composta da cellule piatte trasversali in sezione, 7-15 × 3-5 µm; tubercoli formati da cellule globose o sub-globose, 15-30 × 15-20 µm.

**Aschi:** da limitatamente clavati a cilindrici, 45-60 × 5-6 µm, contenenti 8 spore; apici subtroncati, con anello definito e chiaramente visibile.



*Ascospore*: mediamente con un setto, da ellissoidali a oblunghe-ellissoidali, talvolta affusolate a entrambe le estremità, da lisce a leggermente tubercolate, ialine divengono bruno chiaro con l'età, (7)9-11(14) × (2,5)3-3,5(4) µm.

*Conidiofori*: semplici o complessi, sporodochiali; i conidiofori semplici emergono laterali o terminali da micelio aereo, o eretti e originati direttamente sulla superficie dell'agar, singoli o scarsamente aggregati, non o occasionalmente ramificati, 1-6-setti, raramente costituiti solo da una fialide, lunghi 40-160 µm, monofialidi cilindriche, 20-40 × 3-4 µm, 2-2,5 µm in prossimità dell'ostiolo; i conidiofori aggregati in sporodochi, irregolarmente ramificati, fialidi cilindriche, generalmente più ampie alla base, 15-30 × 2,5-3,5 µm, 2-2,5 µm presso l'apertura. Micro- e macroconidi presenti su entrambe le tipologie di conidiofori.

*Macroconidi*: prevalenti, con (1)3-setti, diritti o talvolta appena curvati, cilindrici, generalmente è visibile un ilo in posizione basale o leggermente laterale; 3-setti, (24)35-40(55) × (4,5)5,5-6(6,5) µm (n = 116).

*Microconidi*: prodotti di rado su tutti i substrati, 0-1-setti, da ellissoidali a subcilindrici e ovoidali, più o meno diritti, ilo chiaramente o poco visibile in posizione laterale; microconidi non settati subcilindrici-ellissoidali, 5-15 × 2,5-4 µm; microconidi non settati ovoidali, 3-5 × 3-4 µm.

*Conidi*: formati all'apice di conidiofori semplici come massa ialina.

*Clamidospore*: comuni, brune, da ovoidali a ellissoidali, generalmente in corte catene intercalate, 10-20 × 10-17 µm.

#### Principali caratteri distintivi da specie simili

Al momento non sono stati rilevati caratteri morfologici tipici della specie (Halleen *et al.*, 2006a, 2006b).

#### Substrati semiselettivi

- Agar Estratto di Malto Streptomycin (Giménez-Jaime *et al.*, 2006) (☞ *Appendice I*, 2).
- Agar Patate Destrosio Tetraciclina (Petit e Gubler, 2005) (☞ *Appendice I*, 3).

#### Protocolli per la diagnosi molecolare

- Primer genere-specifici (☞ *Appendice II*, 8)  
*Primer*: Cyl-F e Cyl-R (Dubrovsky e Fabritius, 2007)  
*Dimensioni del prodotto di amplificazione*: 395 bp.

#### Metaboliti per la diagnosi biochimica

- Eugenitin (5-hydroxy-7-methoxy-2,6-dimethylchromone) (Coombe *et al.*, 1972), dettagli del protocollo non disponibili.
- 2-acetonyl-3,5-dihydroxy-7-methoxy-1,4-naphthoquinone (Coombe *et al.*, 1972), dettagli del protocollo non disponibili.

### ■ *Neonectria macrodidyma* Halleen, Schroers & Crous (anam. *Cylindrocarpon macrodidymum* Schroers, Halleen & Crous)

Specie rinvenuta su radici e barbatelle di vite in Australia, Canada, Nuova Zelanda, Sud Africa (Halleen *et al.*, 2003, 2004; Petit e Gubler, 2005). Il fungo è coinvolto nell'eziologia del piede nero.

#### Inquadramento tassonomico (Kirk *et al.*, 2008)

Regno:	Fungi
Phylum:	Ascomycota
Classe:	Sordariomycetes
Sottoclasse:	Sordariomycetidae
Ordine:	Hypocreales
Famiglia:	Nectriaceae
Genere:	<i>Neonectria</i>
Specie:	<i>Neonectria macrodidyma</i> Halleen, Schroers & Crous (anam. <i>Cylindrocarpon macrodidymum</i> Schroers, Halleen & Crous)

#### Caratteristiche morfologiche e colturali (Halleen *et al.*, 2004, 2006a, 2006b)

*Colonie*: su PDA di 30-35 mm di diametro dopo 7 giorni al buio a 20-25°C (temperatura ottimale, minima < 4°C, massima 30°C); micelio aereo abbondante che copre l'intera colonia, giallognolo e fortemente vacuolato; sul fondo la colorazione assunta è terra bruciata nella porzione centrale e terra di Siena verso il margine, rossastra o bruno-giallo con un margine tipicamente color giallo chiaro-ambra. Specie eterotallica.

*Periteci*: differenziati solo *in vitro*, solitari o a gruppo, da ovoidali a obpiriformi, rosso scuro diventano rosso porpora in 3% KOH, da lisce a leggermente rugosi, 200-250 µm di diametro, la parete è composta da due strati poco distinguibili; la regione più esterna è di 20-30 µm con 1-3 strati di cellule, 9-20 × 7-15 µm, con parete cellulare fino a 1 µm; strato più interno spesso 5 µm; tubercoli composti da cellule globose o sub-globose, 7-16,5 × 4,5-13,5 µm.

*Aschi*: da clavati a strettamente clavati, 65 × 10 µm, contenenti 8 ascospore; apice arrotondato con un anello ben definito.

*Ascospore*: bicellulari di ugual misura, da ellissoidali a oblunghe-ellissoidali, talvolta assottigliate alle estremità, da lisce a leggermente tubercolate, (12)14-15-16(18) × (3,5) 4(4,5) µm.

*Conidiofori*: semplici o complessi. Conidiofori semplici emergenti lateralmente o al termine di micelio aereo o eretti, emergenti dalla superficie dell'agar, singoli, talvolta aggregati, non o poco ramificati, 1-4 setti, raramente formati da una sola fialide, 55-120 µm; monofialidi cilindriche, leggermente allargate alla base, lunghe 16,5-30 µm, larghe 2,5-3,5 µm alla base e 2-2,5 µm in prossimità dell'ostiolo. Conidiofori complessi organizzati in sporodochi, irregolarmente ramificati, fialidi cilindriche, leggermente allargate all'apice o lievemente a forma di fiasco, generalmente con un ampio punto nero nel mezzo, lunghe (15,5)17,5-20-21(28,5) µm; larghe alla base (2,5)3(3,5) µm e (1,5)2(2,5) µm vicino l'ostiolo. Micro e macroconidi presenti su entrambi i tipi di conidiofori

*Macroconidi*: prevalenti, formati da entrambi i tipi di conidiofori, in genere 1-3(4) setti, diritti o talvolta leggermente curvati, cilindrici o tipicamente leggermente più ampi all'apice,

pertanto possono apparire talvolta clavati, in particolare quando ancora attaccati alla fialide, apice o cellule apicali leggermente curve su un lato e leggermente rostrate; generalmente con un ilo in posizione laterale; dimensioni simili dei macroconidi con 1, 2 o 3 setti (1 setto 24-32 × 5-7 μm; 3 setti (26)34-36-38(45) × (4)5,5-6-6,5(8) μm).

**Microconidi:** raramente prodotti su SNA (Nirenberg, 1976), moderatamente comuni su OA (Gams *et al.*, 1998); 0-1 setto, da ellissoidali a ovoidali, più o meno diritti con un ilo laterale non sempre chiaramente visibile, microconidi 0-setti (5,5)8-9,5-10,5(12,5) × (3,5)4(4,5) μm.

**Conidi:** formati all'apice di conidiofori semplici, evidenti o come massa bianca (OA) o non pigmentata (SNA) su conidiofori sia semplici che complessi.

**Clamidospore:** talvolta presenti in corte catene intercalari, 7-12,5 × 6-10 μm.

#### Principali caratteri distintivi da specie simili

*Cylindrocarpon destructans* e *C. macrodidymum* sono piuttosto simili, tuttavia, le spore di quest'ultimo sono significativamente più grandi di quelli di *C. destructans*. *C. destructans* produce clamidospore in misura maggiore. Dopo 6 giorni a 25°C, *C. destructans* origina una colonia di dimensioni maggiori (0,34±0,05 cm/giorno) di quella di *C. macrodidymum* (0,30±0,04 cm/giorno). Su MEA (2%), il fondo della colonia di *C. destructans* presenta una tipica colorazione camoscio chiaramente distinguibile da quella arancio-marrone scuro di *C. macrodidymum*.

#### Substrati semiselettivi

- Agar Estratto di Malto Streptomycin (Giménez-Jaime *et al.*, 2006) (☞ *Appendice I*, 2).
- Agar Patate Destrosio Tetraciclina (Petit e Gubler, 2005) (☞ *Appendice I*, 3).
- Spezieller Nährstoffarmer Agar Estratto di lievito (SNAY) (Brayford, 1992) (☞ *Appendice I*, 4).

#### Protocolli per la diagnosi molecolare

- Primer genere-specifici (☞ *Appendice II*, 8)  
*Primer:* Cyl-F e Cyl-R (Dubrovsky e Fabritius, 2007)  
*Dimensioni del prodotto di amplificazione:* 395 bp.
- Protocolli non dettagliati:
  - PCR impiegando primer ITS1 e ITS4 (White *et al.*, 1990), BT1 e BT2 (Glass e Donaldson, 1995), NMS1 e NMS2 (Li *et al.*, 1994) disegnati sulla regione ITS; β-tubulina, mtSSR rDNA, rispettivamente; sequenziamento del prodotto PCR; confronto con le sequenze disponibili in banca dati GenBank (Petit e Gubler, 2005).

#### Metaboliti per la diagnosi biochimica

- Eugenitin (5-hydroxy-7-methoxy-2,6-dimethylchromone) (Coombe *et al.*, 1972), dettagli del protocollo non disponibili.
- 2-acetonil-3,5-dihydroxy-7-methoxy-1,4-naphthoquinone (Coombe *et al.*, 1972), dettagli del protocollo non disponibili.

#### ■ *Neonectria radicola* (Gerlach & L. Nilsson) Mantiri & Samuels

(anam. *Cylindrocarpon destructans* (Zinssm.) Scholten)

Il micete, segnalato la prima volta in Francia nel 1961 (Maluta e Larignon, 1991), è stato isolato da legno imbrunito di vite in diversi Paesi, quali Australia, Italia, Nuova Zelanda, Portogallo e Sud Africa (Sweetingham, 1983; Grasso, 1984; Fourie *et al.*, 2000; Rego *et al.*, 2000; Halleen *et al.*, 2003; 2004, Petit e Gubler; 2005).

#### Inquadramento tassonomico (Kirk *et al.*, 2008)

Regno:	Fungi
Phylum:	Ascomycota
Classe:	Sordariomycetes
Sottoclasse:	Sordariomycetidae
Ordine:	Hypocreales
Famiglia:	Nectriaceae
Genere:	<i>Neonectria</i>
Specie:	<i>Neonectria radicola</i> (Gerlach & L. Nilsson) Mantiri & Samuels (anam. <i>Cylindrocarpon destructans</i> (Zinssm.) Scholten)

#### Caratteristiche morfologiche e colturali (Halleen *et al.*, 2006a, 2006b)

**Colonie:** su PDA di 10-12 mm di diametro dopo 7 giorni, micelio aereo da fioccoso a feltroso, da grigio chiaro-leggermente bruno a rosso-bruno; sul rovescio delle piastre da beige a rosso-bruno.

**Conidiofori:** microconidiofori sviluppati come fialidi laterali o terminali su corte ramificazioni laterali, le quali terminano in una o più fialidi da cilindriche a subulate (18-35 × 2,5-3 μm); i macroconidiofori formano ramificazioni laterali con rami lunghi, scarsamente ramificati all'apice, ciascuna branca termina in una o più fialidi (22-35 × 3,5-4,5 μm).

**Macroconidi:** ialini, cilindrici, con la parte terminale arrotondata, talvolta con un leggero restringimento, dritti o curvati; in genere con 1-5 setti; macroconidi con 1 setto hanno dimensioni di 20-30 × 5-6 μm; con 2-3 setti 30-40 × 5-6,5; con 4-5 setti 42-52 × 6,5-7,5 μm.

**Microconidi:** da ovali a ellittici (6-10 × 3,5-4 μm).

**Conidi:** formati all'apice di conidiofori semplici come massa ialina.

**Clamidospore:** singole o riunite in catene, intercalari o terminali, globose, lisce, brune, 9-14 μm di diametro.

**Periteci:** sparsi, globosi, da rossi a bruno-rossastri, 170-350 × 150-320 μm.

**Aschi:** da cilindrici a subclavati, 58-85 × 4,5-10 μm, da ellissoidali a subfusoidi, contengono 8 ascospore.

**Ascospore:** ialine, con 1 setto, 10-13 × 3-3,5 μm.

#### Principali caratteri distintivi da specie simili

*Cylindrocarpon destructans* e *C. macrodidymum* sono piuttosto simili, tuttavia, le spore di quest'ultimo sono significativamente più grandi di quelli di *C. destructans*. *C. destructans* produce clamidospore in misura maggiore. Dopo 6 giorni a 25°C, *C. destructans* origina una colonia di dimensioni maggiori (0,34±0,05 cm/giorno) di quella di *C. macrodidymum*.

(0,30±0,04 cm/giorno). Su MEA (2%), il fondo della colonia di *C. destructans* presenta una tipica colorazione camoscio chiaramente distinguibile da quella arancio- marrone scuro di *C. macrodidymum*.

#### Substrati semiselettivi

- Agar Estratto di Malto Streptomicina (Giménez-Jaime *et al.*, 2006) (☞ *Appendice I*, 2).
- Agar Patate destrosio tetraciclina (Petit e Gubler, 2005) (☞ *Appendice I*, 3).
- Spezieller Nährstoffarmer Agar Estratto di lievito (SNAY) (Brayford, 1992) (☞ *App. I*, 4).

#### Protocolli per la diagnosi molecolare

- PCR con primer specie-specifici (Nascimento *et al.*, 2001) (☞ *Appendice II*, 9)  
*Primer*: Dest1 e Dest4 (Hamelin *et al.*, 1996)  
*Dimensioni del prodotto di amplificazione*: 400 o 399 bp per *C. destructans* e *C. obtusisporum*.
- Nested-PCR con primer specie-specifici (Nascimento *et al.*, 2001) (☞ *Appendice II*, 10)  
Prima amplificazione – *Primer*: ITS1F e ITS4 (White *et al.*, 1990)  
Seconda amplificazione – *Primer*: Dest1 e Dest4 (Hamelin *et al.*, 1996)  
*Dimensioni del prodotto di amplificazione*: 400 bp.
- PCR impiegando primer ITS1 e ITS4 (White *et al.*, 1990), BT1 e BT2 (Glass e Donaldson, 1995), NMS1 e NMS2 (Li *et al.*, 1994) disegnati sulle regioni ITS,  $\beta$ -tubulina, mtSSR rDNA, rispettivamente; sequenziamento del prodotto PCR; confronto con le sequenze disponibili in banca dati GenBank (Petit e Gubler, 2005).

#### Metaboliti per la diagnosi biochimica

- Nectrolide (Evans *et al.*, 1967).  
*Substrato*: Czapek-Dox; Weindling; Raulin-Thom; Cornsteep  
*Estrazione*: in etere, seguito da un lavaggio con bicarbonato di sodio (1%).
- Auxina e sostanze gibberellina-simili (Strzelczyk e Pokojaska-Burdziej, 1982), dettagli del protocollo non disponibili.
- Citokinina-simili (Strzelczyk e Kampert, 1983), dettagli del protocollo non disponibili.
- Eugenitina (5-hydroxy-7-methoxy-2,6-dimethylchromone) (Coombe *et al.*, 1972), dettagli del protocollo non disponibili.
- 2-acetonyl-3,5-dihydroxy-7-methoxy-1,4-naphthoquinone (Coombe *et al.*, 1972), dettagli del protocollo non disponibili.

### ■ *Cylindrocarpon obtusisporum* (Cooke & Harkness) Wollenweber

La specie è stata rinvenuta su vite, acacia, ombrellifere, taglio, grano (Booth, 1966). In Italia la prima segnalazione, in Sicilia è del 1975 (Grasso e Magnano di San Lio, 1975).

#### Inquadramento tassonomico (Kirk *et al.*, 2008)

Regno:	Fungi
Phylum:	Ascomycota
Classe:	Sordariomycetes
Sottoclasse:	Sordariomycetidae
Ordine:	Hypocreales
Famiglia:	Nectriaceae
Genere:	<i>Cylindrocarpon</i>
Specie:	<i>Cylindrocarpon obtusisporum</i> (Cooke & Harkness) Wollenweber

#### Caratteristiche morfologiche e colturali (Petit e Gubler, 2005)

*Colonie*: su PDA, 10-12 mm di diametro dopo 7 giorni, micelio aereo da fiocoso a feltroso, da ialino a beige o bruno; sul rovescio, la colonia è da beige a rosso-bruno. Temperatura ottimale per la crescita micelica 25 °C.

*Conidiofori*: i microconidiofori formano fialidi lunghe (30-50  $\mu$ m) e subulate; macroconidiofori scarsamente ramificati terminanti in 1-3 fialidi (15-23  $\times$  3-4  $\mu$ m).

*Macroconidi*: ialini, cilindrici, con la parte terminale arrotondata, talvolta appuntiti nella parte basale, 1-3 setti; dimensioni: 28-35  $\times$  4-5  $\mu$ m (conidi con 1 setto), 34-50  $\times$  6-7,5  $\mu$ m (conidi con 2-3 setti). *Microconidi*: ovali, 7-8  $\times$  4-5  $\mu$ m.

*Clamidospore*: singole o riunite in catene, intercalari o terminali, globose, lisce, inizialmente ialine tendenti al bruno a maturità, misurano da 10-15  $\mu$ m.

*Periteci*: rossi, lisci o leggermente rugosi, semi-traslucidi, globosi o piriformi, di 150-300  $\mu$ m di  $\varnothing$ , portanti all'apice piccoli ostioli conici. *Aschi*: clavati, contenenti 8 ascospore.

*Ascospore*: ialine, unisetate, da fusiformi a ellittiche, 7,5-12,5  $\times$  2,5  $\mu$ m.

#### Substrati semiselettivi

- Agar Estratto di Malto Streptomicina (Giménez-Jaime *et al.*, 2006) (☞ *Appendice I*, 2).
- Agar Patate Destrosio Tetraciclina (Petit e Gubler, 2005) (☞ *Appendice I*, 3).
- Spezieller Nährstoffarmer Agar Estratto di lievito (SNAY) (Brayford, 1992) (☞ *App. I*, 4).

#### Protocolli per la diagnosi molecolare

- PCR con primer specie-specifici (Nascimento *et al.*, 2001) (☞ *Appendice II*, 9)  
*Primer*: Dest1 e Dest4 (Hamelin *et al.*, 1996)  
*Dimensioni del prodotto di amplificazione*: 400 o 399 bp per *C. destructans* e *C. obtusisporum*.

#### Metaboliti per la diagnosi biochimica

- Eugenitina [5-hydroxy-7-methoxy-2,6-dimethylchromone] (Coombe *et al.*, 1972), dettagli del protocollo non disponibili.
- 2-acetonyl-3,5-dihydroxy-7-methoxy-1,4-naphthoquinone (Coombe *et al.*, 1972), dettagli del protocollo non disponibili.
- L-asparaginase (Raha *et al.*, 1990), dettagli del protocollo non disponibili.

## PHOMOPSIS

### ■ *Phomopsis viticola* (Sacc.) Sacc.

Il patogeno è presente ovunque è coltivata la vite (Selby e van Hook, 1907; Reddick 1909; Saccardo, 1915; Diffloth, 1923; Drayton, 1926; Pearson e Goheen, 1994). In Italia, alla prima segnalazione del 1937 a Trieste (Goidanich, 1937), sono seguite le segnalazioni in Liguria (Ciccarone, 1953), Sardegna (Prota, 1967) e Puglia (Piglionica ed Elia, 1972; Piglionica, 1981).

*Phomopsis* è un genere che notoriamente comprende forme anamorfe di *Diaporthe*. La teleomorfa di *P. viticola* non è però ancora nota.

#### Inquadramento tassonomico (Kirk *et al.*, 2008)

Regno:	Fungi
Phylum:	Ascomycota
Classe:	Sordariomycetes
Sottoclasse:	Sordariomycetidae
Ordine:	Diaporthales
Famiglia:	Diaporthaceae
Genere:	<i>Phomopsis</i>
Specie:	<i>Phomopsis viticola</i> (Sacc.) Sacc.

#### Caratteristiche morfologiche e colturali della forma anomorfa (Mostert *et al.*, 2001)

**Colonie:** il fungo fruttifica abbondantemente e i picnidi appaiono disposti su una fascia anulare più scura del micelio.

**Micelio:** feltroso, settato, ialino sia intra- che inter-cellulare nei tessuti dell'ospite, di colore variabile in funzione dell'età con tonalità dal biancastro al grigio scuro.

**Picnidi:** scuri, subepidermici, aggregati o dispersi, inizialmente discoidali, larghi 430 µm e lunghi 190-300 µm; a maturità diventano globosi e presentano un ostiolo dal quale vengono estrusi filamenti di colore giallastro, detti "cirri", costituiti da conidi α e β immersi in una sostanza mucillaginosa.

**Conidi α:** in genere più abbondanti di quelli β, unicellulari, ialini, ovali o fusiformi (7-13 × 1,5-3,5 µm) con l'apice arrotondato e la base da ottusa a subtroncata; alle estremità sono normalmente presenti delle guttule, generalmente multiguttulati, raramente biguttulati.

**Conidi β:** sono scolecospore unicellulari, ialine, filiformi e incurvate alle estremità (20-25 × 0,5-1 µm). La produzione dell'una o dell'altra forma conidica è strettamente dipendente dalle condizioni nutrizionali e ambientali.

#### Substrati semiselettivi

- Agar Estratto di Malto Cloramfenicolo (Martin e Cobo, 2007) (☞ *Appendice I*, 5).

#### Protocolli per la diagnosi molecolare

- Nested-PCR impiegando coppie di primer specie-specifici disegnati su marcatori RAPD (Pollastro *et al.*, 2001) (☞ *Appendice II*, 6)  
Prima amplificazione – *Primer:* senso OPA-10<sub>721</sub>for; antisenso OPA-10<sub>721</sub>rev (55°C temperatura di appaiamento, Pollastro *et al.*, 2001)

*Dimensioni del prodotto di amplificazione:* 609 bp

Seconda amplificazione – *Primer:* senso OPA-10<sub>721</sub>for; antisenso OPA-10<sub>721</sub>rev, (60°C temperatura di appaiamento, Pollastro *et al.*, 2001)

*Dimensioni del prodotto di amplificazione:* 399 bp

*Primer:* senso OPA-1<sub>791</sub>for; antisenso OPA-1<sub>791</sub>rev, (55°C temperatura di appaiamento, Pollastro *et al.*, 2001)

*Dimensioni del prodotto di amplificazione:* 194 bp.

#### Metaboliti per la diagnosi biochimica

- Xanthone, phomopsolide B, furanone, cytosporone (Abou Mansour *et al.*, 2007), dettagli del protocollo non disponibili.
- Phomolides A e B e un derivato di benzofuran (Du *et al.*, 2008), dettagli del protocollo non disponibili.
- 1-carbossimetil-6-(idrossimetil)-8-idrossi-xantone; 1-carbossimetil-4-idrossi-6-(idrossimetil)-8-idrossi-xantone; *p*-idrossibenzaldeide; metil 3,5-diidrossi-2,6-dimetil-octa-2,4,6-trienoate; citosporone F; 22E, 24R-3β-idrossi-5α, 9α-ossaciclobutane-ergosta-7, 22-dien-6-one; phomopsolide B: 5S-(2"-metillbut-2E-enoate)-6S-(3'S, 4'Sdiidrossipent-1'-E-ene)-2H-piran-2-one; 5-[1'-(2"-methylbut-2"-enoate)-4', 5'-diidrossiex-2'-ene]-3, 4-diidrossifuran-2-one; 4-metil-5-idrossietil-tiazolo (Mottier, 2005), dettagli del protocollo non disponibili.

## EUTYPA

### ■ *Eutypa lata* (Pers.: Fr.) Tul. & C. Tul.

(anam. *Libertella blepharis* A.L. Smith)

Agente causale dell'eutipiosi, polifago e ubiquitario, è stato rinvenuto per la prima volta nel 1935 in Australia su albicocchi affetti da apoplezia. Il fungo attacca più di 80 specie vegetali legnose, frutticole, forestali e ornamentali con preferenza per albicocco (Carlucci *et al.*, 2004a; 2004b), mandarolo, vite (Polignone *et al.*, 2006), melo e pero.

#### Inquadramento tassonomico (Kirk *et al.*, 2008)

Regno:	Fungi
Phylum:	Ascomycota
Classe:	Sordariomycetes
Sottoclasse:	Xylariomycetidae
Ordine:	Xylariales
Famiglia:	Diatrypaceae
Genere:	<i>Eutypa</i>
Specie:	<i>Eutypa lata</i> (Pers.: Fr.) Tul. & C. Tul. (anam. <i>Libertella blepharis</i> A.L. Smith)

**Caratteristiche morfologiche e colturali (Rui *et al.*, 1985)**

**Colonie:** su PDA 60-70 mm di diametro in 3-4 giorni a 20-25°C; bianche, formate da filamenti miceliali aerei riuniti in piccoli cordoni; talvolta presenta una colorazione scura dopo qualche settimana.

**Picnidi:** emettono cirri di colore avorio-giallo aranciato che sono delle specie di viticci gelatinosi contenenti conidi.

**Conidi:** filiformi, arcuati e ialini di 14-28 × 1 mm (Rui *et al.*, 1985). Non tutti gli isolati sporificano. I conidi non sono normalmente in grado di germinare in laboratorio, sembrano privi di un vero e proprio ruolo patogenetico ed è possibile che fungano da spermazi.

**Periteci:** non differenziati in coltura.

**Aschi:** cilindro-claviformi misurano (30-60 × 5-7,5 mm), hanno un poro apicale.

**Ascospore:** allantoidi, in numero di otto, di colore giallo chiaro, misurano 6,5-11 × 1,8-2 mm.

**Substrati semiselettivi**

- Agar Estratto di Malto Cloramfenicolo (Martin e Cobo, 2007) (☞ *Appendice I*, 5).
- Agar Patate Destrosio Streptomina, Clorotetraciclina, Dicloran (Munkvold, 2001) (☞ *Appendice I*, 6).

**Protocolli per la diagnosi molecolare**

- Primer specie-specifici disegnati su marcatori RAPD (☞ *Appendice II*, 11)  
*Primer:* senso Eut02 F3; antisenso Eut02 R2 (Lardner *et al.*, 2005)  
*Dimensioni del prodotto di amplificazione:* 643 bp.
- Altri protocolli non dettagliati: PCR-RFLP (Rolshausen *et al.*, 2004); Nested Multiplex Polymerase Chain Reaction (Catal *et al.*, 2007).

**Metaboliti per la diagnosi biochimica**

Diversi metaboliti sono stati estratti da *E. lata* con diversi metodi di estrazione e purificazione. Di seguito se ne riportano solo alcuni:

- Eutypinol (Colrat *et al.*, 1999)  
*Materiale:* sospensione di 1 × 10<sup>6</sup> ml<sup>-1</sup> cellule di *Vitis vinifera* L. da bacche  
*Incubazione:* in 0,7 M mannitolo e 15,6 μM eutipine, 30°C per 60 minuti  
*Estrazione:* in etere dietilico per tre volte  
*Separazione:* TLC gel silica con diclorometano seguito da esposizione a un film X-ray (Kodak XAR-5).
- Eutypinol, chromeme, eutypine, benzofuran, sicayne, eulatinol (Molyneux *et al.*, 2002; Mahoney *et al.*, 2003)  
*Substrati:* PDB (Patate destrosio broth), MYEB (Malt Yeast Extract Broth), Vogel's Medium N (VMN) e Pezet's Medium  
*Condizioni di allevamento:* 25°C per 30 giorni  
*Filtro:* Whatman n. 4  
*Solvente di estrazione:* etere dietilico  
*Analisi:* HPLC, colonna Microsorb C<sub>18</sub> 5 μm, 250 × 4,6 mm.
- Eutypinol, methyl-eutypinol, eulatachromeme, eutypine, methyl eutypine, benzofuran, sicayne, eulatinol (Lardner *et al.*, 2006)

*Materiale:* micelio, legno da piante inoculate con *Eutyta lata*

*Condizioni:* 25°C per 20 giorni al buio

*Solvente di estrazione:* cloroformio o etere dietilico

*Analisi:* HPLC, colonna Microsorb C<sub>18</sub> 5 μm, 250 × 4,6 mm.

- Eutypine (Tsoupras *et al.* 1988; Renaud *et al.*, 1989; Jimenez-Teja *et al.*, 2005), Chromeme, e Sicayne (Molyneux *et al.*, 2002), dettagli dei protocolli non disponibili.

**SEIMATOSPORIUM****■ *Seimatosporium lichenichola* (Corda) Shoemaker & Müller**

Analogamente a molti basidiomiceti *Seimatosporium lichenichola* è una specie lignicola rinvenibile su tronco e branche di vite come saprofita.

**Inquadramento tassonomico (Kirk *et al.*, 2008)**

Regno:	Fungi
Phylum:	Ascomycota
Classe:	Sordariomycetes
Sottoclasse:	Xylariomycetidae
Ordine:	Xylariales
Famiglia:	Amphisphaeriaceae
Genere:	<i>Seimatosporium</i>
Specie:	<i>Seimatosporium lichenichola</i> (Corda) Shoemaker & Müller

**Caratteristiche morfologiche e colturali**

**Colonie:** a crescita molto lenta, su MEA 4-5 cm di diametro in due settimane a 22°C.

**Conidiofori:** partono dalla base dello stroma, 1 setto, incolori, lunghi 20-40 μm.

**Conidi:** clavati, ellissoidali e fusiformi con apice obtuso e stretto; incolori; curvi, base tronca, parete liscia, 3 setti, portano un appendice apicale o basale, misurano 12-18 × 5,5-6,5 μm.

**■ *Seimatosporium lonicerae* (Cooke) Shoemaker**

Cresce su legno di *Lonicera periclymenum* e vite.

**Inquadramento tassonomico (Kirk *et al.*, 2008)**

Regno:	Fungi
Phylum:	Ascomycota
Classe:	Sordariomycetes
Sottoclasse:	Xylariomycetidae
Ordine:	Xylariales
Famiglia:	Amphisphaeriaceae
Genere:	<i>Seimatosporium</i>
Specie:	<i>Seimatosporium lonicerae</i> (Cooke) Shoemaker

**Caratteristiche morfologiche e colturali**

**Colonie:** a crescita molto lenta, su MEA 4-5 cm di diametro in due settimane a 22°C.

**Conidiofori:** partono dalla base dello stroma, settati, ramificati, incolori, lunghi 50 µm.

**Conidi:** clavati e fusiformi con apice obtuso e stretto, incolori, base tronca, parete liscia, 3 setti di rado due setti, portano un'appendice in posizione apicale o basale, misurano 9-16 × 3,5-5 µm.

**BASIDIOMICETI LIGNINOLITICI****FOMITIPORIA****■ *Fomitiporia mediterranea* M. Fischer**

Diffusa in tutta l'Europa meridionale, la sua presenza è stata rinvenuta in Francia, Germania, Italia, Grecia, Spagna e altri paesi europei. In queste aree il basidiomicete non è solo presente su *Vitis vinifera*, ma anche su altre piante legnose di diversi generi (Fischer, 2002; 2006), tra cui olivo (Fischer, 2006; Carlucci *et al.*, 2008a; 2008b). In Europa centrale, *F. mediterranea* sembra essere presente solo su *Vitis vinifera*.

**Inquadramento tassonomico (Kirk *et al.*, 2008)**

Regno:	Fungi
Phylum:	Basidiomycota
Classe:	Agaricomycetes
Sottoclasse:	<i>Incertae sedis</i>
Ordine:	Hymenochaetales
Famiglia:	Hymenochaetaceae
Genere:	<i>Fomitiporia</i>
Specie:	<i>Fomitiporia mediterranea</i> M. Fischer

**Caratteristiche morfologiche e colturali**

**Colonie:** a crescita molto lenta raggiungono, su agar-estratto di malto, un diametro di 4-5 cm in due settimane a 22°C (Larignon e Dubos, 1997), il micelio, a tessitura compatta e feltrosa, è inizialmente bianco e poi diventa giallo-ocra. Le zone di avanzamento rimangono bianche, mentre sul rovescio è possibile osservare la formazione di linee brune che attraversano la colonia.

**Carpofori:** perenni, resupinati, spesso pulvinati, con spessore che diminuisce andando dal centro verso il margine, hanno forma allungata e superficie ondulata. Possono essere singoli o fusi insieme, spessi fino a 1 cm e possono raggiungere le dimensioni di 0,5-2,5 × 1-6 cm. La superficie poroide ha un colore che varia dal bruno-cannella al bruno ambrato ed è ricoperta da una pruina biancastra.

**Principali caratteri distintivi da specie simili**

Le caratteristiche del corpo fruttifero sono sostanzialmente uguali a quelle di *F. punctata*; *F. medi-*

*terranea* si distingue dalla precedente per la sequenza della regione ribosomiale ITS1-5.8S-ITS2 e per una più rapida crescita micelica in un intervallo di temperature tra 15 e 35°C.

**Substrati semiselettivi**

- Agar Estratto di Malto cloramfenicolo (Martin e Cobo, 2007) (☞ *Appendice I*, 5).

**Protocolli per la diagnosi molecolare**

- Nested-PCR impiegando coppie di primer specie-specifici disegnati su marcatori RAPD (Pollastro *et al.*, 2001) (☞ *Appendice II*, 6)  
Prima amplificazione - *Primer:* senso OPA-2<sub>673</sub>for; antisenso OPA-2<sub>673</sub>rev (Pollastro *et al.*, 2001)  
*Temperatura di appaiamento:* 57°C  
*Dimensioni del prodotto di amplificazione:* 581 bp;  
Seconda amplificazione - *Primer:* senso OPA-2<sub>673</sub>for; antisenso OPA-2<sub>673</sub>rev (Pollastro *et al.*, 2001).  
*Temperatura di appaiamento:* 60°C  
*Dimensioni del prodotto di amplificazione:* 295 bp.
- Protocolli non dettagliati: PCR impiegando primer ITS1 e ITS4 (White *et al.*, 1990), disegnati sulla regione ITS; sequenziamento del prodotto PCR; confronto con le sequenze disponibili in banca dati GenBank (Fischer, 2002; Pilotti *et al.*, 2005).

**Metaboliti per la diagnosi biochimica**

- Composti fenolici: acido gallico, protocatecuicaldeide, 2,5-diidrossibenzaldeide, acido vanillico, rutina, *trans*-resveratrolo, miricetina, quercetina-3-ramnoside, apigenina e campherolo (b, c)  
*Substrato:* colture duali calli di vite- fungo o filtrati colturali ottenuti allevando il fungo su MEA per 28 giorni a 25°C  
*Solvente di estrazione:* dietilere; etil-acetato  
*Metodo di separazione:* analisi cromatografica in HPLC.

**■ *Fomitiporia polymorpha* M. Fisch.**

Specie descritta recentemente (Fischer e Binder, 2004) ha un ampio range di ospiti, prevalentemente latifoglie, spesso specie arbustive, e occasionalmente anche conifere.

**Inquadramento tassonomico (Kirk *et al.*, 2008)**

Regno:	Fungi
Phylum:	Basidiomycota
Classe:	Agaricomycetes
Sottoclasse:	<i>Incertae sedis</i>
Ordine:	Hymenochaetales
Famiglia:	Hymenochaetaceae
Genere:	<i>Fomitiporia</i>
Specie:	<i>Fomitiporia polymorpha</i> M. Fisch.

**Caratteristiche morfologiche e colturali (Fischer e Binder, 2004)**

*Colonie:* a crescita molto lenta.

*Carpofori:* perenni, variabili in forma, da resupinati a effuso-riflessi, numerosi e inseparabili, di consistenza legnosa, fino a 5 × 5 × 6 cm. Superficie poroide con colorazione che varia dal bruno pallido al bruno dorato, pori circolari larghi 4-7 mm.

*Sistema ifale:* da monomitico a dimitico; setti privi di connessioni a fibbia, tessuti che divengono neri con KOH.

*Ife scheletriche:* brune, raramente ramificate, assetate, larghe 2,5-5,0 µm.

*Ife generative:* ialine frequentemente ramificate, con singoli setti, larghe 2,0-3,5 µm.

*Sete:* presenti sull'imenio da bruno chiaro a color ruggine, 18-57 × 4-12 µm.

*Spore:* da ellissoidi a subglobose, ialine (6,0)6,5-7,5(8,0) × (5,0)5,5-6,5(7,0) µm.

**Principali caratteri distintivi da specie simili**

Le caratteristiche del corpo fruttifero permettono la distinzione di tale specie da altre, quali *F. punctata* e *F. mediterranea*; inoltre specifica è la sequenza della regione ribosomiale ITS1-5.8S-ITS2.

**■ *Fomitiporia punctata* (Fr.:P. Karst.) Murrill**

Specie recentemente descritta, sembra essere diffusa prevalentemente in America del Nord su conifere (Decok *et al.*, 2007). Quando questa specie è stata identificata su vite, si trattava generalmente di identificazioni erranee.

**Inquadramento tassonomico (Kirk *et al.*, 2008)**

Regno:	Fungi
<i>Phylum:</i>	Basidiomycota
Classe:	Agaricomycetes
Sottoclasse:	<i>Incertae sedis</i>
Ordine:	Hymenochaetales
Famiglia:	Hymenochaetaceae
Genere:	<i>Fomitiporia</i>
Specie:	<i>Fomitiporia punctata</i> (Fr.:P. Karst.) Murrill

**Caratteristiche morfologiche e colturali (Davidson *et al.*, 1938)**

*Colonie:* a crescita molto lenta, 9 cm in 5-6 settimane. Fronte di avanzamento biancastro, fioccoso, con ife aeree, micelio da rosato a bruno olivaceo nella porzione centrale della colonia.

*Ife:* ialine sul fronte di avanzamento con numerosi setti semplici di 1,4-4,5 µm di diam; micelio aereo con ife da ialine a brune, raramente settate.

*Carpofori:* perenni, inizialmente resupinati divengono ampiamente effusi, di consistenza legnosa, non facilmente separabili; margini da giallo a bruno, tomentosi, spessi fino a 2 cm. Superficie poroide da giallo a grigio-bruna. Pori circolari larghi 6-8 mm.

*Spore:* subglobose, ialine 4,3-6,1(6,8) × 4,3-5,0(5,8) µm.

**Principali caratteri distintivi da specie simili**

Le caratteristiche del corpo fruttifero permettono la distinzione di tale specie da altre, quali *F. polymorpha* e *F. mediterranea*; inoltre specifica è la sequenza della regione ribosomiale ITS1-5.8S-ITS2.

**Substrati semiselettivi**

- Agar Estratto di Malto Benomyl (utilizzato da Cortesi *et al.*, 2000 per *F. mediterranea*) (☞ *Appendice I*, 7).

**Protocolli per la diagnosi molecolare**

- PCR impiegando primer ITS1 e ITS4 (White *et al.*, 1990), disegnati sulla regione ITS; sequenziamento del prodotto PCR; confronto con le sequenze disponibili in banca dati GenBank (Cortesi *et al.*, 2000; Fischer, 2002).

**Metaboliti per la diagnosi biochimica**

- 5 metaboliti fitotossici non identificati di basso peso molecolare (Sparapano *et al.*, 2000a, b)
- 4-Hydroxy-benzaldehyde e 6-Formyl-2,2-dimethyl-4-chromanone (Tabacchi *et al.*, 2000)  
*Substrato:* Carrot-broth    *Condizioni di allevamento:* a 25 °C per 28 giorni  
*Filtro:* celite    *Solvente di estrazione:* etil-acetato  
*Purificazione:* colonna per cromatografia (silica gel; gradiente esano/EtOAc)  
*Ulteriore purificazione:* HPLC, colonna RP-C-18 (gradiente MeOH-H<sub>2</sub>O)

**CHONDROSTEREUM****■ *Chondrostereum purpureum* (Pers.: Fr.) Pouzar****Inquadramento tassonomico (Kirk *et al.*, 2008)**

Regno:	Fungi
<i>Phylum:</i>	Basidiomycota
Classe:	Agaricomycetes
Sottoclasse:	Agaricomycetidae
Ordine:	Agaricales
Famiglia:	Cyphellaceae
Genere:	<i>Chondrostereum</i>
Specie:	<i>Chondrostereum purpureum</i> (Pers.: Fr.) Pouzar

**Caratteristiche morfologiche e colturali**

*Carpofori:* variabilmente esteso, sporgente per 1-3 cm, da completamente resupinato sul substrato ospite a irregolarmente pluripileato.

*Basidiospore:* ialine, oblunghe, subcilindriche; debolmente amiloidi.

*Sistema ifale:* monolitico.

*Cistidi:* piriformi.

*Basidi:* claviformi, tetrasporici, senza giunto a fibbia basale.

**PHELLINUS**

■ ***Phellinus tuberosus* (Baumg.) Niemelä**  
 (= ***Phellinus pomaceus* (Pers.) Mre.) (Basion.: *Polyporus punctatus* Fr.)**

Cresce su legno di latifoglie, raramente di conifere, ed è agente di carie bianca.

**Inquadramento tassonomico (Kirk et al., 2008)**

Regno:	Fungi
Phylum:	Basidiomycota
Classe:	Agaricomycetes
Sottoclasse:	<i>Incertae sedis</i>
Ordine:	Hymenochaetales
Famiglia:	Hymenochaetaceae
Genere:	<i>Phellinus</i>
Specie:	<i>Phellinus tuberosus</i> (Baumg.) Niemelä (Basion.: <i>Boletus tuberosus</i> Baumg.)

**Caratteristiche morfologiche e colturali**

*Colonia:* a crescita molto lenta, su MEA 4-5 cm di diametro in due settimane a 22°C.

*Micelio:* a tessitura compatta e feltrosa, da bianco a giallo ocra.

*Carpofori:* pluriennali, stratificati, forma allungata, di colore bruno con bordi grigio chiaro; consistenza legnosa; superficie poroide di colore bruno. *Sistema ifale:* dimitico.

*Ifè generatrici:* ialine, settate, ramificate, con pareti sottili o leggermente ispessite, 2-5 µm Ø.

*Ifè scheletriche:* prive di setti, con rare ramificazioni, con pareti ispessite nella trama, 2,5-4,5 µm Ø.

*Basidi:* ialini, ampiamente clavati, tetrasporici, privi di unione a fibbia basale, 10-12 × 5,5-6,5 µm.

*Basidiospore:* ialine, lisce ellissoidali o ovoidali con pareti sottili, non destrinoidi, 5-6 × 4-5 µm.

**TRAMETES**

■ ***Trametes pubescens* (Schum.: Fr.) Pil.**

(Basion.: ***Boletus pubescens* Schumach.**)

Cresce su tronchi a terra, ceppaie e grosse branche di latifoglie; è agente di carie bianca.

Rinvenuto su *Quercus*, *Tilia*, *Betula*, Pesco e Albicocco.

**Inquadramento tassonomico (Kirk et al., 2008)**

Regno:	Fungi
Phylum:	Basidiomycota
Classe:	Agaricomycetes
Sottoclasse:	<i>Incertae sedis</i>
Ordine:	Polyporales
Famiglia:	Polyporaceae
Genere:	<i>Trametes</i>
Specie:	<i>Trametes pubescens</i> (Schum.: Fr.) Pil. (Basion.: <i>Boletus pubescens</i> Schumach.)

**Caratteristiche morfologiche e colturali**

*Colonia:* a crescita molto lenta, su MEA 4-5 cm di diametro in due settimane a 22°C.

*Micelio:* a tessitura compatta e feltrosa, bianco crema che tende a scurirsi.

*Carpofori:* annuali, sessili o con il margine superiore ripiegato, singoli o imbricati, coriacei, sottili in sezione. La superficie sterile è tomentosa, vellutata, dal bianco al crema, al bruno. La superficie poroide è bianco crema e scurisce negli esemplari secchi.

*Sistema ifale:* trimitico.

*Ifè generatrici:* ialine, provviste di unioni a fibbia, ramificate con pareti sottili e 2,5-3,5 µm Ø.

*Ifè connettive:* molto ramificate, sinuose, con pareti ispessite e un diametro di 1,5-4 µm.

*Ifè scheletriche:* prive di setti, con pareti da ispessite a solide, rare ramificazioni, 3,5-8 µm Ø.

*Cistidi:* assenti nello strato imeniale e non sporgenti.

*Basidi:* ialini, clavati, tetrasporici, con unione a fibbia basale e misurano 12-20 × 4-6 µm.

*Basidiospore:* ialine, lisce, con pareti sottili, cilindriche leggerm. ripiegate, di 5,5-7,5 × 1,8-2,5 µm.

■ ***Trametes versicolor* (L.) Pilát**

(Basion.: ***Boletus versicolor* L., sinonimo *Coriolus versicolor, Polystictus versicolor***)

Cresce su legno di latifoglie, raramente di conifere ed è agente di carie bianca fibrosa, molto attiva.

**Inquadramento tassonomico (Kirk et al., 2008)**

Regno:	Fungi
Phylum:	Basidiomycota
Classe:	Agaricomycetes
Sottoclasse:	<i>Incertae sedis</i>
Ordine:	Polyporales
Famiglia:	Polyporaceae
Genere:	<i>Trametes</i>
Specie:	<i>Trametes versicolor</i> (L.) Pilát (Basion.: <i>Boletus versicolor</i> L., sinon. <i>Coriolus versicolor, Polystictus versicolor</i> )

**Caratteristiche morfologiche e colturali**

*Colonia:* a crescita molto lenta, su MEA 4-5 cm di diametro in due settimane a 22°C.

*Micelio:* a tessitura compatta e feltrosa, bianco-grigio.

*Carpofori:* coriacei, sottili, sessili o con il margine superiore ripiegato, spatolati, flabelliformi, imbricati o fusi tra loro lateralmente, misurano fino a 10 cm di diametro e 3 mm di spessore. La superficie sterile è vellutata, di colore molto variabile dal grigio al bruno, dal marrone all'ocra. La superficie poroide è da biancastra a crema ocracea.

*Sistema ifale:* trimitico.

*Ifè generatrici:* ialine, provviste di unioni a fibbia, con pareti sottili e un diametro di 1,5-3 µm.

*Ifè connettive:* ramificate, tortuose, con pareti ispessite e diametro di 2-5 µm.

*Ifè scheletriche:* prive di setti e ramificazioni, con pareti ispessite e hanno 2,5-3,5 µm Ø.

*Cistidi:* assenti, mentre sono presenti cistidioli affusolati, frammisti ai basidi e non sporgenti dallo strato imeniale.

*Basidi:* ialini, clavati, tetrasporici, con unione a fibbia basale e misurano 12-18 × 3,5-5,5 µm.

*Basidiospore:* ialine, lisce, con pareti sottili, cilindriche, leggerm. ripiegate su un lato e misurano 5-6 × 1,8-2,3 µm.



## Appendice I - Substrati semiselettivi

### 1 - Rosa Bengala Cloramfenicolo Agar (Rooney *et al.*, 2001)

Raccogliere le spore su filtri da 0,45 µm; trasferire i filtri in tubi da centrifuga sterili in presenza di 1 ml di acqua sterile e mantenere in agitazione. Distribuire aliquote (200 µl) in capsule Petri da 90 mm contenenti RBCA [Mikrobiologie Co.; EM Science, Gibbstown, NJ-USA; composizione (g/l): peptone micologico 5,0, glucosio 10,0, bi-potassio idrogeno fosfato 1,0, solfato di magnesio 0,5, rosa bengala 0,05, cloramfenicolo 0,1, agar 15,5]; mantenere le piastre 15 minuti sotto cappa quindi a 21±1 °C; dopo 10-14 giorni osservare le colonie al microscopio e allo stereomicroscopio e ove necessario trasferire in purezza su PDA addizionato di 0,1 g/l tetracycline (PDA-tet, Rooney *et al.*, 2001), prima della definitiva identificazione.

### 2 - Estratto di Malto Agar Streptomycin (Giménez-Jaime *et al.*, 2006)

Disporre frammenti di legno prelevati da tessuti cariati e/o imbruniti in capsule Petri contenenti MEAS [Agar Estratto di Malto; 0,5 g/l streptomycina solfato]. Dopo 14-21 giorni a 25±1 °C al buio, osservare le colonie al microscopio e allo stereomicroscopio e ove necessario trasferire in purezza su PDA (Patate Destrosio Agar) o PCA (Patate Carote Agar).

### 3 - Agar Patate destrosio tetraciclina (Petit e Gubler, 2005)

Disporre frammenti di legno (2 mm Ø) prelevati da tessuti sintomatici in capsule Petri contenenti PDA (DIFCO Inc., BD Microbiology Systems, Franklin Lakes, NJ-USA) addizionato di tetraciclina hydrochloride (0,01%) (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO-USA). Dopo 4 giorni a temperatura ambiente, osservare le colonie al microscopio e allo stereomicroscopio.

### 4 - Spezieller Nährstoffarmer Agar Estratto di lievito (SNAY) (Brayford, 1992)

Allevare il micete a 25 °C per 6 giorni, con esposizione a fotoperiodo di 12 ore luce/buio [illuminazione con luci fluorescenti e UV (366 nm)], quindi osservare le colonie al microscopio e allo stereomicroscopio.

### 5 - Agar Estratto di Malto cloramfenicolo (Martin e Cobo, 2007)

Disporre frammenti di legno prelevati da tessuti sintomatici o sani in capsule Petri contenenti MEA addizionato di cloramfenicolo (0,25 mg/ml) Dopo 4 giorni a 25 °C al buio, osservare le colonie al microscopio e allo stereomicroscopio e trasferire in purezza su PDA.

### 6 - Agar Patate destrosio streptomycina, clortetraciclina, dicloran (Munkvold, 2001)

Frammenti di legno di circa 1 cmq, prelevati dal margine interno dei tessuti sintomatici, sono superficialmente disinfettati per immersione in una soluzione 0,5% di NaOCl per 2 minuti. I frammenti asciutti sono quindi disposti su PDA contenente 100 mg/ml di streptomycina-solfato, 50 mg/ml di clortetraciclina HCl e 5 mg/ml di dicloranam. Dopo 4-7 giorni a 24 °C, osservare le colonie al microscopio e allo stereomicroscopio.

### 7- Agar Estratto di Malto benomyl (Cortesi *et al.*, 2000)

Frammenti prelevati dal basidiocarpo o da tessuti sintomatici, sono disposti su MEA (DIFCO Laboratories, Detroit, MI-USA) al 2% contenente 5 mg/l di benomyl. Allevare il micete a 24 °C, al buio, e dopo 7-14 giorni osservare le colonie al microscopio e allo stereomicroscopio.

## Appendice 2 - Protocolli per la diagnosi molecolare

### 1 - Primer specie-specifici disegnati sui geni codificanti $\beta$ -tubulin e actin (Mostert *et al.*, 2006a)

*Materiale:* micelio (200 g)

*Estrazione DNA:* FastDNA Kit (Bio101, Carlsbad, CA)

*Reazioni di amplificazione:* 0,5  $\mu$ l di DNA bersaglio, 1  $\times$  PCR tampone (Bioline GmbH, Luckenwalde, Germany), 2,5 pm di ciascuno dei due primer; 200  $\mu$ M di ciascuno dei dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP); 0,3 U di *Taq* DNA polimerasi (Bioline); 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; acqua ultrapura quanto basta a 12,5  $\mu$ l

*Termociclatore:* GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA-USA)

*Condizioni di amplificazione:* 5 minuti a 94°C seguiti da 5 cicli di 30 secondi a 94°C (denaturazione), 30 secondi a 66°C (appaiamento) e 60 secondi a 72°C (estensione); ulteriori 5 cicli di 30 secondi a 94°C (denaturazione), 30 secondi a 64°C (appaiamento) e 60 secondi a 72°C (estensione); 25 cicli a 94°C per 30 secondi (denaturazione), 30 secondi a 62°C (appaiamento) e 60 secondi a 72°C (estensione); seguiti da una fase finale di 6 minuti a 72°C

*Elettroforesi:* a 85 V per 30 minuti in gel di agarosio allo 0,8% (w/v) in 0,5  $\times$  TAE

*Visualizzazione:* UV dopo colorazione in bromuro di etidio.

### 2 - Primer genere-specifici disegnati sulle regioni ITS1 e ITS2 (Aroca e Raposo, 2007)

*Materiale:* micelio

*Estrazione DNA:* DNAeasy plant mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany)

*Reazioni di amplificazione:* 10 ng di DNA bersaglio; 2  $\mu$ l 10  $\times$  tampone (Biotools, Madrid, Spagna); 0,2  $\mu$ M di ciascuno dei due primer; 0,2 mM di ciascuno dei dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP); 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 U di *Taq* DNA polimerasi (Biotools); 2,5  $\mu$ l siero albumina bovina BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO-USA); 10% dimethyl sulfoxide (Amresco, OH); acqua ultrapura a 25 ml

*Primer:* senso Pm1; antisense Pm2

*Termociclatore:* Perkin-Elmer 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA-USA)

*Condizioni di amplificazione:* 5 minuti a 94°C seguiti da 40 cicli di 30 secondi a 94°C (denaturazione), 30 secondi a 52°C (appaiamento) e 50 secondi a 72°C (estensione); seguiti da una fase finale di 7 minuti a 72°C.

*Elettroforesi:* gel di agarosio allo 1,5% (w/v) in 1  $\times$  TBE

*Visualizzazione:* UV dopo colorazione in bromuro di etidio.

### 3 - Nested-PCR (Aroca e Raposo, 2007)

*Materiale:* legno

*Estrazione DNA:* DNAeasy plant mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany)

#### • Prima amplificazione

*Reazioni di amplificazione:* 10 ng di DNA bersaglio; 2  $\mu$ l 10  $\times$  tampone (Biotools, Madrid, Spagna); 0,2  $\mu$ M di ciascuno dei due primer; 0,2 mM di ciascuno dei dNTP (dATP,

dCTP, dGTP e dTTP); 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,75 U di *Taq* DNA polimerasi (Biotools); 2,5  $\mu$ l BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO-USA); acqua ultrapura quanto basta a 25  $\mu$ l

*Condizioni di amplificazione:* 2,5 minuti a 94°C seguiti da 35 cicli di 15 secondi a 94°C (denaturazione), 30 secondi a 53°C (appaiamento) e 90 secondi a 72°C (estensione); seguiti da una fase finale di 7 minuti a 72°C

#### • Seconda amplificazione

*Reazioni di amplificazione:* 1  $\mu$ l prodotto PCR diluito a 1:200; 2,5  $\mu$ l 10  $\times$  tampone (Biotools, Madrid, Spagna); 0,5  $\mu$ M di ciascuno dei due primer; 0,8 mM di ciascuno dei dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP); 4 mM MgCl<sub>2</sub>; 1,25 U di *Taq* DNA polimerasi (Biotools); acqua ultrapura a 25  $\mu$ l

*Condizioni di amplificazione:* 5 minuti a 94°C seguiti da 30 cicli di 30 secondi a 94°C (denaturazione), 30 secondi a 57°C (appaiamento) e 50 secondi a 72°C (estensione); seguiti da una fase finale di 7 minuti a 72°C

*Termociclatore:* Perkin-Elmer 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA-USA)

*Elettroforesi:* gel di agarosio allo 1,5% (w/v) in 1  $\times$  TBE

*Visualizzazione:* UV dopo colorazione in bromuro di etidio.

### 4 - Real-time PCR SYBR®Green con coppie di primer genere-specifici disegnati sulla regione ITS (Overton *et al.*, 2004)

*Materiale:* micelio; legno (30-40 mg)

*Estrazione DNA:* DNAeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germania)

*Reazioni di amplificazione:* 12,25  $\mu$ l di DNA diluito 1:50; 12,5  $\mu$ l Quanti Tect™ SYBR®Green reaction mix (QIAGEN, Hilden, Germania); 0,5 mM di ciascuno dei due primer; acqua ultrapura a 25  $\mu$ l

*Termociclatore:* Cepheid Smart (Cepheid, Sunnyvale, CA-USA)

*Condizioni di amplificazione:* 15 minuti a 95°C (denaturazione) seguiti da 35-40 cicli di 30 secondi a 95°C (denaturazione), 30 secondi a 66°C (appaiamento) e 60 secondi a 72°C (estensione); ulteriori 5 cicli di 30 secondi a 94°C (denaturazione), 30 secondi a 56°C (appaiamento) e 40 secondi a 72°C (estensione).

### 5 - Primer specie-specifici disegnati sulla regione ITS (Tegli *et al.*, 2000)

*Materiale:* 2 ml di coltura liquida (Potato Dextrose Broth PDB, DIFCO Lab.) del fungo a 10<sup>9</sup> cfu/ml

*Estrazione DNA:* Puragene DNA Isolation Kit (Gentra System Inc., Minneapolis, MN-USA)

*Reazioni di amplificazione:* 10 ng di DNA bersaglio; 20 nM Tris-HCL (pH 8,0); 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 50 mM di ciascuno dei dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP); 0,5 mM di ciascun primer; 2,5 U di *Taq* DNA polimerasi (Polymed srl, Firenze, Italia); acqua ultrapura a 25  $\mu$ l

*Termociclatore:* Delphi 1000, Oracle Biosystems (MJ Research Inc., Watertown, MA-USA)

*Condizioni di amplificazione:* 3 minuti a 95°C seguiti da 30 cicli di 2 minuti a 95°C (denaturazione), 25 secondi a 64°C (appaiamento) e 2 minuti a 72°C (estensione)

*Elettroforesi:* in gel di agarosio all'1,4% (w/v) in 1  $\times$  TBE

*Visualizzazione:* UV dopo colorazione in bromuro di etidio a 0,5  $\mu$ g/ml.

## 6 - Nested-PCR impiegando coppie di primer specie-specifici disegnati su marcatori RAPD (Pollastro *et al.*, 2001)

*Materiale:* micelio o tessuti legnosi.

*Estrazione DNA:* metodo CTAB leggermente modificato (Pollastro *et al.*, 2000)

- **Prima amplificazione**

*Reazioni di amplificazione:* 50 ng di DNA bersaglio; 10 mM Tris-Cl (pH 9,0); 50 mM KCl; 0,1% Triton X-100; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,5 μM di ciascuno dei due primer; 75 μM di ciascuno dei dNTP; 1,5 U di *Taq* DNA polimerasi (Promega, Madison, WI-USA); acqua ultrapura sino a 25 μl

*Condizioni di amplificazione:* 4 minuti a 94°C seguiti da 30 cicli di 30 secondi a 94°C (denaturazione), 30 secondi a 53°C (appaiamento) e 30 secondi a 72°C (estensione); seguiti da una fase finale di 7 minuti a 72°C

- **Seconda amplificazione**

*Reazioni di amplificazione:* 1 μl prodotto PCR; 10 mM Tris-Cl (pH 9,0); 50 mM KCl; 0,1% Triton X-100; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,5 μM di ciascuno dei due primer; 75 μM di ciascuno dei dNTP; 1,5 U di *Taq* DNA polimerasi (Promega, Madison, WI-USA), acqua ultrapura sino a 25 μl

*Condizioni di amplificazione:* 4 minuti a 94°C seguiti da 30 cicli di 30 secondi a 94°C (denaturazione), 30 secondi a 55°C (appaiamento) e 30 secondi a 72°C (estensione); seguiti da una fase finale di 7 minuti a 72°C

*Termociclatore:* Gene Amp PCR System 9700 (Perkin-Elmer, Norwalk, USA)

*Elettroforesi:* 110 minuti a 110 V; gel di agarosio all'1,5% (w/v)

*Visualizzazione:* UV dopo colorazione in bromuro di etidio.

## 7 - Nested-PCR (Whiteman *et al.*, 2002)

*Materiale:* terreno (30 g)

*Estrazione DNA:* fenolo-cloroformio modificato (Ridgway e Stewart, 2000)

- **Prima amplificazione**

*Reazioni di amplificazione:* 1 μl di DNA bersaglio; 20 mM Tris-HCl (pH 8,0); 50 mM KCl; 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 pmoli di ciascuno dei due primer; 0,2 mM di ciascuno dei dNTP; 1,25 U di *Taq* DNA polimerasi (Roche Diagnostics NZ Ltd.); acqua ultrapura a 25 μl

*Condizioni di amplificazione:* 3 minuti a 94°C seguiti da 30 cicli di 30 secondi a 94°C (denaturazione), 30 secondi a 50°C (appaiamento) e 30 secondi a 72°C (estensione); seguiti da una fase finale di 7 minuti a 72°C

- **Seconda amplificazione**

*Reazioni di amplificazione:* 1 μl prodotto PCR diluito a 1:200; 20 mM Tris-HCl (pH 8,0); 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 pmoli di ciascuno dei due primer; 0,2 mM di ciascuno dei dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP); 1,25 U di *Taq* DNA polimerasi (Roche Diagnostics NZ Ltd.); acqua ultrapura a 25 μl

*Condizioni di amplificazione:* 3 minuti a 94°C seguiti da 35 cicli di 30 secondi a 94°C (denaturazione), 30 secondi a 57°C (appaiamento) e 30 secondi a 72°C (estensione); seguiti da una fase finale di 7 minuti a 72°C

*Termociclatore:* Eppendorf® Mastercycler® Gradient Machine

*Elettroforesi:* gel di agarosio all'1% (w/v)

*Visualizzazione:* UV dopo colorazione in bromuro di etidio.

## 8 - Primer genere-specifici (Dubrovsky e Fabritius, 2007)

*Materiale:* 0,1-0,2 g di xilema di vite o micelio

*Estrazione DNA:* in 5 ml di tampone di estrazione (Osman e Rowhani, 2006)

*Reazioni di amplificazione:* 2 μl di DNA bersaglio; tampone 1 × PCR; soluzione 1 × saccarosio rosso (2% saccarosio, 0,1 mM rosso creolo); 0,5 μM di entrambi i primer; 5 mM DTT; 1,24 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM dNTP; 0,5 U *Taq* DNA polimerasi; acqua ultrapura a 25 μl

*Condizioni di amplificazione:* 4 minuti a 94°C seguiti da 35 cicli di 30 secondi a 94°C (denaturazione), 45 secondi a 56°C (appaiamento) e 60 secondi a 72°C (estensione); seguiti da una fase di estensione finale di 5 minuti a 72°C

*Elettroforesi:* gel di agarosio all'1,5% (w/v) in 1 × TBE

*Visualizzazione:* UV dopo colorazione in bromuro di etidio.

## 9 - PCR con primer specie-specifici (Nascimento *et al.*, 2001)

*Materiale:* tessuti legnosi o micelio

*Estrazione DNA:* Cenis (1992) modificato

*Reazioni di amplificazione:* 100 ng di DNA bersaglio; 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl (pH 9); 0,1 % Triton X-100; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 μM di entrambi i primer; 100 μM di ciascuno dei dNTP (GIBCO-BRL, Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD-USA); 1,25 U *Taq* DNA polimerasi (Promega Corporation, Madison, WI-USA); acqua ultrapura a 25 μl

*Condizioni di amplificazione:* 3 minuti a 95°C seguiti da 30 cicli di 30 secondi a 94°C (denaturazione), 30 secondi a 60°C (appaiamento) e 60 secondi a 72°C (estensione) e da una fase di estensione finale di 10 minuti a 72°C

*Elettroforesi:* gel di agarosio al 2% (w/v) in 0,5 × TBE

*Visualizzazione:* UV dopo colorazione in bromuro di etidio.

## 10 - Nested-PCR con primer specie-specifici (Nascimento *et al.*, 2001)

*Materiale:* tessuti legnosi o micelio

*Estrazione DNA:* Cenis (1992) modificato

- **Prima amplificazione**

*Reazioni di amplificazione:* 100 ng DNA bersaglio; 10 mM Tris-HCl (pH 8,3); 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 400 mM dNTP; 1 mM di entrambi i primer; 1,25 U di *Taq* DNA polimerasi (Promega Corporation, Madison, WI-USA); acqua ultrapura a 25 μl

*Condizioni di amplificazione:* 3 minuti a 95°C seguiti da 30 cicli di 30 secondi a 92°C (denaturazione), 30 secondi a 55°C (appaiamento) e 1 minuti a 72°C (estensione); seguiti da una fase finale di 10 minuti a 72°C

- **Seconda amplificazione**

*Reazioni di amplificazione:* 100 ng di DNA bersaglio; 50 mM KCl; 10 mM tris-HCl (pH 9); 0,1% Triton X-100; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 μM di entrambi i primer; 100 μM di ciascuno dei dNTP (GIBCO-BRL, Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD-USA); 1,25 U *Taq* DNA polimerasi (Promega Corporation, Madison, WI-USA); acqua ultrapura a 25 μl

**Condizioni di amplificazione:** 3 minuti a 95°C seguiti da 30 cicli di 30 secondi a 94°C (denaturazione), 30 secondi a 60°C (appaiamento) e 60 secondi a 72°C (estensione) e da una fase di estensione finale di 10 minuti a 72°C

**Elettroforesi:** gel di agarosio all'1,5% (w/v) in 1 × TBE

**Visualizzazione:** UV dopo colorazione in bromuro di etidio.

### 11 - PCR con primer specie-specifici (Lardner *et al.*, 2005)

**Materiale:** micelio

**Estrazione DNA:** Rogers e Bendich (1985), modificato

**Reazioni di amplificazione:** 25 ng di DNA bersaglio; 500 mM KCl; 100 mM Tris-HCl (pH 9); 1% Triton X-100; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 2% di polivinil-pirrolidone (MW 10.000); 30 ng di entrambi i primer (Operon Technologies); 200 μM di ciascuno dNTP (Roche Diagnostics); 1 U *Taq* DNA polimerasi (Promega Corporation, Madison, WI-USA); acqua ultrapura a 25 μl

**Condizioni di amplificazione:** 2 minuti a 94°C seguiti da 37 cicli di 30 secondi a 94°C (denaturazione), 30 secondi a 65°C (appaiamento) e 60 secondi a 72°C (estensione) e da una fase di estensione finale di 10 minuti a 72°C.

**Elettroforesi:** gel di agarosio allo 1,2% (w/v) in 1 × TBE

**Visualizzazione:** UV dopo colorazione in bromuro di etidio.

## V.2 Caratterizzazione di quattro nuove specie di *Phaeoacremonium* isolate da piante di vite

S. Essakhi, L. Mugnai\*, P.W. Crous, J.Z. Groenewald, G. Surico

### V.2.1 Introduzione

Una collezione di 118 isolati fungini provvisoriamente riferiti al genere *Phaeoacremonium* sono stati esaminati in dettaglio e classificati a livello specifico sulla base delle loro caratteristiche morfologiche e molecolari (vedi Essakhi *et al.*, 2008, di cui è qui riportato un estratto). Gli isolati sono stati perlopiù ottenuti da viti dell'età di 100 anni e oltre prelevate in Italia (Sicilia, Sardegna, e Toscana), da viti spontanee (Toscana) e da viti provenienti da altri Paesi: Croazia, Grecia, Ungheria, Israele, Turchia e Stati Uniti d'America.

Tutti gli isolati sono stati esaminati per le loro caratteristiche morfologiche (morfologia dei conidiofori; tipo e dimensione delle fialidi; forma e dimensione dei conidi); colturali (colore della colonia su estratto di malto, produzione di pigmenti gialli su agar-patata-destrosio e agar avena); per la velocità di crescita a 25°C e per la temperatura massima e minima di crescita. Indagini di tipo molecolare, associate alle altre di cui sopra, hanno portato alla suddivisione dei ceppi in 13 specie diverse di *Phaeoacremonium* di cui 9 già note e 4 nuove. Delle nove specie già note, tre (*P. alvesii*, *P. griseorubrum* e *P. rubrigenum*) sono state isolate per la prima volta da vite. Nuove per l'Italia sono risultate: *P. viticola* e *P. scolyti*; per l'Ungheria e la Croazia, *P. mortoniae*. Le quattro nuove specie sono state denominate *P. croatiense*, *P. hungaricum*, *P. sicilianum* e *P. tuscanum*. Di seguito sono descritte le loro principali caratteristiche.

### ■ *Phaeoacremonium croatiense* Essakhi, Mugnai, Surico & Crous, sp. nov. – MycoBank MB506947

Specie isolata da *Vitis vinifera* in Croazia.

#### Strutture aeree in vitro su MEA

*Micelio* costituito da ife ramificate, settate, singole o in fasci di 4 ife al massimo; verrucolose con prominenze fino a 0,5 μm, da subialine a marrone pallido, larghe 2-3 μm. *Conidiofori* per lo più di lunghezza media, di solito non ramificati, che partono da ife aeree o sub-emergenti, erette o flessuose, fino a 5-settate, che spesso terminano con una singola fialide, subialine o lievemente marroni, più chiare verso l'apice, lisce fino a verrucolose, lunghe (10)16-23(48) (media 19) μm e larghe (2)2,5(3) (media 2,5) μm. *Fialidi*, terminali o laterali, prevalentemente monofialidiche, da lisce a verrucolose, ialine o subialine, con

\* Università di Firenze email: laura.mugnai@unifi.it

collaretti lunghi 1,5-2 µm, larghi 1-1,5 µm; fialidi di tipo I predominanti, per lo più cilindriche o subcilindriche, oppure allungate ampolliformi, attenuate alla base, (6)11-13(15) × (1,5)2,5(3) (media 12 × 2,5) µm; fialidi di tipo II normalmente subulate, alcune navicolari, assottigliate verso l'apice, (10)15-19(20) × (2)2,5(3) (media 17 × 2,5) µm. Fialidi di tipo III subcilindriche, subulate, (20)23-27(28) × 2(2,5) (media 24 × 2) µm. *Conidi* ialini, prevalentemente subcilindrici o allantoidi, alcuni cilindrici o ellissoidali, (2)3-4,5(7) × (1)1,5(2) (media 4 × 1,5) µm, L/W = 2,6. Sulla superficie o semisommerse nell'agar: *fialidi* ialine, per lo più cilindriche fino a subcilindriche, (2)5-8(12) × (1,5)2(3) (media 7 × 2) µm. *Conidi* ialini, subcilindrici, o allantoidi, (4)6-7(9) × (1)2 (media 6,5 × 2) µm, L/W = 3,25.

#### Caratteristiche colturali

Colonie che in piastra raggiungono un raggio di 10 mm dopo 8 giorni a 25°C. Temperatura per l'accrescimento: minima 12°C, ottima 27°C, massima 33°C. Colonie su MEA rase, cotonose, con margine intero; dopo 16 giorni, superiormente di colore olivaceo o grigio chiaro fino a bianco, sul retro da arancio a bianco giallastro. Colonie su PDA piatte, da brevemente lanose a feltrose, con margine intero. Dopo 16 giorni colonie di color grigio fumo fino a grigio pallido o olivaceo nella parte superiore, bianco verso i margini, grigio marroncino sul retro. Colonie su OA piatte, feltrose, con margine intero, dopo 16 giorni da grigio-olivaceo a biancastro verso il margine; sul retro della colonia grigio-olivaceo pallido e bianco giallastro verso il margine.

#### Campione esaminato

CROAZIA, Moslavina, Voloder, isolato da porzione di branca di *Vitis vinifera* (cv. Škrlet) mostrante necrosi e striature nere. Giugno 2007, B. Cvetkovic, olotipo CBS H-20120, coltura ex-tipo CBS 123037.

**Note** - Filogeneticamente simile a *P. mortoniae*, ma con colonie olivaceo-grige su agar malto (MEA), prive di pigmento giallo su agar avena (OA).

#### ■ *Phaeoacremonium hungaricum* Essakhi, Mugnai, Surico & Crous, sp. nov.

##### – MycoBank MB506948

Specie isolata da *Vitis vinifera* in Ungheria.

#### Strutture aeree in vitro su MEA

*Micelio* composto da ife ramificate, settate, singole o in fasci di 14 ife al massimo, da subialine a marrone, lisce, occasionalmente verrucolose, larghe 1-3,5 µm. *Conidiofori* per lo più corti, di solito non ramificati, che partono da ife aeree o semisommerse, erette, semplici, fino a 2-settate, che spesso terminano in una singola fialide, da subialina a marrone, più chiara verso l'apice, da liscia a verrucolosa, lunga (20)26-30(36) (media 27) µm e larga (2-2,5(3) (media 2,5) µm. *Fialidi* terminali o laterali, prevalentemente monofialidiche, lisce fino a verrucolose, in genere subialine, a volte marrone chiaro, collaretto lungo 1 µm, largo 1,5 µm; fialidi di tipo I predominanti, allungate, ampolliformi, attenuate alla base, o costrette, quasi cilindriche, (3)7-12(15) × (1)2,5(3) (media 7 × 2,5) µm; fialidi di tipo II navicolari o subulate, subcilindriche, affusolate verso l'apice, (9)12-15(20) × (1,5)2,5(3) (media 13 × 2,5) µm. *Conidi* ialini, per lo

più subcilindrici o cilindrici, spesso allantoidi, (3)4-5(6) × (1,5)2 (media 4,5 × 2) µm, L/W = 2,25. Sulla superficie o semisommerse nell'agar: *fialidi* ialine, cilindriche o subcilindriche, occasionalmente navicolari, (2)7-11(15) × (1,5)2(3) (media 9 × 2) µm. *Conidi* ialini, cilindrici, subcilindrici o allantoidi (3)5-7,5(12) × (1)2,5(3) (media 6,5 × 2) µm, L/W = 3,75.

#### Caratteristiche colturali

Colonie che raggiungono in piastra un raggio di 10 mm dopo 8 giorni a 25°C. Temperatura minima di crescita 10°C, *optimum* 27°C, massimo 33°C. Colonie su MEA piatte, lanose, con margine intero; dopo 16 giorni, di colore giallo biancastro fino a biancastro, marrone scuro fino ad arancio chiaro sul retro. Colonie su PDA piatte, feltrose, con margine intero, dopo 16 giorni color beige o biancastro grigio olivaceo, bianco verso il margine superiore. Colonie su OA feltrose, con margine intero, dopo 16 giorni da verdastro olivaceo a bianco verso il margine; verdastro olivaceo nella parte superiore, olivaceo grigio nel retro.

#### Campione esaminato

UNGHERIA, isolato da *Vitis vinifera* con sintomi fogliari e interni di esca (necrosi e striature brune) proveniente da un vecchio vigneto, giugno 2007, B.T. Dula, olotipo CBS H-20119, coltura ex-tipo CBS 123036.

**Note** - Filogeneticamente si raggruppa insieme a *P. mortoniae*. Comunque può essere distinto in base ai suoi conidiofori che sono per la maggioranza ridotti a fialidi. Il micelio aereo ha un numero abbondante di fialidi, che sono di forma allungata, ampolliforme.

#### ■ *Phaeoacremonium sicilianum* Essakhi, Mugnai, Surico & Crous, sp. nov.

##### – MycoBank MB506949

Specie isolata da *Vitis vinifera* in Sicilia (fig. 1).

#### Strutture aeree in vitro su MEA

*Micelio* costituito da ife ramificate, settate, presenti singolarmente o in fasci fino a 5; tubercolate con protuberanze di diametro anche di 1 µm, da lisce a verrucolose, marrone medio o molto chiaro, larghe 1,5-3 µm. *Conidiofori* per lo più brevi e ramificati, occasionalmente non ramificati, che partono da ife aeree o parzialmente emerse, erette, con 4 setti al massimo, spesso portanti una fialide terminale e una laterale, da bruno pallida a subialina, più chiara verso la punta, da liscia a verrucolosa, lunga (15)22-47(68) (media 35) µm e larga (1,5)2,5(3) (media 2,5) µm. *Fialidi* terminali o laterali, prevalentemente monofialidiche, da lisce a verrucolose, ialine, occasionalmente di color marrone chiaro, collaretti lunghi 1,5-3 µm, larghi 1-2 µm; fialidi di tipo I, da cilindriche a subcilindriche, affusolate all'apice e spesso più larghe alla base, (4)9-12(17) × (1)2(3) (media 9 × 2) µm; fialidi subulate di tipo II, subcilindriche, che si affinano verso l'apice, (9)15-18(23) × (1,5)2,5(3) (media 18 × 2,5) µm. Fialidi di tipo III subcilindriche, navicolari, (20)23-27(28) × 2(2,5) (media 25 × 2) µm. *Conidi* ialini, perlopiù allantoidi, subcilindrici (3)4-6(10) × 1,5-2(2,5) (media 5 × 2) µm, L/W = 2,5. Sulla superficie o semisommerse nell'agar: *fialidi* ialine, da cilindriche a subcilindriche, (3)4-13(17) × 2,5 (media 6 × 2) µm. *Conidi* ialini, principalmente allantoidi, alcuni subcilindrici (3,5)6-8(11) × 1,5 (2) (media 7 × 2) µm, L/W = 3,5.

**Caratteristiche colturali**

Colonie in piastra che raggiungono un raggio di 12 mm dopo 8 giorni a 25°C. Temperatura minima di accrescimento 15°C, ottima 27°C, massima 33°C. Colonie su MEA piatte, cotonose, con margine intero; dopo 16 giorni, da color seppia grigiastro chiaro a beige verso il margine, da marrone a arancio chiaro sul retro. Colonie su PDA piatte, da cotonose a lanose, con margine intero, dopo 16 giorni colonie marrone chiaro o grigio fumo, olivaceo-grige sul

retro. Colonie su OA piatte, da feltrose a polverulente, con margine intero; dopo 16 giorni da grigio fumo a olivaceo chiaro, da olivaceo grigio a grigio topo chiaro sul retro.

**Campione esaminato**

ITALIA, Sicilia, Milazzo (ME), isolate dai margini necrotici a da striature bruno nere di branche tronchi e tralci di viti molto vecchie che mostravano sintomi esterni di esca, Maggio 2007, L. Mugnai, olotipo CBS H-20118, coltura ex-tipo CBS 123034.

**Note** - L'analisi della sequenza del DNA ha rivelato che questa specie ha anticipato altre specie di *Phaeoacremonium*. Secondo i caratteri morfologici, *P. parasiticum* e *P. inflatipes* sono simili a *P. sicilianum* per la predominanza di conidiofori ramificati. Comunque, *P. parasiticum* si distingue da *P. sicilianum* per le sue ife marroni scure, per le evidenti protuberanze ifali di dimensioni fino a 3 µm diam, mentre *P. sicilianum* può essere distinto da *P. inflatipes* per la predominanza di fialidi del tipo I e II, in confronto alla predominanza delle fialidi di tipo III in *P. inflatipes* e per la differenza nel colore delle colonie.

■ ***Phaeoacremonium tuscanum* Essakhi, Mugnai, Surico & Crous, sp. nov.**  
 – MycoBank MB506950

Specie isolata da *Vitis vinifera* in Toscana (fig. 2).

**Strutture aeree in vitro su MEA**

*Micelio* composto di ife ramificate, settate, che si trovano in fasci anche di 22 ife; tubercolate con protuberanze fino a 1 µm in diam, da lisce a verrucolose, da marrone medio a subialine, e larghe 1,5-2,5 µm. *Conidiofori* generalmente brevi e di solito non ramificati, occasionalmente ramificati, che partono da ife aeree o semisommerse, diritte, semplici, fino a 3-settate, di solito portanti una fialide terminale, da marrone chiara a subialina, più chiara verso l'apice, da liscia a verrucolosa, lunghezza (13)25-30(40) (media 28) µm e larghezza (1,5)2(2,5) (media 2) µm. *Fialidi* terminali o laterali, normalmente monofialidiche, da lisce a verrucolose, da marrone chiaro a ialine, collaretto lungo 1,5-3 µm, largo 1-1,5 µm; fialidi di tipo II predominanti, fialidi di tipo I subcilindriche, occasionalmente più larghe alla base, (4)9-11(17) × (1,5)2(2,5) (media 10,5 × 2) µm; fialidi di tipo II subulate, navicolari o subcilindriche, attenuate alla base e appuntite all'apice, (8)13-15(20) × 1,5-2(3) (media 14 × 2) µm. Fialidi di tipo III subcilindriche, subulate (20)21-23(25) × 2-(2,5) (media 22 × 2) µm. *Conidi* ialini, prevalentemente allantoidi, subcilindrici o cilindrici, ellissoidali (2,5)4(5,5) × (1,5)2 (media 4 × 2) µm, L/W = 2. Sulla superficie o semisommerse nell'agar: *fialidi* ialine, subcilindriche, 4-9(14) × 1(2) (media 6 × 1) µm. *Conidi* ialini, subcilindrici o allantoidi, 2,5-5(8,5) × (1)2(3) (media 5 × 2) µm, L/W = 2,5.

**Caratteristiche colturali**

Colonie in piastra con un raggio di 8 mm dopo 8 giorni a 25°C. Temperatura minima per la crescita 12°C, *optimum* 33°C, massimo 37°C. Colonie su MEA piatte, cotonose, con margine intero; dopo 16 giorni, colonie da marrone chiaro a beige verso il margine, arancio chiaro sul retro. Colonie su PDA piatte, da lanose a feltrose, con il margine intero, dopo 16 giorni colonie marrone beige, arancio grigio chiaro o biancastro verso il margine, grigio seppia chiaro sul retro, che diventa biancastro verso il margine. Colonie

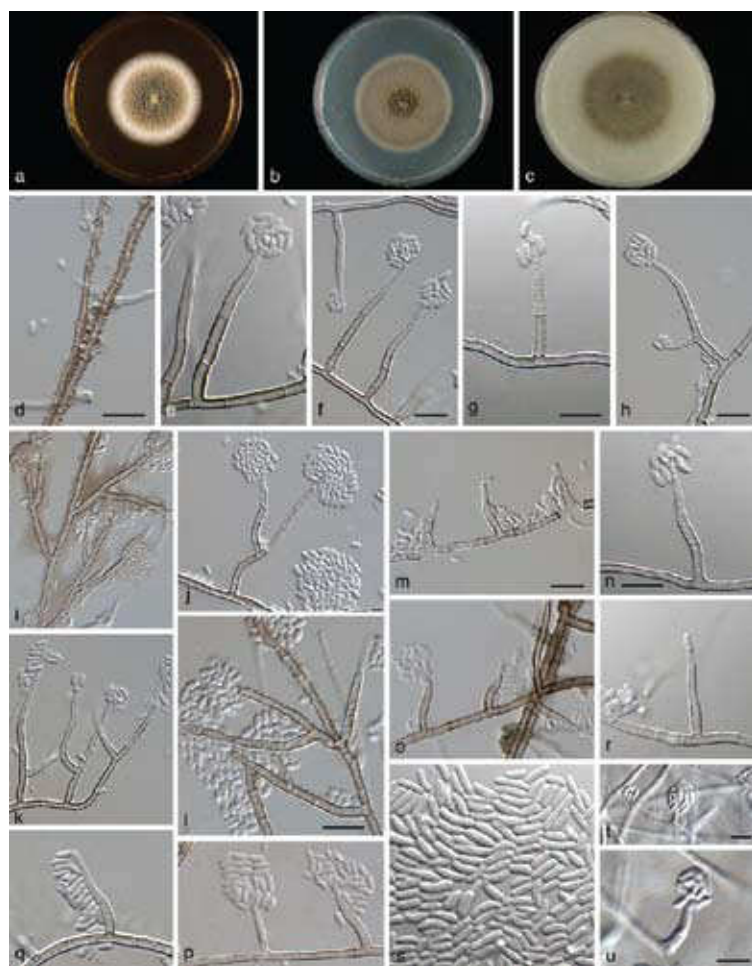


Fig. 1 - *Phaeoacremonium sicilianum*, ceppo CBS H-20118 (olotipo).

a-c: colonia cresciuta per 16 giorni su 2% MEA (a), PDA (b) e OA (c); d-s: strutture aeree su 2% MEA; d: micelio con goccioline di essudato che appaiono come protuberanze; e-h: conidiofori singoli; i-l: conidiofori ramificati; m-p: fialidi di tipo I; q: fialidi di tipo II; r: fialidi di tipo III; s: conidi; t-u: strutture che si formano sulla superficie e dentro il substrato (2% MEA): adelofialidi con conidi. Scale bar: d-u = 10 µm; la scale bar di d si applica a i-k ed e; la scale bar di n si applica a o-r. Da Essakhi et al., 2008, con l'autorizzazione dell'editore

su OA piatte, feltrose, con margine intero; dopo 16 giorni da arancio chiaro a giallo verso il margine, lo stesso sul retro; le colonie producono un pigmento giallo nell'agar.

#### Campione esaminato

ITALIA, Toscana, San Gimignano, isolato dal margine della necrosi delle branche, tronchi di *Vitis vinifera* prelevata in un vigneto di oltre 100 anni che mostrava sintomi interni di esca, Mar. 2007, L. Mugnai, olotipo CBS H-20118, coltura ex-tipo CBS 123033.

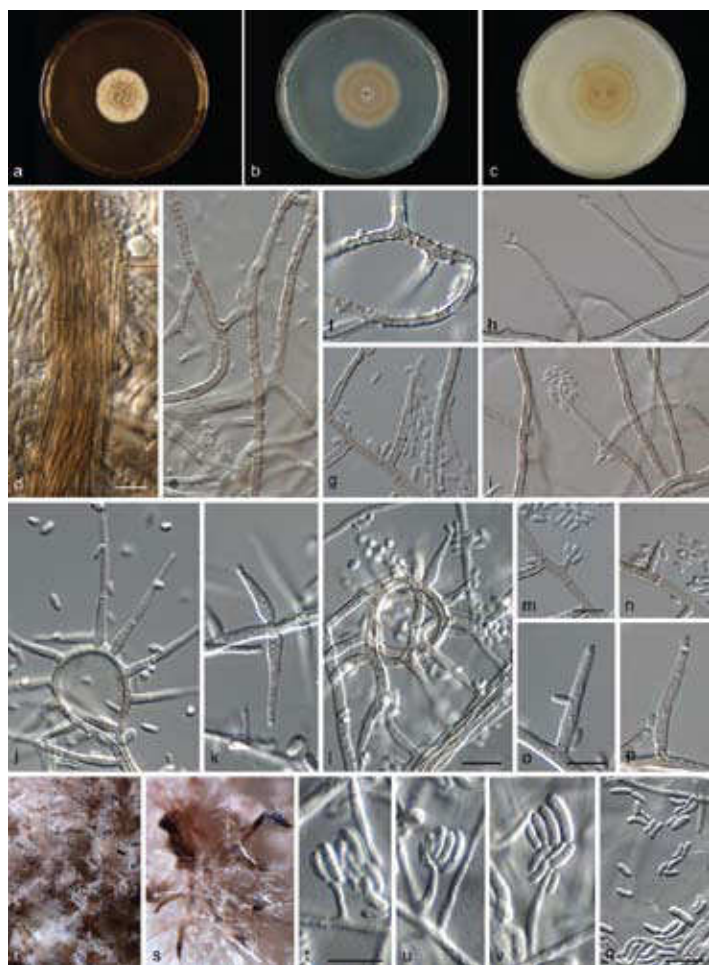


Fig. 2 - *Phaeoacremonium tuscanum*, ceppo CBS H-20118 (olotipo).

a-c: colonia di 16 giorni su 2% MEA (a), PDA (b) e OA (c). d-q: strutture aeree su 2% MEA; d: il micelio può formare fasci composti anche da 9 ife; e-f: micelio con goccioline di essudato che appaiono come protuberanze; g-j: conidiofori singoli; k-l: fialidi di tipo II; m-n: fialidi di tipo I; o-p: fialidi di tipo III; q: conidi; r-v: strutture sulla superficie e dentro il substrato (2% MEA); r-s: strutture tipo coremio; t-v: adelofialidi; r-s: DM; d-q: DIC. Scale bar: d-v = 10 µm; scale bar per d si applica a e-k e p-s; bar per m si applica a n; bar per t si applica a u-v. Da Essakhi et al., 2008, con l'autorizzazione dell'editore

**Note** - Secondo l'analisi filogenetica, *P. tuscanum* può essere considerata specie affine a *P. iranianum*. Comunque, *P. tuscanum* può essere distinto da quest'ultimo per la produzione di strutture simili a coremi su MEA, ovvero fasci di ife fertili, eretti, alti fino a 2 mm e larghi 1 mm, da marrone scuro a chiaro, composti di conidiofori che portano conidi all'apice e con una predominanza di fialidi di tipo II. Per confronto *P. iranianum* è privo di queste strutture, e ha una predominanza di fialidi del tipo III.

#### V.2.2 Conclusioni

Con le quattro qui descritte salgono a 26 le specie fungine incluse nel genere *Phaeoacremonium* (tab. I <sup>es</sup> capitolo II.1, p. 67). Nel corso della stesura di questo testo sono state descritte altre 2 specie di *Phaeoacremonium*, *P. hispanicum* e *P. cinereum* (Gramaje et al., 2009, Mycologia, 101: 920-929) portando così a 28 il numero totale di specie di questo genere isolate da vite. Di queste specie *P. parasiticum*, *P. rubrigenum* e *P. inflatipes* sono state inizialmente segnalate come agenti di feoifomicosi nell'uomo (Padhye et al., 1998; Guarro et al., 2003). *Phaeoacremonium krajdienii* e *P. venezuelense* sono state anch'esse associate a casi di feoifomicosi umane ma anche a piante di vite con sintomi di esca (Mostert et al., 2005). Tre altre specie di *Phaeoacremonium*, oltre a quelle prima menzionate, erano state isolate soltanto da infezioni dell'uomo: *P. tardicrescens*, *P. amstelodamense* e *P. griseorubrum* (Mostert et al. 2005). Tuttavia, questo studio ha rivelato che *P. griseorubrum* (oltre a *P. rubrigenum*) può anche essere presente nelle piante di vite.

Salgono così a sei le specie comuni a organismi animali e vegetali. I risultati di questo studio sembrano supportare alcune ipotesi e cioè che:

1. le specie di *Phaeoacremonium* patogene per l'uomo possano derivare da specie patogene per le piante;
2. altri studi potrebbero portare a un ulteriore aumento del numero di specie di *Phaeoacremonium*, siano esse associate a uno solo dei due organismi, sia a entrambi (ad esempio, la nuova specie *P. tuscanum*, che ha un massimo di accrescimento a 37-40°C, potrebbe essere un'altra specie in grado di infettare l'uomo);
3. che la variabilità di *Phaeoacremonium* è anche più ampia di quanto accertato da precedenti autori (Groenwald et al., 2001; Borie et al., 2002; Mostert, 2006b; Damm et al., 2008).

Dei 118 isolati considerati in questo studio, l'80% è stato riferito a *P. aleophilum* la quale, dunque, si conferma come la specie più frequentemente associata a casi di alterazioni del legno di vite.

Tutti questi dati, se confrontati con quelli, analoghi, che si riferiscono a *P. chlamydospora* (specie che ha la vite come unico ospite, almeno finora) potrebbero far pensare a un diverso ruolo di questi funghi nel mal dell'esca della vite.

## V.3 Metodiche enzimatiche e immunochimiche di diagnosi dei funghi dell'esca

A. Andolfi, A. Cimmino, A. Evidente\*, M. Iannaccone,  
R. Capparelli, L. Mugnai, G. Surico

### V.3.1 Introduzione

Per la diagnosi dei funghi dell'esca in piante o materiale di propagazione della vite sono stati anche tentati approcci diversi da quelli basati su metodologie tradizionali o molecolari. Uno di questi approcci che, però, non ha portato a risultati applicabili nella pratica, ha riguardato la dimostrazione indiretta della presenza nella vite dei funghi tracheomicotici *Pch* e *Pal* attraverso la determinazione, con metodo enzimatico, di specifici prodotti del loro metabolismo: esopolisaccaridi del tipo dei pullulani (una miscela di  $\alpha$ -glucani con differenti pesi molecolari) (Sparapano *et al.*, 1998b, Bruno e Sparapano, 2007b). In effetti, metodi di questo tipo sono frequentemente utilizzati nel settore agro-industriale per l'analisi di polisaccaridi del tipo del pullulano presenti in vari processi di lavorazione. Nel caso specifico lo scopo era quello di giungere a un kit diagnostico semplice, applicabile anche in azienda senza l'ausilio di attrezzature particolari e senza la necessità di distruggere la pianta o di praticare in essa azioni di carotaggio, basato sulla determinazione colorimetrica dei pullulani di *Pch* e *Pal* eventualmente presenti nei fluidi xilematici. I risultati non sono stati quelli desiderati (vedi di seguito).

[Parte dei dati presentati in questo lavoro sono stati pubblicati in Andolfi *et al.*, 2009].

### V.3.2 Determinazione colorimetrica dei pullulani

Il metodo è stato messo a punto utilizzando, per l'idrolisi di pullulano del commercio, gli enzimi glucoamilasi e pullulanasi che idrolizzano selettivamente i legami  $\alpha$ -(1→4) e  $\alpha$ -(1→6) glucosidici tipici di tali polisaccaridi. I prodotti di idrolisi sono stati poi trattati con una ossidasi del glucosio e quindi determinati colorimetricamente alla lunghezza d'onda di 515 nm. Allorquando il metodo è stato applicato ai polisaccaridi grezzi isolati e parzialmente purificati dalla linfa di piante malate e dai filtrati colturali di *Pal*, non ha dato però, in numerosi tentativi, esito positivo. Tale risultato è stato attribuito alla esigua quantità di esopolisaccaridi prodotti dai funghi dell'esca nella pianta ospite o *in vitro* (bassa sensibilità del metodo) oppure, alla difficoltà di evidenziare i pullulani di *Pch* e *Pal* poiché la loro struttura chimica non è esattamente quella a suo tempo determinata (Sparapano *et al.*, 1998b; Bruno e Sparapano, 2007b). In effetti, di recente, sono state condotte nuove indagini chimiche e spettroscopiche sugli EPSs ottenuti dai filtrati colturali di *Pal* e *Pch*, accresciuti nelle stesse condizioni impiegate

da Sparapano e collaboratori. Queste indagini hanno evidenziato una contaminazione dei liquidi di coltura dei due funghi con polisaccaridi, anche in questo caso miscele di glucani, di pesi molecolari molto simili a quello degli EPS primariamente determinati. Questo fatto rende particolarmente difficile la loro separazione mediante le comuni tecniche di cromatografia a esclusione molecolare (soprattutto HPLC), impiegate nelle precedenti indagini. Sono attualmente in corso ulteriori studi per la completa purificazione degli EPSs di *Pch* e *Pal*, necessaria per successive e più rigorose indagini di caratterizzazione strutturale mediante l'impiego di tecniche di analisi chimiche e cromatografiche (derivatizzazione e gas-cromatografia) e tecniche spettroscopiche (essenzialmente NMR mono e bi-dimensionali del protone e del carbonio) specificamente utilizzate nello studio dei carboidrati.

### V.3.3 Saggio citofluorimetrico per il riconoscimento delle fitotossine di *Pch* e *Pal*

Un altro approccio, questa volta con esiti di sicuro interesse pratico-applicativo, ha riguardato l'applicazione di tecniche immunochimiche, ampiamente utilizzate in patologia vegetale per individuare funghi fitopatogeni, ad esempio *Botrytis cinerea* (Bossi e Dewey, 1992; Salinas *et al.*, 1994), *Verticillium* sp. (van der Koppel e Schots, 1994) e *Rhizoctonia solani* (Thornton *et al.*, 1993), in piante malate, sintomatiche e, soprattutto, asintomatiche. Nel nostro caso, tecniche immunochimiche sono state impiegate per l'individuazione in piante o parti di piante di vite dei metaboliti secondari, isosclerone, scitalone, e polisaccaridi, prodotti da *Pch* e *Pal* (Abou-Mansour *et al.*, 2004; Evidente *et al.*, 2000; Sparapano *et al.*, 2000c; Sparapano *et al.*, 1998a, 1998b; Bruno e Sparapano, 2006a, 2006b; Tabacchi *et al.*, 2000). In particolare, il saggio immunochimico impiegato è stato basato su un test citofluorimetrico consistente nel riconoscimento fitotossine-(antigeni)-anticorpi.

Il citofluorimetro è uno strumento che consente un'analisi accurata di singole cellule, ma anche di antigeni più piccoli, previo assorbimento su piccole particelle di lattice nell'ordine dei  $\mu\text{m}$  di

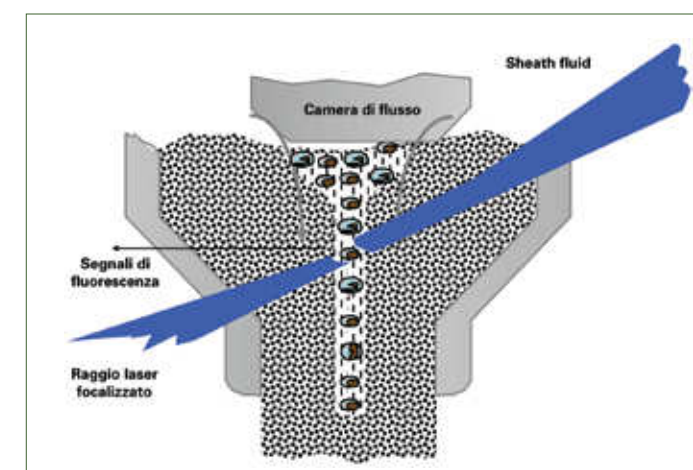


Fig. 1 - Principi generali della citofluorimetria. Le cellule o le particelle in sospensione scorrono una dietro l'altra in una camera di flusso. Un raggio laser le colpisce e la fluorescenza che emettono viene raccolta, filtrata e convertita in valori digitali analizzati mediante un software

\* Università di Napoli "Federico II" email: evidente@unina.it



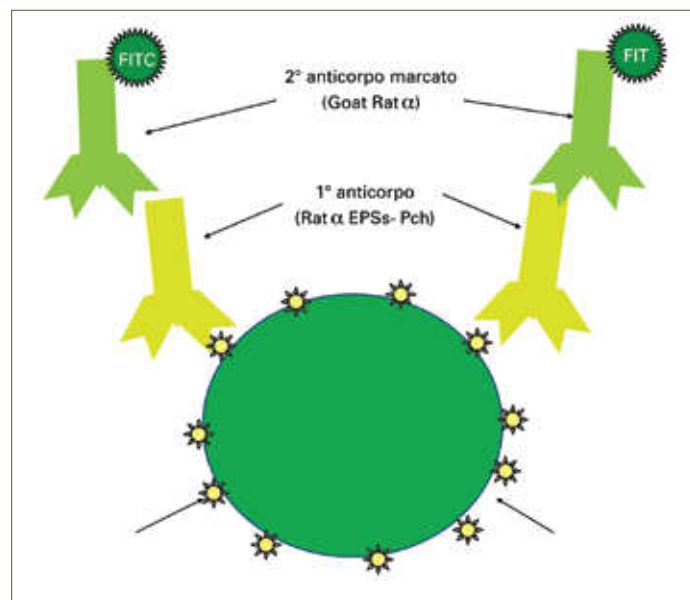


Fig. 2 - Principio alla base del test citofluorimetrico con anticorpi specifici (Rat  $\alpha$  EPSs-Pch) per gli esopolisaccaridi prodotti da *Phaeoaniella chlamydospora* (EPSs-Pch)

diametro. Le particelle sono allineate in una singola fila e sono analizzate una per una attraverso un fascio luminoso focalizzato. Una particella o una cellula colpita da un fascio luminoso focalizzato emette segnali relativi alle sue caratteristiche fisiche (diametro, volume, rapporto nucleo-citoplasma e rugosità superficiale) in base a fenomeni di rifrazione, riflessione e diffrazione (fig. 1).

Molti composti possono essere individuati mediante ligandi fluorescenti o con specifici anticorpi marcati con fluorocromi come l'isotiocianato di fluoresceina (FITC) o la ficoeritrina (PE). I segnali vengono raccolti da un sistema di lenti, specchi e filtri ottici e successivamente amplificati, digitalizzati ed elaborati (fig. 2).

Per la messa a punto del test sono stati pertanto prodotti anticorpi per lo specifico riconoscimento della frazione esopolisaccaridica (antigene) prodotta in coltura liquida da *Pch* e per il riconoscimento dello scitalone, la principale fitotossina prodotta in coltura liquida da *Pal*. Gli EPSs sono stati purificati dai filtrati colturali di *Pch* impiegando il metodo della precipitazione frazionata con etanolo a freddo ripetuta 2 volte. Il precipitato è stato ulteriormente purificato mediante dialisi in tubi di appropriato limite di esclusione.

I polisaccaridi grezzi così ottenuti sono stati utilizzati per immunizzare un ratto per successive iniezioni nel corso di 3 mesi fino a ottenere un più che soddisfacente livello di riconoscimento dell'antigene nel test citofluorimetrico (Del Sorbo *et al.*, 1994). Gli anticorpi specifici ottenuti per gli EPSs sono stati quindi utilizzati nel test citofluorimetrico per individuare la presenza di tali antigeni in estratti organici ottenuti da foglie di vite infette.

In particolare, i campioni di foglie di vite analizzati sono stati estratti con una miscela idroalcolica fornendo un estratto contenente probabilmente gli EPSs prodotti *in vivo* da *Pch*. Sono state utilizzate foglie provenienti da piante affette dal mal dell'esca e in particolare: A, foglia asintomatica in pianta asintomatica; B, foglia asintomatica in tralcio asintomatico di pianta

sintomatica; C, foglia asintomatica vicino a una foglia sintomatica sullo stesso tralcio; D, foglia asintomatica lontano da una foglia sintomatica sullo stesso tralcio; E, foglia sintomatica con sintomi iniziali (prima comparsa di ingiallimenti e aree necrotiche); F, foglia sintomatica in parte decolorata ma non necrotica (tab. 1).

La misura dello spettro di assorbimento UV-Vis effettuata su tali estratti ha escluso eventuali interferenze con i fluorocromi normalmente impiegati nel test citofluorimetrico, mostrando massimi di assorbimento inferiori a 400 nm (tab. 1).

Infatti, i fluorocromi come l'FITC o la PE posseggono un massimo di assorbimento di 494 e 480-565 nm rispettivamente, e una lunghezza d'onda di emissione pari a 518 e 578 nm, rispettivamente.

Le particelle di lattice sono state opportunamente incubate con l'antigene (EPSs-*Pch*) per favorirne l'assorbimento e successivamente lavate con un opportuno tampone. Le stesse sono state incubate successivamente con gli anticorpi prodotti contro gli EPSs (1° anticorpo), lavate e infine incubate con anticorpi anti-immunoglobuline di ratto marcati con FITC (2° anticorpo) (fig. 2).

Gli anticorpi prodotti hanno mostrato un'alta specificità. Infatti, nello stesso test non si è avuto nessun riconoscimento utilizzando EPSs isolati dai due funghi fitopatogeni *Phomopsis foeniculi* e *Phoma exigua* var. *heteromorpha*. Questi ultimi polisaccaridi sono risultati essere una miscela di galattano e mannano ramificato (Corsaro *et al.*, 1998) e un polisaccaride fosforilato contenente il 70% di mannosio e basse percentuali di galattosio e glucosio (Evidente *et al.*, 1997), rispettivamente, e quindi verosimilmente strutturalmente differenti dagli EPSs prodotti da *Pch*.

Tab. 1 - Campioni di foglie sintomatiche, asintomatiche e sane provenienti da viti malate e sane con gli estratti etanolici ottenuti e i relativi assorbimenti UV

Vite n.	Campione***	Peso delle foglie (g)	Estratto etanolico (mg)	Assorbimento UV (nm)
44*	44 B	0,80	43,6	253, 344
	44 D	0,90	40,0	256, 345
	44 E	0,82	31,6	253, 343
	44 F	0,76	37,5	253, 344
47*	47 B	0,63	28,3	256, 346
	47 C	0,59	17,8	265, 331
58*	58 B	0,56	22,6	266, 344
	58 C	0,76	42,5	253, 345
	58 D	0,75	28,0	252, 336
	58 E	0,64	35,1	254, 344
	58 F	0,65	36,0	252, 343
141*	141 C	1,40	404,1	254, 333
	141 E	0,77	44,5	263, 348
	141 F	1,20	99,1	253, 341
1**	1 A	1,10	35,1	254, 343

\* = Sintomatico; \*\* = Asintomatico; \*\*\* A = foglia asintomatica in pianta asintomatica; B = foglia asintomatica in tralcio asintomatico in pianta malata; C = foglia asintomatica vicino a una foglia sintomatica sullo stesso tralcio; D = foglia asintomatica lontano da una foglia sintomatica sullo stesso tralcio; E = foglia sintomatica con sintomi iniziali (piccoli ingiallimenti e aree necrotiche); F = foglia sintomatica in parte decolorata ma non necrotica.

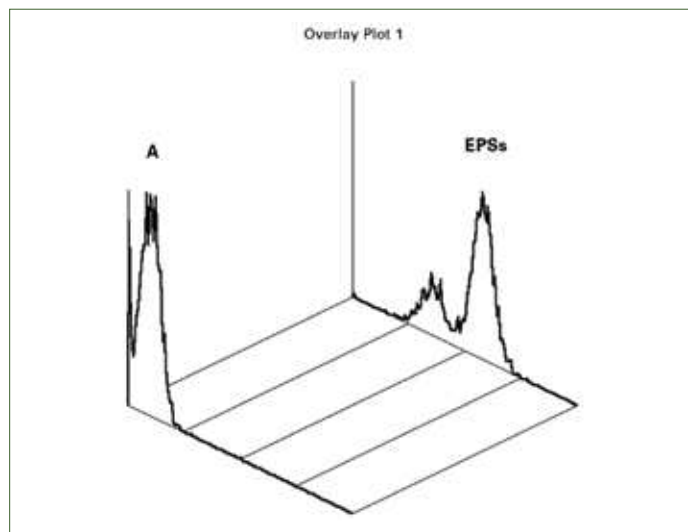


Fig. 3 - Profilo citofluorimetrico degli esopolisaccaridi (EPSs) prodotti da *Phaeoemoniella chlamydospora* e dell'estratto ottenuto da una foglia di vite asintomatica proveniente da un tralcio asintomatico in pianta asintomatica (A). Ascissa: Canale medio di fluorescenza. Ordinata: numero di particelle

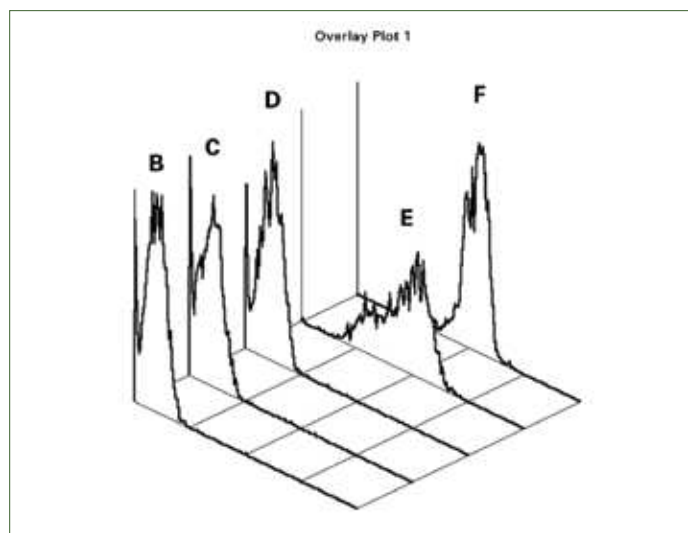


Fig. 4 - Profilo citofluorimetrico di estratti di foglie (vite n. 58) di: B, foglia asintomatica in tralcio asintomatico in pianta sintomatica; C, foglia asintomatica vicino a una foglia sintomatica sullo stesso tralcio; D, foglia asintomatica lontano da una foglia sintomatica sullo stesso tralcio; E, foglia sintomatica con sintomi iniziali (piccoli ingiallimenti e aree necrotiche); F, foglia sintomatica in parte decolorata ma non necrotica

Il massimo della risposta nel test citofluorimetrico è stato osservato per l'antigene puro (EPSs-*Pch*), seguita da una risposta significativa ottenuta per gli estratti di foglie sintomatiche. La risposta per gli estratti ottenute da foglie asintomatiche e sane è stata paragonabile a quella del controllo (figg. 3-4).

Per la produzione di anticorpi contro le fitotossine a basso peso molecolare, in particolare lo scitalone, è stato necessario macromolecolarizzare la tossina con un opportuno carrier proteico. A tale scopo lo scitalone è stato purificato dal filtrato colturale di *Pal* mediante cromatografia su colonna e TLC (Thin Layer Chromatography). Il metabolita è stato successivamente coniugato ai

gruppi ε-amminici dei residui lisinici della BSA e il legame è stato covalentemente stabilizzato per riduzione della base di Shift (fig. 5) ottenendo un derivato con attività antigenica (BSA-SCI).

Una conferma dell'avvenuta reazione è stata ottenuta mediante l'analisi degli amminoacidi condotta previa idrolisi acida su tale derivato in paragone con un campione di BSA. Tale indagine ha evidenziato una diminuzione dei residui di lisina nella BSA-SCI rispetto alla proteina non trattata.

La BSA-SCI è stata quindi utilizzata per immunizzare un ratto impiegando la stessa procedura applicata per gli EPSs. Gli anticorpi così ottenuti non hanno dato però un soddisfacente livello di riconoscimento per lo scitalone nel test citofluorimetrico. Tale risultato potrebbe essere legato all'incapacità dello scitalone di essere adsorbito alle particelle di lattice, che, come visto precedentemente, rappresenta la prima fase dell'analisi citofluorimetrica. In alternativa, non si può escludere che lo scitalone (e l'isosclerone) fossero assenti nel materiale esaminato, diversamente da quanto di recente accertato da Bruno e Sparapano (2006b) sempre mediante l'impiego di HPLC. A quest'ultimo riguardo c'è da aggiungere che l'applicazione di più sofisticate tecniche di analisi (in particolare GC-MS), applicate all'estratto di foglie di vite con sintomi di esca, hanno, solo in qualche caso, evidenziato la presenza in tracce di naftochinoni (scitalone e isosclerone) imputabili a *Pch* o *Pal*.

### V.3.4 Conclusioni

I risultati delle indagini svolte hanno messo in evidenza alcuni fatti essenziali riguardanti l'esca e utili per il proseguimento delle indagini sulla malattia. Tali fatti si possono così riassumere:

1. *Pch* e *Pal* sembrano produrre esopolisaccaridi di struttura diversa da quella dei pullulani in precedenza determinati da altri autori;
2. i polisaccaridi prodotti da *Pch* sembrano diversi da quelli prodotti da *Pal*;
3. gli esopolisaccaridi di *Pch* si accumulano nelle foglie di vite durante il processo infettivo; ciò sembra indicare un coinvolgimento di tali sostanze nella formazione dei sintomi fogliari;
4. le altre tossine di *Pch* e *Pal*, scitalone e isosclerone, che non sembra si accumulino nelle foglie, potrebbero invece esplicare la loro azione nel sito di formazione (vasi xilematici), e quindi avere un ruolo negli imbrunimenti del legno;
5. il metodo immunochimico, validato per la diagnosi indiretta di *Pch* e *Pal*, potrà essere utilizzato per studi sui meccanismi di formazione dei sintomi fogliari.

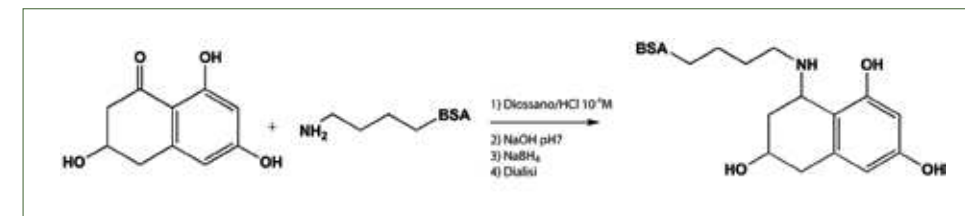


Fig. 5 - Reazione di coniugazione tra lo scitalone e la Siero Albumina Bovina (BSA)

## V.4 Rintracciabilità di un fungo nei tessuti della pianta: il caso di *Phaeoconiella chlamydospora* trasformata con la proteina verde fluorescente sintetica (sGFP)

L. Landi\*, S. Murolo, G. Romanazzi

### V.4.1 Introduzione

Il legno di piante di vite è frequentemente, se non normalmente, colonizzato, anche nelle prime fasi di vita delle piante, da una congerie di microrganismi diversi: batteri e, soprattutto, funghi, incluso i due agenti tracheomicotici dell'esca, *Phaeoconiella chlamydospora* (*Pch*) e *Phaeoacremonium aleophilum* (*Pal*). In tale situazione diventa difficile seguire, nel caso di inoculazioni artificiali di *Pch* e *Pal*, l'evoluzione dei due funghi separatamente da quella degli stessi funghi già presenti, eventualmente, nella pianta inocolata. Pertanto, è stato messo a punto un metodo che consente di studiare in maniera selettiva la diffusione di *Pch* e di indagarne la colonizzazione dei tessuti della pianta. Con questa finalità si è proceduto ad associare, tramite trasformazione genetica di protoplasti di *Pch*, una proteina che potesse consentire lo studio della colonizzazione dell'ospite. È stata scelta la proteina verde fluorescente sintetica (*synthetic Green Fluorescent Protein* = sGFP), che per le sue caratteristiche di neutralità e stabilità *in vivo*, consente di 'etichettare' gli individui e identificarli in sistemi complessi. Considerata l'importanza che *Pch* ricopre nell'eziologia della malattia, nell'ambito del progetto "Ricerca e sperimentazione in vivaio e in campo per il contenimento del mal dell'esca della vite" (ME-SVIT), è stata indagata la diversa colonizzazione di varietà di *Vitis vinifera* e di portinnesti, artificialmente inoculati con un isolato di *Pch* trasformato con il gene *sgfp*.

### V.4.2 Tecniche di trasformazione

Una breve introduzione sulle metodiche più comunemente usate nella trasformazione genetica dei funghi filamentosi potrebbe essere utile alla comprensione del lavoro svolto. Concettualmente la trasformazione genetica è il meccanismo con cui un frammento di DNA esogeno viene inserito direttamente nella cellula, la quale deve essere competente, ossia deve essere in grado di accettare il frammento e di essere trasformata. Esistono diversi metodi che si possono applicare per la trasformazione di funghi filamentosi, ognuno con un grado di efficienza che è anche funzione della specie trattata:

1. *trattamento di cellule protoplastiche con glicole polietilenico (PEG)*: questa molecola, interagendo con i fosfolipidi della membrana plasmatica, ne incrementa la permeabilità facilitando

l'ingresso di DNA esogeno. È uno dei metodi più utilizzati nella trasformazione dei funghi filamentosi (Riach e Kinghorn, 1996) e garantisce un'ottima efficienza di trasformazione, indipendentemente dalla specie fungina. Tuttavia, il successo dell'esperimento è legato all'ottenimento di protoplasti integri e vitali, non sempre facili da ottenere;

2. *elettroporazione*: consiste nel sottoporre le cellule a un campo elettrico di breve durata per creare pori transitori nella membrana plasmatica (Fincham, 1989). Richiede l'ottimizzazione di due variabili: l'intensità del campo elettrico e la durata del trattamento. In relazione a queste due variabili le molecole di DNA possono penetrare più o meno frequentemente. Con questa tecnica è possibile trasferire un plasmide da una cellula a un'altra;
3. *metodo biobalistico*: questa tecnica consiste nello sparare con appositi apparecchi (*particle guns*) su tessuti bersaglio il DNA esogeno che si vuole introdurre o altre particelle biologiche (RNA, virus, batteri). Il DNA viene adeso a un veicolo solido fisicamente capace di attraversare la parete cellulare. I fori prodotti devono essere sufficientemente piccoli perché le cellule non subiscano danni irreparabili. Attualmente si utilizzano microparticelle d'oro, che si sparano grazie a un sistema che sfrutta la depressurizzazione brusca di un gas inerte compresso, generalmente elio; questa tecnica necessita di particolari e costose strumentazioni, presenti solo in laboratori altamente specializzati (Forbes *et al.*, 1998; Mourad *et al.*, 2004; Aboul-Soud *et al.*, 2004);
4. *trasformazione mediata da Agrobacterium tumefaciens*: si basa sulla proprietà del batterio fitopatogeno *A. tumefaciens* di integrare una parte del proprio DNA (plasmide o T-DNA) nel genoma nucleare delle cellule infettate. L'introduzione di geni esogeni nel T-DNA opportunamente modificato delle cellule di *Agrobacterium* porta all'integrazione stabile del gene di interesse nel genoma dei tessuti infettati e alla produzione di un organismo transgenico in grado di esprimere una nuova proteina transgenica. Questa metodica, comunemente usata nella trasformazione di piante, negli ultimi anni è stata utilizzata con successo anche nella trasformazione di funghi (de Groot *et al.*, 1998). La tecnica non richiede la formazione di protoplasti e mostra generalmente una buona efficienza di trasformazione, anche se spesso variabile in relazione alla specie fungina.

### V.4.3 La proteina verde fluorescente (GFP): caratteristiche biologiche e potenzialità analitiche

La GFP è una proteina fluorescente isolata da una medusa bioluminescente, *Aequorea victoria*, normalmente presente lungo le coste nordamericane dell'oceano Pacifico, dalla British Columbia alla California centrale. Appartiene al genere *Hydrozoa*, ordine Leptomedusae, famiglia Aequoreidae, gruppo Coelenterates. La GFP è stata anche isolata da *Renilla reniformis*, viola del pensiero marittima (Ward, 1998). Ha la caratteristica di convertire, tramite trasferimento di energia, la chemiluminescenza blu della proteina aequorina in luce brillante verde. La luminescenza della GFP è un fenomeno intrinseco alla stessa proteina che non richiede cofattori addizionali. È estremamente stabile *in vivo* ed essendo una proteina non invasiva in celle viventi, lascia spazio a un ampio spettro di applicazioni, nelle quali può agire come linea tracciante delle cellule e di individui nel tempo. La GFP è divenuta il reporter

\* Università Politecnica delle Marche, Ancona email: l.landini@univpm.it

di elezione in molti dosaggi cellulari, da quando è stata scoperta, oltre 40 anni fa, da Shimomura *et al.* (1962) come proteina compagna dell'aequorina. Fin dalla clonazione del suo gene (Prasher, 1992) la proteina ha assunto un ruolo importante in molti sistemi viventi: batteri, nematodi, colture cellulari (Chalfie *et al.*, 1994; Inouye e Tsuji, 1994), lieviti (Flach *et al.*, 1994; Niedenthal *et al.*, 1996), mammiferi (Pines, 1995), *Drosophila* (Wang e Hazelrigg, 1994), *Dictyostelium* (Fey *et al.*, 1995; Hodgekinson, 1995), piante (Haseloff e Amos, 1995; Sheen *et al.*, 1995), e funghi filamentosi (Spellig *et al.*, 1996; Lorang *et al.*, 2001). Di modeste dimensioni, ha come peculiarità quella, entro certi limiti, di poter modificare le sue caratteristiche spettroscopiche. La tipica colorazione verde può essere visualizzata tramite microscopia a fluorescenza. Strutturalmente si tratta di una proteina di 27 KDa ed è composta da 238 residui aminoacidici. La struttura terziaria del tipo selvatico della GFP (wtGFP) e quella di diversi mutanti ha rivelato una struttura serrata di forma cilindrica composta da 11 filamenti  $\beta$  disposti intorno a un'elica centrale (Yang *et al.*, 1996). Il cromoforo, un *r*-idrossobenzilidenemidazolinone, si forma durante un complesso processo di maturazione che comprende il ripiegamento, la ciclizzazione autocatalitica e l'ossidazione di tre residui adiacenti (Ser65- Tyr66- Gly67) che sono situati nell'elica assiale (Cubitt *et al.*, 1995). La struttura cilindrica della proteina matura conferisce stabilità e protegge il cromoforo da variazioni ambientali e tagli proteolitici. Il tipo selvatico possiede due picchi di eccitazione, uno maggiore a 395 nm e uno minore a 475 nm, che eccitando la proteina a 395 nm causa lo spegnimento abbastanza rapido della fluorescenza. Recenti ricerche hanno sviluppato varianti cromatiche della GFP, che garantiscono una espressione più specifica in relazione al genere e alla proteina oggetto di studio (Andrie *et al.*, 2005). I mutanti ottenuti hanno aumentato la fluorescenza, ma soprattutto, il picco di eccitazione maggiore è stato spostato a 490 nm, con emissione a 509 nm. Queste modifiche hanno consentito una maggiore stabilità del fluoroforo e reso possibile l'utilizzo dei più comuni filtri ottici, come quello per la fluoresceina isotiocianato (FITC ex 450-490 em 515-520), per la sua visualizzazione.

La GFP per emettere fluorescenza richiede luce ultravioletta o luce blu e ossigeno, a differenza di altri geni reporter ( $\beta$ -glucuronidasi,  $\beta$ -galatturonidasi, cloramfenicolo acetiltransferasi e firefly luciferasi), che hanno bisogno di cofattori per poter essere attivi. L'osservazione *in vivo* è possibile in tempo reale sia nelle cellule individuali, sia in popolazioni cellulari, come anche in organismi interi che interagiscono con simbionti o con l'ambiente. La proteina è stabile a 65°C, a pH compresi tra 5 e 11 e può resistere a molte proteasi. Rimane evidente anche in tessuti fissati con formaldeide, metanolo e glutaraldeide. Tuttavia, essa perde fluorescenza in soluzioni di metanolo:acido acetico e può avere la fluorescenza mascherata dall'autofluorescenza prodotta dai gruppi aldeidici nei tessuti fissati con glutaraldeide. La fluorescenza ottimale si osserva a pH 7,2-8,0. Limitazioni sono legate all'autoattivazione di 2 ore del cromoforo, all'esposizione ad alte temperature che portano a forme non fluorescenti o insolubili della proteina e alla richiesta di ossigeno, che non è presente nelle stesse concentrazioni in tutte le localizzazioni subcellulari. Sono comunque limitazioni che non inficiano l'ampia possibilità di utilizzo della proteina e sono state costruite forme mutanti in grado di resistere alle alte temperature, incrementando solubilità e fluorescenza.

#### V.4.4 La proteina 'reporter' GFP in funghi filamentosi

Numerose sono state le ricerche riguardanti i funghi che hanno coinvolto l'utilizzo della GFP. Quest'ultima si è rivelata molto utile per studi di rintracciabilità del fungo in pianta, nelle biomasse, o quando legata a proteine che giocano un ruolo nell'interazione ospite-patogeno. In particolare, sono noti studi di espressione di GFP in *Ustilago maydis* (Spellig *et al.*, 1996), *Aureobasidium pullulans* (Van den Wymelenberg *et al.*, 1997) e *Aspergillus nidulans* (Suellmann *et al.*, 1997; Fernández-Ábalos *et al.*, 1998). Attualmente, l'espressione di GFP è stata riportata in 16 specie, comprendenti 12 generi di funghi filamentosi, fra i quali *Colletotrichum* (Dumas *et al.*, 1999; Robinson e Sharon, 1999), *Mycosphaerella* (Skinner *et al.*, 1998), *Magnaporthe* (Kershaw *et al.*, 1998; Liu e Kolattukudy, 1999), *Cochliobolus* (Maor *et al.*, 1998), *Trichoderma* (Zeilinger *et al.*, 1999; Bae e Knudson, 2000), *Podospora* (Berteaux-Lecellier *et al.*, 1998), *Sclerotinia* (Vautard-Mey *et al.*, 1999), *Schizophyllum* (Lugones *et al.*, 1999), *Aspergillus* (Du *et al.*, 1999; Santerre Henriksen *et al.*, 1999; Siedenbergh *et al.*, 1999) e *Phytophthora* (Bottin *et al.*, 1999; van West *et al.*, 1999).

Per quanto riguarda i funghi filamentosi, alcuni costrutti genici utilizzati non hanno espresso livelli di fluorescenza accettabile. Per risolvere tale problema Lorang *et al.* (2001) hanno sviluppato un vettore di trasformazione più versatile per l'espressione di GFP negli ascomiceti. Si tratta di una variante del gene *gfp* sotto il controllo del gene promotore *ToxA* di *Pyrenophora tritici-repentis* (Ciuffetti *et al.*, 1997) che è stata utilizzata per l'espressione della proteina in funghi fitopatogeni dei generi *Fusarium*, *Botrytis*, *Pyrenophora*, *Alternaria*, *Cochliobolus*, *Sclerotinia*, *Colletotrichum* e *Verticillium*. La marcatura dell'intero fungo spesso richiede una forte espressione costitutiva del gene *gfp*, che generalmente si localizza in una proteina presente nel citoplasma di tutte le strutture (ife, spore, appressori, ecc.), con effetti al momento non noti sulla crescita o patogenicità (Lorang *et al.*, 2001). Linee trasformate generate da protoplasti di cellule uninucleate (*Colletotrichum magna*, *Verticillium dahliae*, *Alternaria alternata*, *Cochliobolus sativus*, *Fusarium sambucinum*) presentano uno stato fluorescente più o meno uniforme, mentre linee transgeniche generate da protoplasti multinucleati (*Botrytis cinerea*, *P. tritici-repentis*, *Sclerotinia sclerotiorum*) spesso esibiscono il fenotipo fluorescente solo in alcune cellule. Pertanto, queste specie necessitano di continui trasferimenti su substrati selettivi.

Per quanto riguarda gli studi di interazione *in vivo* tra funghi che esprimono la GFP e il tessuto vegetale, anche se le cellule necrotiche delle piante contengono composti fenolici che emettono autofluorescenza nello stesso spettro della GFP, clorofilla, antocianine e gli altri prodotti della pianta generalmente non interferiscono con la visualizzazione della sGFP (Lorang *et al.*, 2001). Va comunque considerato che l'autofluorescenza varia a seconda della specie di pianta e del tipo di tessuto, quindi la scelta di filtri per visualizzare i funghi che esprimono la proteina può essere modulata in relazione a questa variabile. Ad esempio, l'autofluorescenza del cloroplasto è rossa, quindi utilizzando filtri ad ampio spettro si può distinguere la fluorescenza del fungo. Spesso la microscopia confocale ha il vantaggio di rafforzare la visualizzazione della GFP malgrado l'autofluorescenza della parete cellulare.

#### V.4.5 Trasformazione genetica di *P. chlamydospora*

Il metodo utilizzato per la trasformazione genetica di un ceppo di *Pcb* (CBS 229.95, gentilmente fornito dalla sezione di Patologia vegetale dell'Università di Firenze) è stato quello di sottoporre protoplasti ottenuti dal fungo e DNA plasmidico clonato in un ceppo di *Escherichia coli* e relativo al vettore pCT74 contenente i geni di interesse *sgfp* e *hph*, all'azione chimica esercitata dal PEG e dagli ioni calcio che depolarizzano la membrana plasmatica interagendo con i fosfolipidi. A tale scopo si è proceduto all'estrazione dei protoplasti dal micelio fungino allevato in brodo di patata destrosio (potato dextrose broth, PDB).

##### Estrazione dei protoplasti

I protoplasti, cellule prive di parete, sono ideali per la trasformazione genetica, visto che l'accesso all'interno della cellula è limitato al solo plasmalemma. L'ottenimento di cellule trasformate a partire da protoplasti può essere definita come una tecnica abbastanza semplice. Il metodo, messo a punto da diversi ricercatori (Villanueva, 1966; Peberdy, 1979), utilizza enzimi litici che degradano la parete cellulare fungina. Il processo enzimatico di isolamento dei protoplasti a livello cellulare fornisce stimoli simili a quelli che si ottengono con una ferita o che si verificano durante il processo di infezione batterica. Pertanto, l'eliminazione della parete induce le cellule in stato di potenziale competenza a trasformarsi in competenti per la rigenerazione o trasformazione. Inoltre, poiché si opera con popolazioni cellulari, si aumenta la probabilità che si abbiano degli eventi di trasformazione indipendenti. Per quanto riguarda il rilascio di protoplasti, fattore determinante è la combinazione enzimatica costituita da enzimi cellulolitici, litici e glucanasici. È noto che le diverse specie fungine spesso necessitano di differenti combinazioni in relazione alla composizione della parete cellulare (Cocking, 1979; Hamlyn *et al.*, 1981; Lalithakumari, 1996). Gli enzimi litici giocano un ruolo importante e oggi abbiamo la possibilità di scegliere tra diversi formulati commerciali, come 'lywallzyme', 'snailase', 'cellulase' e 'lysozyme', riportati come attivi in un'ampia varietà di specie fungine (Zhou *et al.*, 2008). La composizione e combinazione degli enzimi litici dipende dalla composizione della parete cellulare dei microrganismi (Gallmetzer *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2006). Nell'ottenimento di protoplasti da *Pcb* è stata utilizzata la formulazione enzimatica Lysozyme (Sigma Chemical Co., St. Louis MO-USA) associata alla combinazione salina (OM) costituita da MgSO<sub>4</sub> 1,4 M, e Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM a pH 5,8. Un altro fattore condizionante è la scelta di stabilizzatori di pressione osmotica. Questi sono determinanti sia per mantenere un equilibrio osmotico tra l'interno e l'esterno del protoplasto, che ha perso la parete protettiva, ma anche per migliorare l'attività degli enzimi litici. Poiché la composizione della parete varia a seconda della specie fungina, la concertazione dei componenti dovrebbe essere ottimizzata tra l'insieme di sali, zuccheri e zuccheri alcolici che possono essere utilizzati come stabilizzatori osmotici (Davis, 1985). Non è ancora chiaro quale sia il reagente chimico più appropriato come stabilizzatore osmotico, c'è comunque un'assunzione generale che i sali inorganici siano più efficaci per i funghi filamentosi mentre zuccheri e zuccheri alcolici siano più adatti per lieviti e piante. In questo studio l'uso di sali inorganici si è rivelato più efficace, a conferma di questa osservazione. Altri fattori importanti sono il tempo di lisi enzimatica e la temperatura. Normalmente i tempi

sono di circa 3-4 ore (Zhao *et al.*, 2004). In questo tempo si ha un incremento graduale della produzione di protoplasti. Allungando i tempi si osserva una lisi della cellula protoplastica. Per quanto riguarda la temperatura ottimale, per i funghi filamentosi è generalmente compresa tra i 24 e i 35°C (Sun *et al.*, 2001). In *Pcb* la digestione enzimatica è stata condotta alla temperatura di 28°C per 4 ore. Nelle fasi successive i protoplasti sono stati separati dal materiale fungino non digerito mediante filtri da 30 µm. Una ulteriore purificazione è stata ottenuta grazie all'aggiunta di una soluzione (STC) a base di sorbitolo 1,2 M, CaCl<sub>2</sub> 50 mM, Tris-HCl 50 mM a pH 8,0 che grazie alla sua densità consente, dopo opportuna centrifugazione, la formazione di un gradiente che trasporta in superficie i protoplasti, lasciando sul fondo i detriti cellulari. Dopo un ulteriore lavaggio in STC i protoplasti sono stati utilizzati per la trasformazione genetica.

L'efficienza di trasferimento del materiale genetico è basata sulla produzione di protoplasti vitali e stabili, che influenza sia l'efficienza di trasformazione, sia la successiva rigenerazione della parete fungina. A tale scopo, un'aliquota delle cellule estratte è stata valutata per la sua vitalità aggiungendo un colorante specifico, il diacetato di fluoresceina (FDA). Il colorante è assorbito dalle cellule, dove le esterasi citosoliche, che si trovano sulla membrana plasmatica integra, rompono il legame estere, deacetilando la molecola la quale assume una fluorescenza verde quando irradiata con una radiazione nell'ultravioletto. L'osservazione è stata effettuata attraverso un microscopio ottico in epifluorescenza, tramite il quale è stato possibile effettuare i conteggi ed esprimere la percentuale di cellule vitali. Il metodo di estrazione ha consentito di ottenere da *Pcb* protoplasti vitali mediamente tra l'85 e il 95% e una resa media, valutata per mezzo della camera Thoma, di 10<sup>8</sup> protoplasti g<sup>-1</sup> di micelio.

##### Vettore di espressione della proteina GFP

Blue-SGFP-TYG (Jen Sheen, Department of Molecular Biology, Massachusetts General Hospital, Harvard University), è il gene *gfp* più spesso usato per la trasformazione dei funghi filamentosi (Lorang *et al.*, 2001). Il vettore plasmidico pCT74 contiene il gene *sgfp* (Chiu *et al.*, 1996), sotto il controllo del promotore *ToxA* di *P. tritici-repentis* (Ciuffetti *et al.*, 1997). La forma genica *sgfp* usata in questo vettore trasporta una mutazione che in posizione 65 della catena polipeptidica si esprime nella sostituzione dell'aminoacido serina con una treonina. Inoltre, sono stati eliminati gli introni criptici che erano responsabili della mancata espressione della proteina in *Arabidopsis* (Hasehoff *et al.*, 1997). Questo vettore conferisce una brillante espressione della GFP in patogeni di piante appartenenti al *Phylum* Ascomycota, anche se tale espressione è variabile a seconda della specie. Il vettore trasporta il gene marcatore di selezione *hph* (igromicina B fosfotrasferasi) sotto il controllo del promotore *trpC* che conferisce resistenza all'antibiotico igromicina.

##### Trasformazione protoplasti mediata da PEG

I protoplasti che presentavano una vitalità superiore all'80% sono stati subito utilizzati per la trasformazione genetica. Il metodo utilizzato ha previsto l'utilizzo di PEG e ioni Ca<sup>++</sup> che interagiscono con i fosfolipidi della membrana plasmatica rendendola permeabile, facilitando in questo modo l'ingresso del DNA esogeno. Al mix di protoplasti (10<sup>7</sup> ml<sup>-1</sup>) e di DNA del plasmide pCT74 contenente i geni *sgfp* e *hph* (25 ng), per incrementare l'efficienza di

trasformazione e facilitare l'entrata dell'acido nucleico esogeno sono stati aggiunti acido aurintricarbossilico (ATA), che è un inibitore delle nucleasi e protegge il DNA plasmidico dalla degradazione, la spermidina che presenta delle cariche molecolari positive che possono legarsi a quelle del DNA plasmidico e trasportarlo più facilmente nei protoplasti, e l'eparina, che è un anticoagulante e preserva l'aggregazione dei protoplasti (Gang *et al.*, 2006). Dopo un periodo di incubazione a 25°C per 30 minuti, la soluzione è stata posta su agar patata destrosio (PDA) con pressione osmotica equilibrata aggiungendo saccarosio 0,8 M.

#### Selezione delle colonie fungine trasformate

I protoplasti hanno rigenerato la parete 10 giorni circa dopo la trasformazione. A questo punto le cellule sono state trasferite su PDA in presenza dell'antibiotico di selezione igromicina B (100 mg/l) (PDA selettivo). Dopo circa 20 giorni sono risultate visibili le prime colonie fungine. Una prima selezione delle colonie trasformate è stata fatta osservando l'espressione nel micelio della GFP al microscopio a epifluorescenza (Nikon Diaphot epifluorescence microscope - Nikon Corp., Tokyo, Japan) equipaggiato con filtro Nikon B-2A, eccitazione 450-490 emissione BA520. Le linee di *Pch* trasformate con il gene *sgfp* (Blue-sGFP-TYG) presentavano una forte fluorescenza verde nel micelio giovane, apprezzabile al microscopio soprattutto quando osservato in gruppo e non in singole ife (*fig. 1*), mentre il micelio più vecchio tende a perdere fluorescenza, come osservato anche in altri funghi filamentosi (Logan *et al.*, 2001). In particolare, va osservato che i conidi prodotti dalle diverse linee trasformate non hanno mai mostrato la fluorescenza verde tipica della sGFP, come osservato in *Pch* anche da Bradshaw *et al.* (2005).

#### Caratterizzazione delle linee 'Pch sGFP'

Il micelio originato da colonie stabilizzate dopo 3 subculture su PDA selettivo, è stato sottoposto a una prima indagine molecolare utilizzando la PCR. A tale scopo il micelio delle colonie fungine che presentavano la tipica colorazione verde al microscopio a epifluorescenza, è stato sottoposto a estrazione di DNA totale utilizzando un tampone di estra-

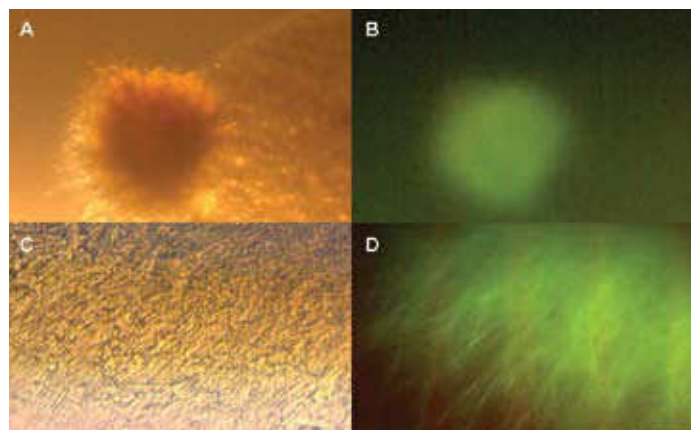
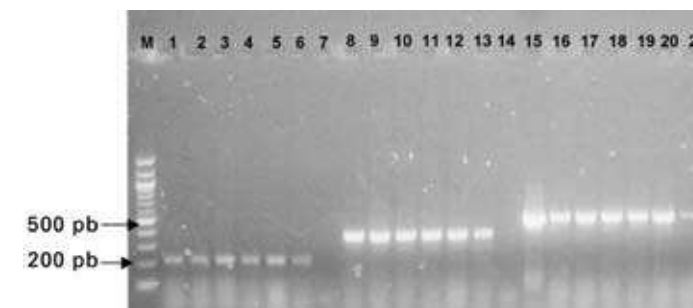


Fig. 1 - Colonie di 'Pch sGFP' sviluppate dopo 20 giorni da protoplasti sottoposti a trasformazione mediata da PEG. (A) Micrografia della colonia sviluppata evidenziata al microscopio con luce bianca e (B) in epifluorescenza con filtro Nikon B-2A ex 450-490 em BA520 specifico per la GFP (100x). (C) Micelio della colonia trasformata di 'Pch sGFP' osservata al microscopio con luce bianca e (D) in epifluorescenza per la visualizzazione della GFP (200x)

Fig. 2 - Elettroforesi su gel di agarosio dei prodotti di PCR ottenuti dall'amplificazione del DNA estratto da 6 diverse linee 'Pch sGFP' e DNA controllo da *Pch* CBS 229.95 utilizzando primer specifici per il gene *sgfp* (colonne da 1 a 7), per il gene *hph* (da 8 a 14) e per *P. chlamydospora* (da 15 a 21). M = marcatore di peso molecolare 100 pb (New England Biolabs, Beverly, MA-USA)



zione a base di CTAB (Tris-HCl pH 8,0 100 mM, NaCl 1,4 M, EDTA20 mM, CTAB-Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide 2%,  $\beta$ -mercaptoetanolo 0,4%), seguita da separazione del DNA in cloroformio:ottanolo (24:1) e successiva precipitazione in isopropanolo. Il DNA ottenuto è stato sottoposto ad amplificazione mediante primer specifici appositamente disegnati sulla regione genica codificante per geni *sgfp*, *hph* e primer utili all'identificazione di *Pch*. Con questo sistema sono state identificate diverse linee 'Pch sGFP' (Landi e Romanazzi, 2006) (*fig. 2*).

Le linee 'Pch sGFP' positive all'analisi PCR che mostravano una crescita uniforme dopo 5 successive subculture su PDA selettivo sono state sottoposte a caratterizzazione molecolare utilizzando la PCR Real Time, che ci ha consentito di differenziarle in relazione al diverso numero di copie dei geni *sgfp* e *hph* inserite nel genoma. Si tratta di una tecnica di indagine che grazie all'utilizzo di fluorofori nella reazione di PCR, consente di rilevarne e quantificarne i prodotti durante la fase di sintesi degli amplificati. Il sistema SYBR Green scelto per lo studio è basato sulla rilevazione di fluorofori che vengono emessi in relazione ai frammenti a doppia elica prodotti durante la reazione di PCR. La specificità dei frammenti amplificati è stata verificata valutando le curve di dissociazione (curve di melting). La visualizzazione in tempo reale dei prodotti di amplificazione è possibile grazie a un modulo ottico costituito da un sistema di eccitazione dato da una lampada alogena e da filtri specifici per un ampio spettro di fluorofori. Le metodiche di calcolo utilizzate in questo studio hanno richiesto la costruzione di una curva standard di riferimento, costituita da diluzioni seriali di quantità note del DNA del plasmide pTC74 contenente i geni *sgfp* e *hph*. La quantificazione è avvenuta integrando i risultati di espressione delle linee 'Pch sGFP' con la curva standard di riferimento (Mohamed e Sanders, 2005). Per una determinazione più accurata del numero di copie dei geni *sgfp* e *hph* è stato utilizzato il metodo di calcolo comparativo-delta delta Ct (Ingham *et al.*, 2001). Questa tecnologia ha consentito di discriminare almeno 9 linee diverse di 'Pch sGFP' con un numero di copie dei geni *sgfp* e *hph* variabile da 2 a 5. A tale variazione, tuttavia, non ha corrisposto un'apprezzabile differenza nell'espressione della proteina nel micelio valutata al fotometro (Nikon Photometer P101-Nikon Corp., Tokyo, Japan).

#### V.4.6 Inoculazione di 'Pch sGFP'

Nel periodo invernale sono state prelevate talee di circa 70 cm di lunghezza da viti che durante la fase vegetativa non avevano presentato sintomi fogliari ascrivibili al mal dell'esca. Per ciascuna delle varietà di *V. vinifera* (Montepulciano, Verdicchio, Sangiovese, Biancame, Cabernet Sauvignon) e dei portinnesti (*V. berlandieri* × *V. riparia* Kober 5BB, *V. berlandieri* × *V. riparia* SO4, *V. berlandieri* × *V. riparia* 420A, *V. rupestris*) sono state preparate talee della lunghezza di 50 cm, la cui base è stata tagliata in modo da creare una superficie di taglio fresca. Per lo studio della colonizzazione è stata scelta la linea 'Pch GFP' 8, lasciata crescere per due settimane su PDA selettivo. A tal punto è stata ottenuta una sospensione conidica distribuendo sulla piastra 10 ml di una soluzione di triton X-100 0,1% e agitando con un'ansa il micelio, quindi filtrando su doppio strato di garza. La concentrazione finale dell'inoculo è stata portata a  $10^7$  conidi  $ml^{-1}$ . Le talee sono state immerse per 24 ore nella sospensione conidica, periodicamente agitata (fig. 3).

Ciascun gruppo di talee, avvolto alla base con uno strato di cotone idrofilo umido, è stato successivamente sigillato in buste di plastica, in modo da prevenirne la disidratazione. Per ogni varietà e portinnesto sono state inoculate 5 ripetizioni di 15 talee, mentre un ulteriore gruppo di 15 è stato immerso in acqua distillata. Il materiale così preparato è stato posto a incubare alla temperatura di  $20 \pm 2^\circ C$  e mensilmente è stata monitorata la colonizzazione del fungo mediante osservazioni al microscopio a fluorescenza di porzioni di legno. La colonizzazione della linea 'Pch sGFP' all'interno della talea inoculata è stata osservata grazie alla messa a punto di un metodo di indagine che ha previsto l'impiego di un microscopio a epifluorescenza (Nikon Diaphot epifluorescence microscope - Nikon Corp., Tokyo, Japan) utilizzando il filtro Nikon B-2A ex 450-490 nm BA520. Da ciascuna talea sono state asportate, ogni 5 cm dalla parte basale verso quella distale, sezioni trasversali e longitudinali dello spessore di 50  $\mu m$  utilizzando un criostato (HM505E, Micron, Walldorf, Germany). Le sezioni sono state in seguito osservate al microscopio per valutare l'espressione della sGFP.

Controlli molecolari tramite PCR, atti a verificare la specificità della fluorescenza osservata al microscopio, sono stati effettuati su sezioni che presentavano colore verde fluorescente e su altre che non presentavano tale colorazione o che davano una lieve fluorescenza diffusa. Con questa finalità è stata effettuata un'estrazione del DNA dalle parti selezionate secondo Doyle e Doyle (1990) a cui ha fatto seguito una identificazione delle sequenze specifiche del gene *scf* e di *Pch*. Il DNA estratto è stato amplificato con primer specifici per la regione genica codificante per *scf* e in nested-PCR con i primer specifici per *Pch* (Abbatecola *et al.*, 2006). I risultati hanno messo in evidenza un'elevata correlazione positiva tra fluorescenza osservabile al microscopio e presenza del fungo mediante la diagnosi molecolare. Un ulteriore controllo è stato effettuato su alcune delle talee inoculate mediante reisolamento del fungo, che le indagini morfologiche e molecolari hanno permesso di identificare essere l'isolato 'Pch sGFP' inoculato.

Verificata la rispondenza fluorescenza/presenza di *Pch*, l'osservazione è stata estesa a tutte le varietà e ai portinnesti inoculati. In particolare, 6 mesi dopo l'inoculazione di 'Pch sGFP' per ciascuna varietà di vite e di portinnesti, almeno dieci delle quindici talee di ogni ripetizione sono state decorticate e sezionate, quindi osservate per l'eventuale presenza di striature nerastre. Sia le varietà di vite, sia i portinnesti inoculati hanno mostrato striature nerastre più o meno estese,

Fig. 3 - Talee di vite delle varietà Montepulciano, Verdicchio, Sangiovese, Biancame e Cabernet Sauvignon e dei portinnesti Kober 5BB, SO4, 420A, 1103P e *V. rupestris* inoculate per immersione della base in una sospensione conidica dell'isolato trasformato di *P. chlamydospora* 'Pch GFP'



come già evidenziato da Abbatecola *et al.* (2006) su piante innestate e portinnesti naturalmente infetti. Tutte le talee immerse in acqua e utilizzate come controllo hanno invece presentato una lieve colorazione brunastra dei tessuti vascolari, generalmente limitata ai primi 10 mm basali.

#### V.4.7 Osservazioni istologiche su talee di vite inoculate con 'Pch sGFP'

Una prima indagine sulla espressione della sGFP e conseguente localizzazione del fungo all'interno della talea di vite è stata effettuata su sezioni di 50  $\mu m$  ottenute al criostato. Sezioni trasversali di talee inoculate con 'Pch sGFP' mostravano a partire dalla base una diffusa espressione della sGFP in molte zone della porzione xilematica, che al microscopio a epifluorescenza evidenziavano una intensa colorazione verde (fig. 4A). Sezioni da talee controllo, immerse in acqua, osservate con il medesimo microscopio manifestavano una colorazione giallo-marrone uniforme (fig. 4B).

La fluorescenza verde in talee inoculate con 'Pch sGFP' era concentrata nelle cellule che

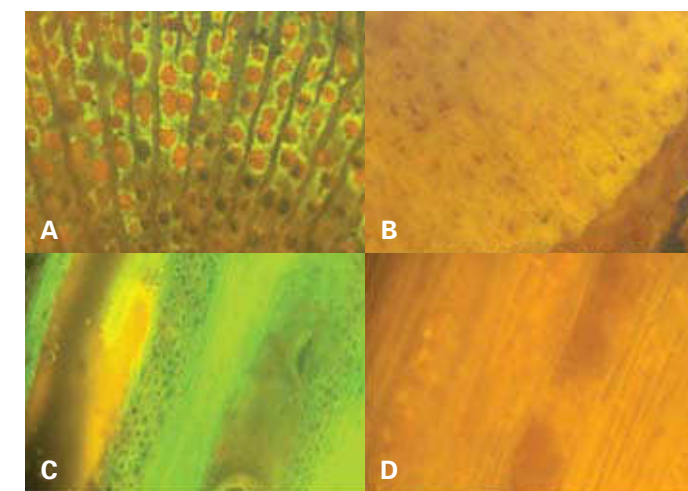


Fig. 4 - Micrografie al microscopio a epifluorescenza di sezioni trasversali (in alto, 100x) e longitudinali radiali (in basso, 200x) di (A, C) talee di vite inoculate con 'Pch sGFP' e (B, D) di talee controllo

circondano le fibre a ridosso dei vasi xilematici. Le caratteristiche fenotipiche di 'Pch sGFP' non sempre hanno consentito una facile identificazione delle singole ife fluorescenti, ma ben visibile è l'espressione della sGFP (e quindi la collocazione del fungo) nella struttura del legno, mentre all'interno delle trachee non è stata osservata fluorescenza.

Sembra interessante evidenziare, in sezioni trasversali, la completa o parziale occlusione delle trachee che si trovano nell'area di maggior espressione della proteina verde; queste, in epifluorescenza mostrano una colorazione arancione mentre le trachee di aree non fluorescenti si presentano vuote, scure al microscopio (fig. 4A). Questa osservazione conferma la possibile formazione di tille e gomme nelle trachee colpite dalla malattia (Pascoe e Cottrall, 2000; Troccoli *et al.*, 2001). In aree altamente colonizzate da 'Pch sGFP', la massima espressione della proteina fluorescente nelle cellule parenchimatriche che circondano le fibre xilematiche è ben visibile anche in sezioni longitudinali radiali (fig. 4C). In queste, se confrontate con il controllo (fig. 4D), i setti trasversali delle fibre xilematiche sono poco visibili a causa della completa colonizzazione cellulare.

#### V.4.8 Colonizzazione di 'Pch sGFP' in varietà e portinnesti di vite

Dalle osservazioni al microscopio a fluorescenza effettuate su sezioni di talee incubate per sei mesi a  $20\pm 2^\circ\text{C}$  è stato possibile verificare che i valori medi più elevati di colonizzazione sono stati registrati nelle varietà Montepulciano e Verdicchio, mentre quelli più bassi nella cv. Cabernet Sauvignon e nei portinnesti *Vitis rupestris* e SO4 (fig. 5). Fra le varietà, anche in assenza di significatività statistica, Verdicchio ha mostrato, ad esempio, una più estesa colonizzazione del legno rispetto a Sangiovese. Tali dati presentano una buona correlazione con le indagini svolte in campo su vigneti sia giovani sia adulti, ove l'incidenza della malattia su Verdicchio è risultata più elevata rispetto a Sangiovese (Romanazzi *et al.*, 2006). Tale situa-

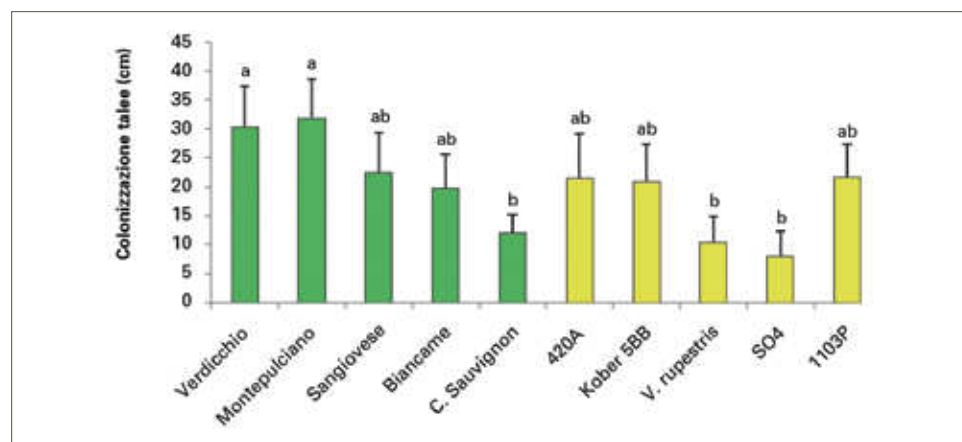


Fig. 5 - Colonizzazione di 'Pch GFP' in talee di varietà e portinnesti di vite inoculate artificialmente e incubate sei mesi a  $20\pm 2^\circ\text{C}$

zione si conferma anche per la varietà Montepulciano, se si considerano i vigneti giovani, mentre la correlazione è più bassa riguardo ai vigneti adulti (Romanazzi *et al.*, 2008).

Tra i portinnesti, i valori medi più bassi di colonizzazione sono stati registrati in *V. rupestris* e SO4, mentre valori più elevati, anche se statisticamente non differenti, sono stati osservati per i portinnesti 420A, Kober 5BB e 1103P. Tale risultato è in linea con quanto verificato da Eskalen *et al.* (2001), i quali dopo aver inoculato con *Pch* talee di 20 portinnesti, tra i quali 420A, SO4 e 1103P, ne hanno valutato la colonizzazione dei tessuti andando a misurare la lunghezza delle striature nerastre. In questo caso 420A e SO4 hanno mostrato i livelli di colonizzazione significativamente più bassi rispetto al 1103P. Tali dati concordano in parte con quelli ottenuti nelle nostre prove, ove l'estensione della colonizzazione è più bassa in SO4 rispetto al 1103P. Considerando complessivamente le varietà e i portinnesti, in questi ultimi la diffusione di 'Pch sGFP' è risultata significativamente più bassa ( $P \leq 0,05$ ) rispetto alle varietà (Landi *et al.*, 2009).

#### V.4.9 Conclusioni

I dati raccolti, spesso concordanti con quelli di campo, sebbene ottenuti su talee e non su pianta intera, potrebbero contribuire a far comprendere il livello di resistenza delle piante alla colonizzazione di *Pch* e quindi, indirettamente, almeno in parte, alla possibilità che queste poi subiscano il mal dell'esca. Ad ogni modo, il sistema messo a punto non ha potuto tenere in considerazione i meccanismi di resistenza della pianta, che solo indagini su tessuti vitali possono elucidare. Inoltre, risulterebbe interessante la valutazione del livello di colonizzazione che avviene a basse temperature, alle quali le viti sono sottoposte durante il periodo invernale e alle quali spesso viene conservato il materiale di propagazione.

#### Ringraziamenti

Si ringraziano il prof. F. Faretra dell'Università di Bari per aver fornito i primer specifici per la diagnosi di *P. chlamydospora* e la dott.ssa M. Santini per la collaborazione nelle indagini.



## **VI. Mal dell'esca e qualità delle uve e dei mosti**



## VI.1 Effetti dell'esca sulla qualità di mosti e vini

F. Calzarano\*, C. Amalfitano, L. Seghetti, M. Del Carlo, V. D'Agostino

### VI.1.1 Introduzione

La realizzazione di indagini preliminari volte a stabilire le eventuali variazioni dei principali parametri che determinano la qualità della produzione, dovute alla presenza del mal dell'esca, hanno reso necessaria la prosecuzione di precedenti studi (Calzarano *et al.*, 2001; 2004) al fine di confermare o meno i risultati già acquisiti e di ottenere ulteriori informazioni, utili oltre che alla definizione dei danni a carico della produzione (☞ capitolo VI.1) anche alla individuazione di alterazioni fisiologiche nelle piante colpite e alla comprensione dei meccanismi coinvolti nella manifestazione dei sintomi fogliari (☞ capitoli VI.2, VI.3). Diversamente dalle prime ricerche, concentrate sulle variazioni compositive presenti nelle bacche di viti malate a maturità di raccolta e sui conseguenti decrementi qualitativi dei vini ottenuti, le indagini sono state effettuate in diversi momenti della stagione vegetativa e hanno riguardato oltre ai principali parametri di qualità degli acini anche le lamine fogliari, verificando i contenuti di numerosi macro- e microelementi, come descritto nel ☞ capitolo VI.2. Inoltre, si è cercato di mettere in luce la presenza di risposte di difesa nelle piante malate, sia di primo che di secondo livello, monitorando i livelli dei polifenoli totali in acini e mosti ed effettuando indagini specifiche sui contenuti di *trans*-resveratrolo (☞ capitolo VI.3), principale fitoanticipina (VanEtten *et al.*, 1994) della vite, in foglie e acini di viti malate nel corso di differenti fasi fenologiche.

### VI.1.2 Materiali e metodi

Le diverse indagini sono state effettuate, similmente agli studi preliminari, dopo aver monitorato la presenza di sintomi fogliari, per un periodo superiore ai dieci anni, nei vigneti esaminati, appartenenti alla cv. "Trebiano d'Abruzzo" e ubicati nella regione Abruzzo, in provincia di Teramo. In questo modo è stato possibile distinguere le viti malate asintomatiche, ossia viti che, pur soggette alla totale remissione dei sintomi fogliari nell'anno di rilievo in corso, erano certamente affette dalla malattia perché avevano mostrato sintomi fogliari in almeno uno dei precedenti anni di monitoraggio, dalle viti presumibilmente sane perché non avevano mai mostrato sintomi in nessuno degli anni di monitoraggio. Le determinazioni dei vari parametri sono state quindi effettuate in tre gruppi di viti: *a*) viti malate sintomatiche; *b*) viti malate asintomatiche; *c*) viti presumibilmente sane.

\* Università di Teramo email: fcalzarano@unite.it

In ogni vigneto, per ogni gruppo di viti, e in ognuno degli anni di studio, sono state individuate 6 piante; da ogni pianta sono stati prelevati acini alternativamente dalle ali, punte e porzione centrale di tutti i grappoli presenti generando un campione costituito da circa 0,5 kg di prodotto; gli acini prelevati dalle piante sintomatiche presentavano la medesima estensione delle lesioni pari a circa il 15-20% dell'intera superficie. Da ognuna delle medesime piante utilizzate per il prelievo degli acini sono state prelevate 10 lamine fogliari situate nella porzione mediana dei tralci uviferi e in posizione opposta ad alcuni dei grappoli campionati; le foglie prelevate dalle piante sintomatiche avevano tigrature evidenti pari al 65% dell'intera lamina. Sia nel caso degli acini che delle foglie sono stati quindi formati 6 campioni, per ognuno dei tre gruppi di viti citato, e ogni campione era costituito da acini o da foglie raccolti da una singola pianta; in questo modo è stato possibile seguire durante la stagione vegetativa 6 singole piante per ogni gruppo e ottenere informazioni più attendibili sugli andamenti dei vari parametri che divenivano particolarmente evidenti e significativi nel caso di comportamenti uniformi delle piante del gruppo. I prelievi delle foglie sono stati ripetuti nel corso della stagione in occasione di 4 differenti fasi fenologiche, descritte in base alla classificazione BBCH (Lorenz *et al.*, 1995): *Berries beginning to touch* corrispondente alla "pre-chiusura grappolo"; *Berries developing color* corrispondente alla "invaiaura"; *Softening of berries* e *Berries ripe for harvest* corrispondenti rispettivamente a una fase intermedia di maturazione e alla maturità di raccolta.

I prelievi degli acini sono stati effettuati in occasione delle ultime tre fasi fenologiche elencate. La medesima metodologia di prelievo dei campioni è stata utilizzata per tutte le diverse indagini di seguito descritte.

In ognuno degli studi effettuati, descritti nel presente capitolo (<sup>☞</sup> *cap. VI.1*) e nei due successivi (<sup>☞</sup> *cap. VI.2-VI.3*), le analisi statistiche dei dati ottenuti dall'analisi dei campioni di mosti, foglie e acini sono state effettuate confrontando separatamente i risultati delle piante malate sintomatiche e delle piante malate asintomatiche con quelli delle piante sane. I confronti a coppie dei gruppi di viti sono stati effettuati, per ognuna delle matrici vegetali descritte, tramite analisi della varianza e Student's *t*-test, utilizzando le sei osservazioni ottenute (da 6 campioni provenienti da 6 singole piante) in ognuno dei gruppi di viti e per ognuno dei vari parametri determinati. I confronti sono stati effettuati in ognuno dei diversi anni esaminati e in ogni fase fenologica considerata.

In tutte le figure del capitolo, per ogni data di rilievo, la colorazione rossa del simbolo indica una differenza significativa (Student's *t*-test) rispetto alle piante sane.

Nel presente studio sono state indagate le variazioni dei livelli di zuccheri, acidità totale, frazioni acidiche e pH nei mosti e dei polifenoli totali negli acini e nei mosti di viti colpite da esca. Le indagini hanno riguardato due vigneti ubicati nelle località di Controguerra e Giulianova, dal 2004 al 2006 e nel 2005 e 2006 rispettivamente.

Il vigneto di Controguerra, 32 anni, è condotto con il sistema di allevamento Geneva Double Curtain (GDC), comprende 740 viti su portinnesto 420A, impiantate su una superficie di 5.984 mq con sesto d'impianto 2 (interfila) × 4 (intrafila) m, con una produzione media per ceppo variabile da 13 fino a 16,5 kg, nelle annate di massima produzione. Il vigneto di Giulianova, della medesima età del precedente, è allevato a "Tendone". Le 2.000 viti presenti sono innestate su portinnesto 420A con sesto d'impianto 3 × 3 m e una produzione media di 20 kg per ceppo. I terreni dei due vigneti presentano entrambi tessitura calcareo-argillosa. In entrambi i vigneti, oggetto da 15 anni di studi ed osservazioni sul mal dell'esca, indagini precedenti sulle viti colpite avevano

dato modo di accertare la presenza di varie alterazioni a carico dei tessuti legnosi attestanti la contemporanea presenza sia della tracheomicosi che della carie (esca propria).

Ogni campione di acini, destinato all'ottenimento del mosto, è stato sottoposto a torchiatura manuale ottenendo la separazione di bucce e vinaccioli.

La determinazione dell'acidità totale, del pH e degli zuccheri riduttori è stata eseguita sul mosto ottenuto, da ognuno dei campioni, in accordo con la metodica ufficiale del Regolamento EC 2676/90, Allegati 13, 24 e 5 rispettivamente (AA.vv., 1990).

La determinazione degli acidi organici è stata effettuata su un'aliquota pari a 10 ml di mosto ottenuto subito dopo la raccolta, prelevata da ogni campione; le aliquote di mosto dei campioni sono state omogeneizzate con Ultra-Turrax (IKA, Heidelberg, Germania) e filtrate su carta da filtro. Il filtrato è stato centrifugato a 6000 rpm per 3 minuti, quindi è stato prelevato 1 ml di surnatante e diluito con 9 ml di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,08 M. L'estratto diluito è stato centrifugato per 3 minuti a 6000 rpm e il surnatante analizzato per il contenuto di acidi organici in HPLC (Perkin Elmer, Series 200 System, Monza, Italia) con un rivelatore DAD (Diode Array Detector), impostando i due canali a 210 e 220 nm. L'analisi è stata eseguita utilizzando una colonna a scambio ionico (Aminex HP87 H Ion Exclusion, BIO RAD, Milan, Italia; 300 mm × 7,8 mm, termostata a 55 °C, con pre-colonna (Cation H Cartridge BIO RAD, Milano, Italia; 30 mm × 4,6 mm), usando come fase mobile H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,08 M a un flusso di 0,6 ml/min per una durata dell'eluizione di 22 minuti. Con questo metodo i picchi degli acidi risultavano essere ben risolti e i loro tempi di ritenzione erano per l'acido tartarico 8,83 min e per l'acido malico 9,70 min (SD, 0,018 e 0,031; CV% 0,2 e 0,3). Le analisi sono state effettuate in dupplicato, iniettando un volume di 20 µl per ogni singola analisi. Le rette di calibrazione sono state ottenute iniettando 20 µl degli standard a concentrazione nota di acido tartarico e malico in soluzione di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,08 M. Sono stati preparati 5 standard partendo da una concentrazione di 1 mg/ml e i successivi per diluizione seriale in rapporto 1:2.

I polifenoli totali sono stati determinati nel 2006 sui mosti e nel 2005 su acini interi; nel 2005 una parte degli acini di ogni campione, destinata alla determinazione dei polifenoli totali, è stata immersa in azoto liquido per 1 minuto e poi finemente tritata con un omogeneizzatore (Modello BL470, Amstrad, Milano, Italia) per 1 minuto; 1 g di questo campione è stato diluito in 10 ml di una miscela metanolo/acqua acida (1% acido formico) 0,5:10 v/v. La soluzione è stata caricata su una colonna C18 da 1 g (Stepbio, Bologna, Italia) precedentemente condizionata con acqua acida (1% acido formico) e metanolo. Dopo lavaggio con acqua acida (1% acido formico) i composti fenolici sono stati eluiti con metanolo. L'estratto è stato analizzato con il metodo di Folin-Ciocalteu e il quantitativo di polifenoli totali espresso in mg/kg s.s. acido gallico equivalenti. Per quanto riguarda il mosto il campione diluito 1:10 in acqua acida (1% acido formico) è stato trattato con la stessa procedura.

### VI.1.3 Risultati e discussione

#### Zuccheri

L'analisi dei mosti ha evidenziato un contenuto di zuccheri nelle bacche in aumento, col progredire della maturazione, in tutte le piante esaminate. Tuttavia, il contenuto di zuccheri negli acini delle viti malate, sintomatiche e asintomatiche, è risultato sempre inferiore

rispetto alle viti sane, a eccezione dell'anno 2004 nel vigneto di Controguerra, quando i valori dei tre gruppi sono apparsi simili, in particolare nella fase di maturità di raccolta. Tali differenze sono risultate più sensibili e sempre significative tra viti sintomatiche e sane, mentre i decrementi delle viti asintomatiche apparivano solo tendenziali a eccezione del 2005 nel vigneto di Giulianova quando il livello degli zuccheri era risultato in ogni fase considerata significativamente inferiore rispetto a quello delle sane sebbene con una diffe-

renza meno evidente rispetto a quella registrata per le viti sintomatiche (figg. 1-5).

Nonostante le eccezioni descritte, da imputare al particolare andamento stagionale nel caso del vigneto di Controguerra nel 2004, i risultati ottenuti confermano quanto emerso nei precedenti lavori nei quali similmente il decremento degli zuccheri interessava in maniera preponderante gli acini delle viti sintomatiche (Calzarano *et al.*, 2001; 2004). Tale fenomeno, quindi, sembra plausibilmente dovuto alla perdita di funzionalità delle foglie

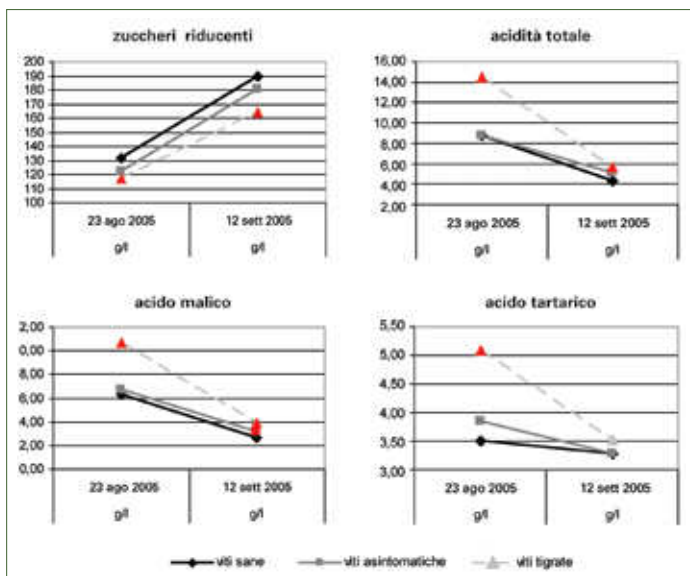
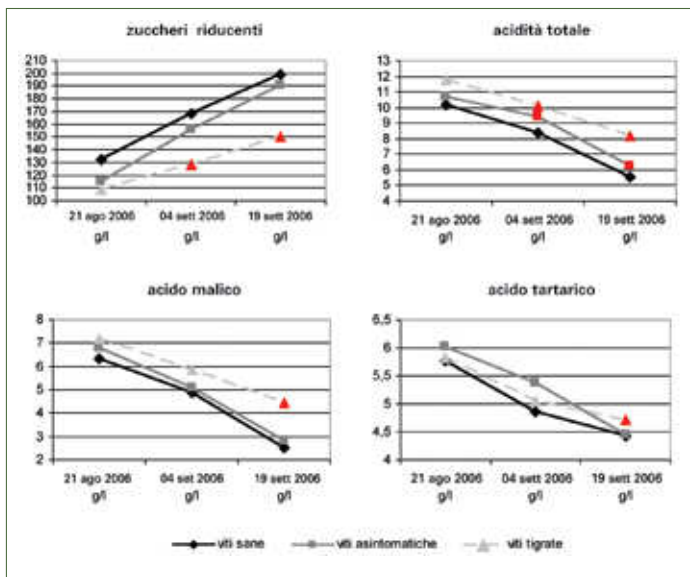


Fig. 1 - Zuccheri riducenti, acidità totale e frazioni acide nei mosti dei gruppi di viti esaminati - Vigneto di Controguerra 2006. Per ogni data, il colore rosso del simbolo indica una differenza statisticamente significativa della tesi (Student's t-test) rispetto alle piante sane

Fig. 2 - Zuccheri riducenti, acidità totale e frazioni acide nei mosti dei gruppi di viti esaminati - Vigneto di Controguerra 2005. Per ogni data, il colore rosso del simbolo indica una differenza statisticamente significativa della tesi (Student's t-test) rispetto alle piante sane

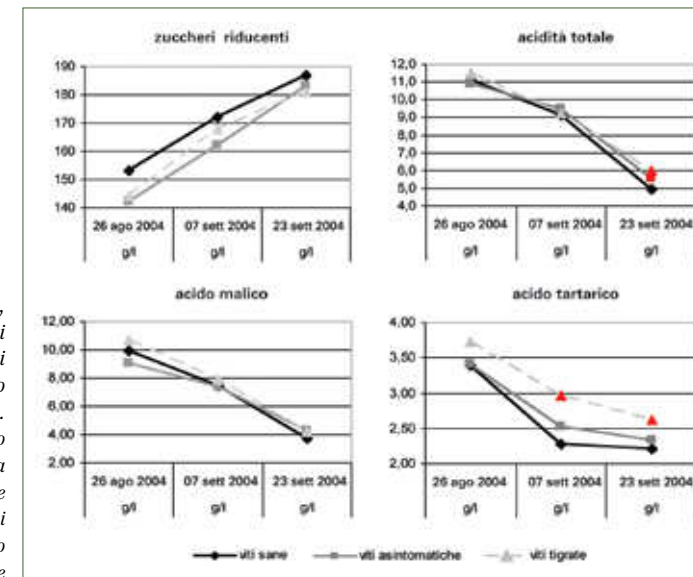


Fig. 3 - Zuccheri riducenti, acidità totale e frazioni acide nei mosti dei gruppi di viti esaminati - Vigneto di Controguerra 2004. Per ogni data, il colore rosso del simbolo indica una differenza statisticamente significativa della tesi (Student's t-test) rispetto alle piante sane

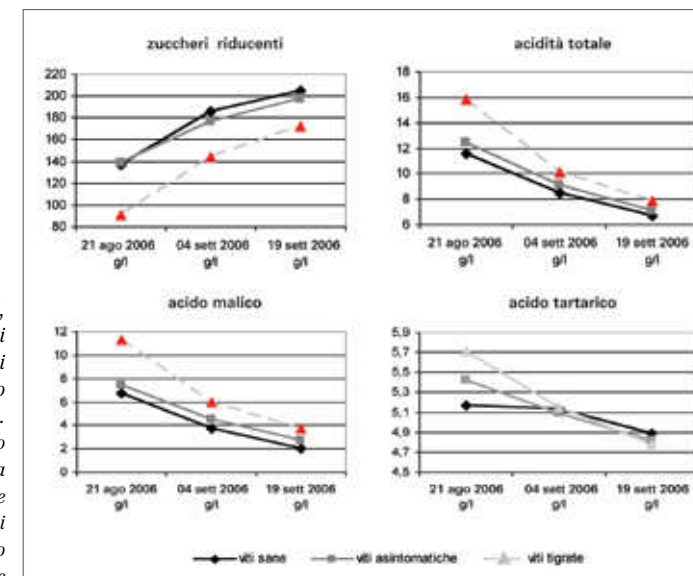


Fig. 4 - Zuccheri riducenti, acidità totale e frazioni acide nei mosti dei gruppi di viti esaminati - Vigneto di Giulianova 2006. Per ogni data, il colore rosso del simbolo indica una differenza statisticamente significativa della tesi (Student's t-test) rispetto alle piante sane

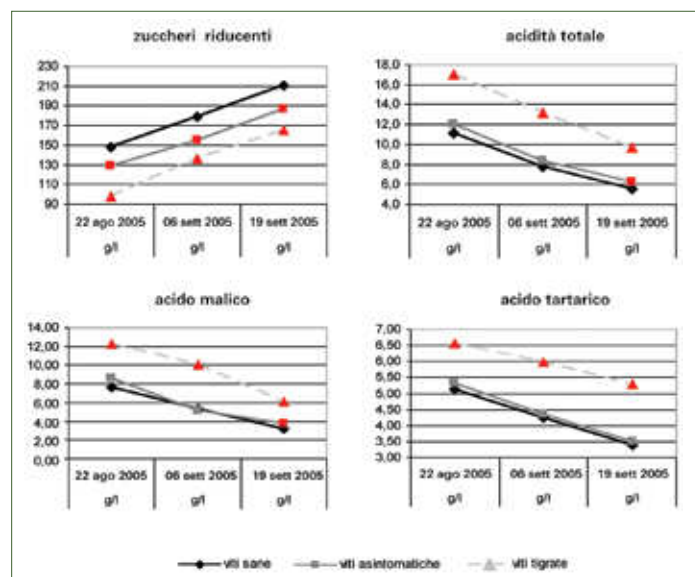


Fig. 5 - Zuccheri riducenti, acidità totale e frazioni acidiche nei mosti dei gruppi di viti esaminati - Vigneto di Giulianova 2005. Per ogni data, il colore rosso del simbolo indica una differenza statisticamente significativa della tesi (Student's t-test) rispetto alle piante sane

tigrate, diffusamente presenti sull'apparato epigeo delle viti sintomatiche campionate, che si concluda nella riduzione del flusso di zuccheri esosi verso le bacche già dal primo periodo di maturazione, a partire dall'invaia-tura.

Tale decremento, che consisteva mediamente in 40 g/l alla raccolta, corrisponde a una perdita in contenuto alcolico dei vini superiore al 3,0% vol.

**Acidità totale, frazioni acidiche e pH**

La diminuzione dell'acidità totale, correlata essenzialmente alla riduzione dell'acido malico libero, è stata osservata in tutte le piante, con l'avanzare della maturazione, come normalmente accade. Nei mosti delle viti malate, e in modo più sensibile nelle sintomatiche, i livelli di tale parametro rimanevano superiori a quelli delle sane, in particolare nella fase di piena maturazione (figg. 1-5).

I livelli più elevati di acido tartarico sono stati osservati nei mosti delle viti sintomatiche e tali valori erano spesso statisticamente differenti, rispetto a quelli delle piante sane. Anche i valori ottenuti dalle viti asintomatiche erano superiori a quelli delle sane, sebbene con leggere e solo tendenziali differenze.

Il contenuto in acido malico è risultato superiore nei mosti delle viti malate, rispetto a quelli delle piante sane, in entrambi i vigneti, negli anni 2005 e 2006, in maniera sempre significativa nei mosti delle viti sintomatiche a maturità di raccolta e sovente anche nelle fasi fenologiche precedenti; solo nel 2004 a Controguerra i livelli di acido malico sono risultati simili nei tre gruppi di piante (figg. 1-5). In tutti i gruppi di viti è stata osservata, dall'invaia-tura alla raccolta, una superiore diminuzione dell'acido malico rispetto a quanto osservato per l'acido tartarico, come normalmente accade.

I valori di pH sono risultati sostanzialmente simili nei tre gruppi di viti a maturità di raccolta con una sporadica eccezione di un livello significativamente inferiore nelle viti asintomatiche a Controguerra nel 2004. Spesso nelle fasi precedenti la piena maturazione i valori di pH sono risultati significativamente inferiori nelle viti sintomatiche (fig. 6).

I superiori livelli di acidità totale delle viti sintomatiche, dovuti soprattutto agli elevati livelli di acido malico, potrebbero essere dipesi dalla rimetabolizzazione degli zuccheri migrati nelle bacche operata per garantire le funzioni vitali delle cellule (Ruffner, 1982). Infatti in condizioni di stress che deprimono la fotosintesi, nel mesocarpo delle bacche le cellule specializzate per lo stoccaggio di vari componenti (Kriedemann, 1969; Steffan e Rapp, 1979), ma anche altre cellule non deputate a questa particolare funzione (Ruffner, 1982), accumulano metaboliti, compresi gli zuccheri, che possono essere utilizzati come substrato per la respirazione, normalmente incrementata in presenza di uno stato patologico, producendo acido malico via glicolisi. Tuttavia, in alternativa, gli elevati livelli di acidità totale nelle viti sintomatiche potrebbero essere correlati a una ridotta respirazione dell'acido malico, ossia dovuti al ritardo della maturazione delle bacche. I ridotti incrementi di acido tartarico, rispetto a quelli evidenziati per l'acido malico, nelle viti sintomatiche rispetto alle sane, potrebbero essere motivati con la mancata correlazione tra metabolismo dell'acido tartarico e incremento respiratorio (Fregoni, 1999).

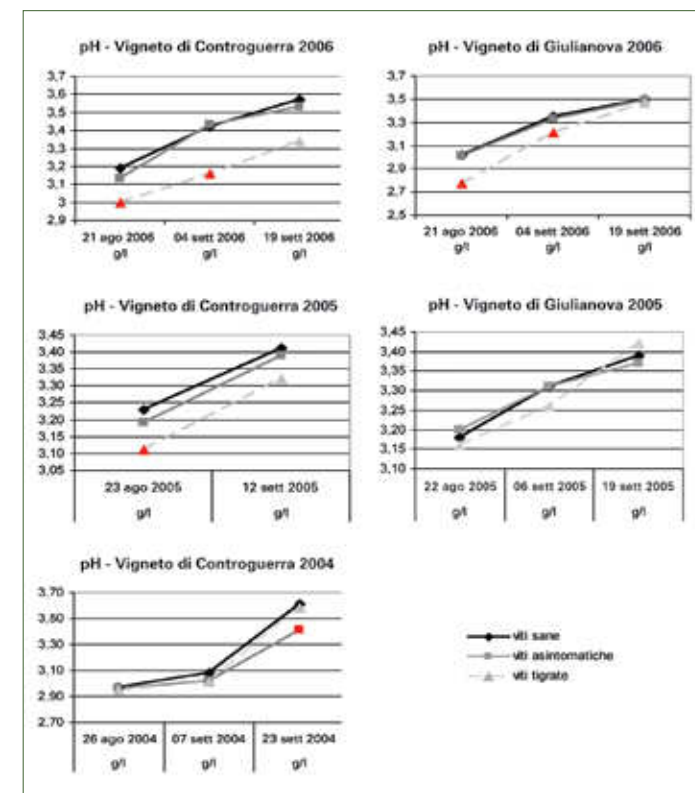


Fig. 6 - pH nei mosti dei tre gruppi di viti esaminati nei diversi anni di osservazioni. Per ogni data, il colore rosso del simbolo indica una differenza statisticamente significativa della tesi (Student's t-test) rispetto alle piante sane

I valori di pH simili negli acini dei tre gruppi di viti a maturità di raccolta, nonostante i più elevati valori di acidità totale registrati negli acini delle viti sintomatiche, e talvolta delle asintomatiche, sono probabilmente da attribuire alla capacità di tali viti di assorbire cationi a effetto salificante, tamponare l'acidità e riportare il pH a valori normali; questo meccanismo è risultato efficace alla raccolta, mentre spesso nelle fasi precedenti, anche se in atto, non risultava sufficiente allo scopo, dati i valori di pH che rimanevano significativamente inferiori nelle viti sintomatiche (Calzarano *et al.*, 2001; 2004). A supporto di tale ipotesi è da rilevare il generale arricchimento di elementi ad azione salificante rilevato negli acini delle viti sintomatiche, come descritto nell'ambito dell'indagine successiva incentrata sullo stato nutrizionale delle viti colpite da esca.

**Polifenoli totali**

Il livello dei polifenoli totali valutato nel 2005 sugli acini interi è risultato significativamente superiore nelle viti sintomatiche in tutte le fasi fenologiche e in entrambi i vigneti (fig. 7). L'andamento di tale parametro è apparso invece differente nel 2006 quando le determinazioni sono state effettuate sui mosti (fig. 7); in tal caso il livello dei polifenoli totali è risultato superiore nelle viti sintomatiche dei due vigneti, in maniera significativa, solo in concomitanza della fase di invaiatura e tendenzialmente superiore nel vigneto di Giulianova nelle due fasi seguenti. Nel vigneto di Controguerra, nella fase intermedia di maturazione, successiva all'invaiatura, il contenuto dei polifenoli era tendenzialmente inferiore nelle viti sintomatiche rispetto alle viti degli altri due gruppi e nuovamente più elevato nelle prime, ma sempre e solo in modo tendenziale, a maturità di raccolta; tale andamento potrebbe essere imputato a una condizione di sofferenza idrica subita da talune viti, dato il decorso

poco piovoso della fase di post-invaiatura della stagione 2006, considerato il rapporto intercorrente tra la condizione di stress idrico nei periodi vicini all'invaiatura e l'incremento dei polifenoli nelle bacche (Nadal e Arola, 1995; Ojeda *et al.*, 2002).

Sembra plausibile ritenere che l'incremento dei polifenoli totali, particolarmente evidente nelle bacche delle viti sintomatiche, per entrambi i vigneti nel 2005, sia dipeso dalla mancata rimozione di bucce e vinaccioli, parti dell'acino di preferenziale accumulo di tali composti, normalmente eliminate nella produzione dei mosti. Nei mosti delle viti sintomatiche, prodotti nel 2006, tale incremento risultava significativo solo in concomitanza della fase di invaiatura, periodo di massimo accumulo dei polifenoli nella bacca (Lee, 1989).

Tali risultati sembrano mettere in luce una reazione di difesa in atto nelle viti sintomatiche; infatti i principali composti fenolici dei mosti di vitigni a bacca bianca sono acidi fenolici e in particolare gli esteri dell'acido idrossicinnamico. Tali composti sono risultati associati alle reazioni di difesa di primo livello (Friend, 1981; Kurosaki *et al.*, 1986; Niemann *et al.*, 1991), reazioni rapide che hanno l'intento di ostacolare in prima istanza la progressione dei patogeni tramite accumulo di composti fenolici nei siti di infezione che non derivano dalla sintesi ex-novo di tali composti in risposta alla infezione in corso; tali risposte iniziali permettono alla pianta colpita di attivare le strategie "secondarie", meccanismi più lenti che richiedono la trascrizione di geni per la sintesi di composti antimicrobici specifici come le fitoalessine. La presenza significativamente più elevata dei polifenoli totali nei mosti delle viti sintomatiche, in concomitanza dell'invaiatura, potrebbe quindi segnalare un reazione di primo livello in essere, e non può essere esclusa la partecipazione in tali risposte anche di composti flavonoidi, ad esempio flavanoli come le catechine già associate alle risposte di difesa, maggiormente presenti nei vinaccioli, dati i livelli significativamente più elevati dei polifenoli totali riscontrati negli acini interi di viti sintomatiche in tutte le fasi fenologiche del 2005. Nel contesto di una infezione di esca dove i patogeni risiedono nel legno all'interno della pianta e non sono fisicamente presenti nelle matrici vegetali soggette alle determinazioni analitiche si potrebbe ipotizzare una elicitazione da parte delle tossine emesse dai funghi nel legno, e veicolate con la corrente traspiratoria, delle risposte della pianta, che si concretizza nell'accumulo dei composti fenolici già presenti e nella seguente sintesi ex-novo di fitoalessine, non escludendo la partecipazione di tali composti nell'origine delle necrosi fogliari e degli acini nel tentativo di isolare l'effetto delle tossine.

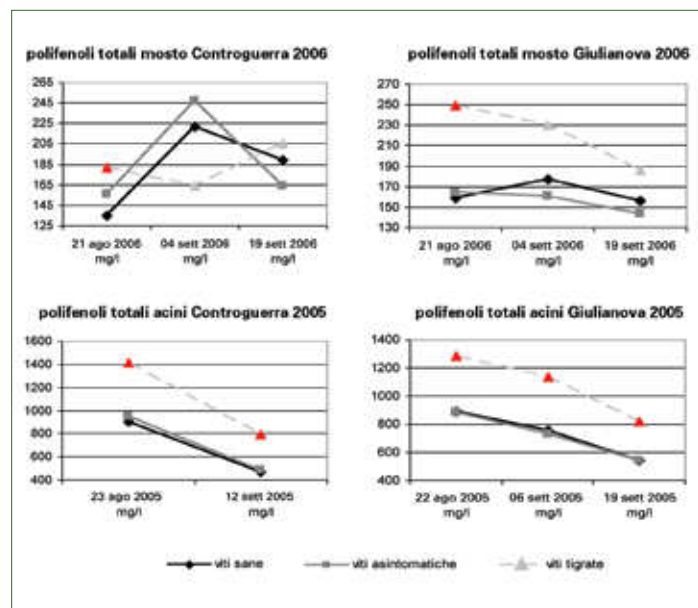


Fig. 7 - Polifenoli totali in mosti e acini interi dei gruppi di viti esaminati. Per ogni data, il colore rosso del simbolo indica una differenza statisticamente significativa della tesi (Student's t-test) rispetto alle piante sane

## VI.2 Stato nutrizionale di viti affette da esca

F. Calzarano\*, C. Amalfitano, L. Seghetti, M. Del Carlo, V. D'Agostino

### VI.2.1 Introduzione

L'indagine, incentrata sulla determinazione dei contenuti di macro- e microelementi in foglie e acini dei tre gruppi di viti descritti e prelevati come nel <sup>es</sup> capitolo VI.1, per tre anni consecutivi dal 2004 al 2006, è stata effettuata nel vigneto di Controguerra oggetto del precedente studio. In prima istanza è stato verificato lo stato nutrizionale delle piante sane del vigneto indagato al fine di disporre di termini di riferimento utili alla valutazione delle eventuali variazioni riscontrate nelle piante malate. Si è proceduto quindi al confronto tra i livelli ottimali dei vari elementi nelle foglie del periodo tra l'allegagione e l'invaiaura con quelli riscontrati nelle piante sane del vigneto esaminato nel medesimo periodo. Data la mancanza di riferimenti per la cv. "Trebiano d'Abruzzo", i dati ottenuti nel periodo utile per tali verifiche, ossia quelli relativi alle prime due fasi fenologiche considerate nello studio, sono stati confrontati con i dati delle fasi corrispondenti desunti da studi nazionali e internazionali su varie cultivars, mediati e riportati da Fregoni (1999). Tali dati sono stati utilizzati anche per valutare eventuali discordanze tra gli andamenti consueti dei diversi elementi nel corso della stagione vegetativa e quelli del vigneto studiato.

### VI.2.2 Materiali e metodi

Ciascun campione originato dagli acini pigiati è stato omogeneizzato in Ultra-Turrax (Ika, Heidelberg, Germania), e una frazione di tale omogeneizzato (100 ml) è stata posta in vial e congelata a  $-18^{\circ}\text{C}$ , quindi liofilizzata (liofilizzatore Christ, Alpha 2-4, Osterode am Harz, Germania). Le polveri così ottenute sono state macinate con un mulino a palle in agata (Retsch, PM 200, Haan, Germania), prima dell'essiccamento in un essiccatore sotto vuoto. L'umidità è stata determinata a  $105^{\circ}\text{C}$ . Una aliquota di ciascuna delle polveri essiccate (500 mg) è stata mineralizzata in tubi di teflon richiudibili ermeticamente con una miscela costituita da 8 ml di  $\text{HNO}_3$  67%. La digestione dei campioni è stata eseguita con digestore a microonde (Milestone, ETHOS900, Shelton, CT-USA) opportunamente programmato. Le soluzioni di digestione raffreddate sono state portate a volume in matracci di plastica da 25 ml con acqua Milli Q e conservate in contenitori di polietilene. Le soluzioni sono state quindi analizzate con spettro-

fotometro di Assorbimento Atomico (AA) a fiamma aria acetilene (Perkin Elmer, Analyst 700, Waltham, MA-USA), previo opportune diluizioni e usando soluzioni standard dei vari elementi di elevata purezza. In assorbimento sono stati determinati Ca, Mg, Zn, Mn e Fe; K e Na in emissione. Il fosforo è stato determinato nelle stesse soluzioni di digestione precedentemente descritte per via colorimetrica con reagente molibdico misurando l'assorbanza delle soluzioni a 525 nm e interpolando i valori di concentrazione con rette di taratura ottenute da soluzioni standard di fosfato di opportuna concentrazione (Murphy e Riley, 1962). L'analisi elementare dell'azoto è stata condotta su 1-2 mg di polveri, pesate accuratamente su bilancia, utilizzando un Analizzatore Elementare HCNS (Fisons, EA 1108, Milano, Italia).

Le foglie, dopo lavaggio con acqua deionizzata, sono state essiccate all'aria, in ambiente ventilato e protetto, su carta assorbente, e poi in stufa a  $70^{\circ}\text{C}$ . Le foglie essiccate sono state quindi polverizzate in mulino a palle come per i liofilizzati degli acini. Infine le polveri sono state tenute in essiccatore sotto vuoto da pompa a olio per 12 ore prima di procedere alle analisi dei macro- e microelementi. Le analisi sono state effettuate su 500 mg di polveri con i metodi già descritti per gli acini.

Tutte le analisi sono state effettuate in duplicato e reso il valore medio.

### VI.2.3 Risultati

I contenuti dei macroelementi delle foglie di piante sane del vigneto esaminato, nelle prime due fasi fenologiche considerate, sono risultati generalmente all'interno degli intervalli ottimali riportati in letteratura; alcune discordanze relative a eccessi di potassio, all'invaiaura, e di fosforo, in entrambe le fasi, sono state rilevate nel 2004, dati i limiti superiori di optimum pari a 14,0 e 2,4 mg/g rispettivamente; nel medesimo anno e in quello seguente è risultato in eccesso anche il contenuto di magnesio, rilevato al di sopra di 3,1 mg/g (optimum di riferimento: 2,3-2,7 mg/g).

Gli andamenti dei macroelementi nelle foglie di piante sane, nel corso della stagione vegetativa, usualmente in crescita nel caso del magnesio e del calcio, e in diminuzione per potassio, azoto e fosforo, sono stati generalmente riscontrati nel vigneto in oggetto, a parte alcune eccezioni rilevate nel 2004 e relative ai livelli di magnesio e calcio apparsi in diminuzione nel tempo. L'ordinaria tendenza alla diminuzione di potassio, azoto e fosforo, è stata riscontrata, a eccezione di una tendenza all'aumento nel passaggio dalla pre-chiusura grappolo all'invaiaura. I livelli di questi elementi, nel 2004 e nelle prime due fasi in particolare, sono risultati i più elevati tra quelli rilevati nel corso dell'intera indagine triennale, probabilmente per la maggiore disponibilità dovuta alle maggiori precipitazioni occorse nel periodo aprile-luglio rispetto ai medesimi periodi degli anni seguenti.

I contenuti di macroelementi nelle foglie di viti asintomatiche sono apparsi sostanzialmente simili a quelli delle foglie di piante sane (*figg. I-2*); tuttavia i livelli di magnesio sono risultati sempre tendenzialmente inferiori nelle prime rispetto alle ultime, sia nel 2004 che nel 2005. In tali anni i livelli di calcio sono sempre risultati superiori nelle foglie di viti asintomatiche, spesso in modo significativo nel 2005. Nel 2006 l'unica differenza tra foglie di viti asintomatiche e sane era relativa a un livello sempre tendenzialmente inferiore di potassio nelle prime.

I livelli di magnesio, potassio e azoto sono apparsi spesso inferiori nelle foglie di viti

\* Università di Teramo email: fcalzarano@unite.it

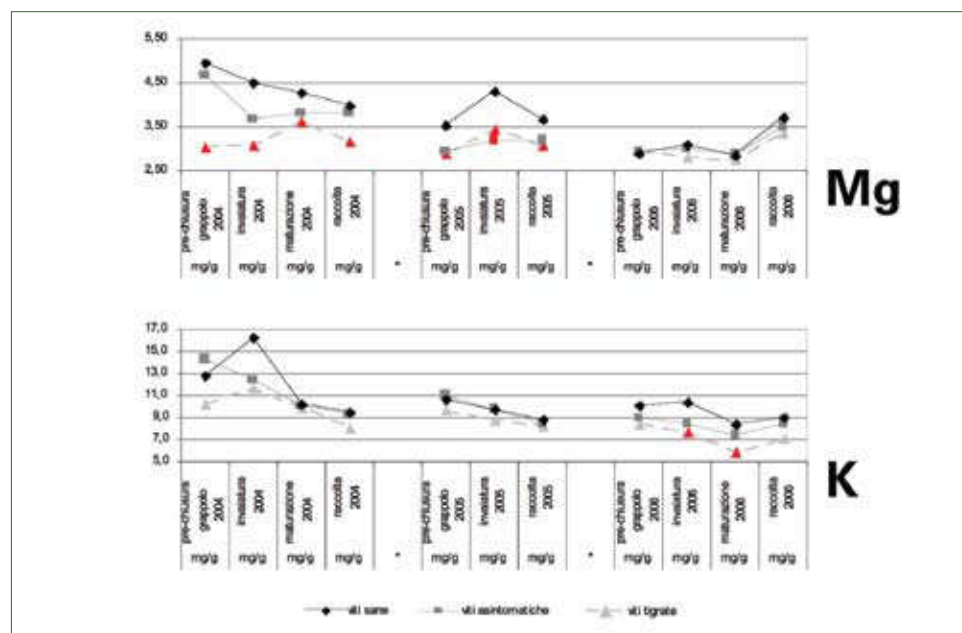


Fig. 1 - Contenuti di magnesio e potassio in foglie di viti malate e sane. Per ogni data, il colore rosso del simbolo indica una differenza statisticamente significativa della tesi (Student's t-test) rispetto alle piante sane

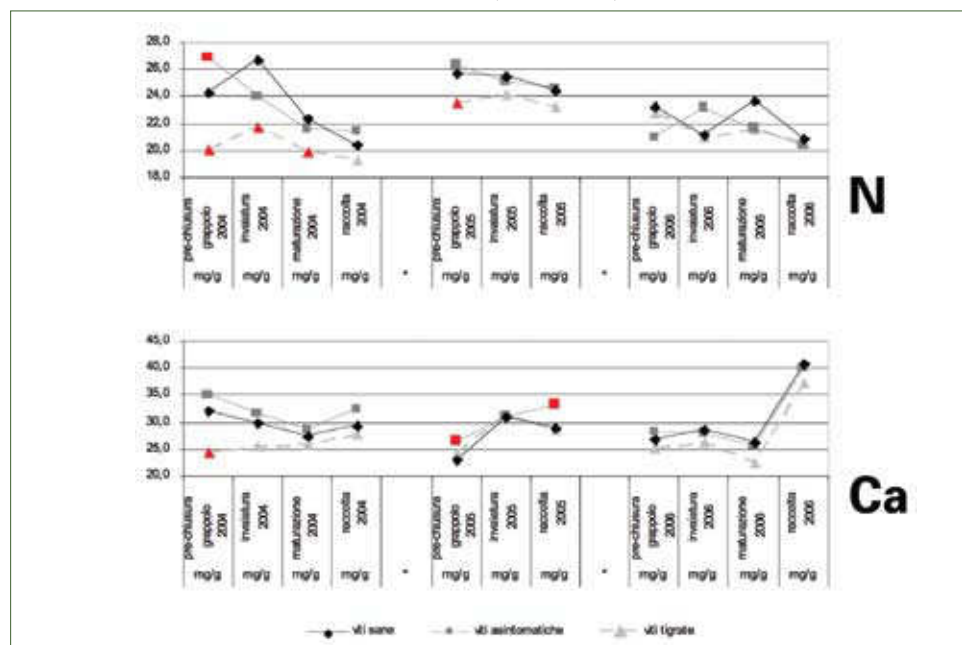


Fig. 2 - Contenuti di azoto e calcio in foglie di viti malate e sane. Per ogni data, il colore rosso del simbolo indica una differenza statisticamente significativa della tesi (Student's t-test) rispetto alle piante sane

sintomatiche e frequentemente in maniera significativa, come nel caso del magnesio in tutte le fasi del 2004 e del 2005, del potassio all'invaiatura e nella fase intermedia di maturazione del 2006, con livelli al di sotto del limite di carenza (< 10 mg/g), e per l'azoto nel 2004 e nella pre-chiusura del 2005 (figg. 1-2). Anche fosforo e calcio sono apparsi spesso tendenzialmente inferiori nelle foglie di viti sintomatiche.

Mentre negli acini di viti sane e asintomatiche è stato sempre possibile osservare, in occasione della raccolta, una ordinaria tendenza alla diminuzione dei macroelementi salificanti e di fosforo e azoto, rispetto alle fasi precedenti, e livelli non dissimili tra i due gruppi di viti per i vari elementi, nelle bacche delle viti sintomatiche è stato registrato un generale arricchimento di tali elementi, in maniera frequentemente significativa all'invaiatura e alla maturità di raccolta (figg. 3-4).

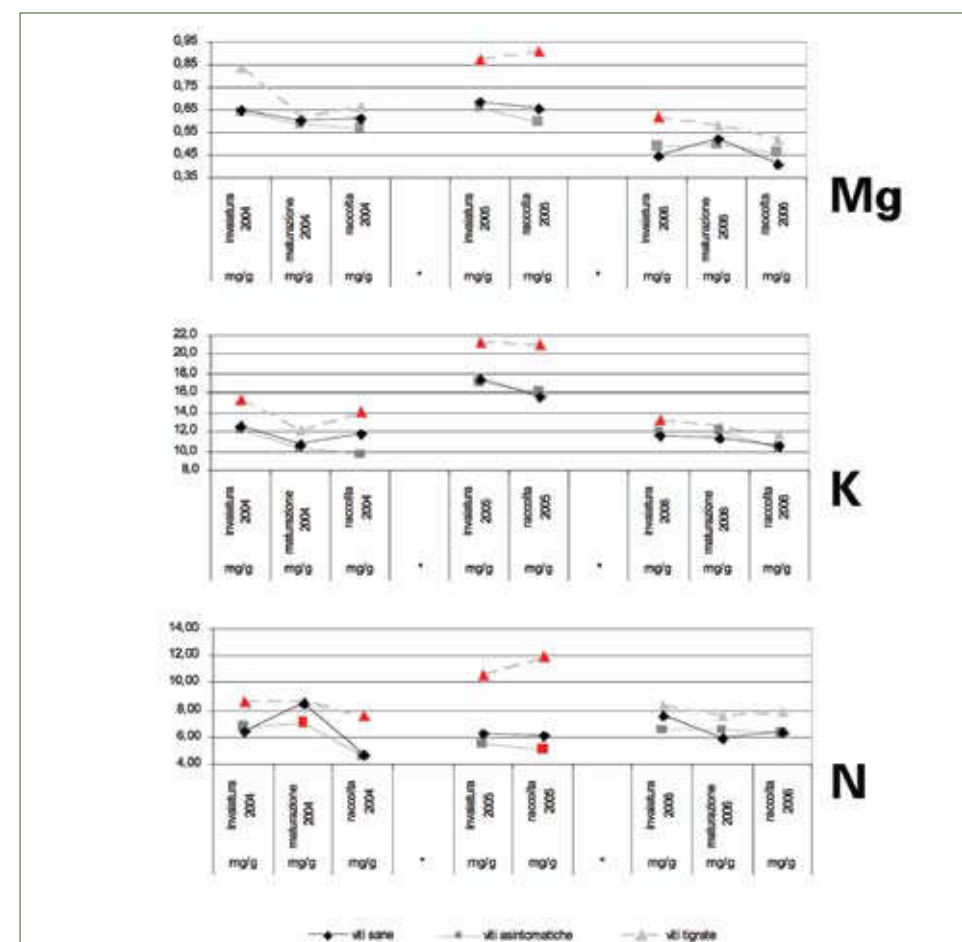


Fig. 3 - Contenuti di magnesio, potassio e azoto in acini di viti malate e sane. Per ogni data, il colore rosso del simbolo indica una differenza statisticamente significativa della tesi (Student's t-test) rispetto alle piante sane



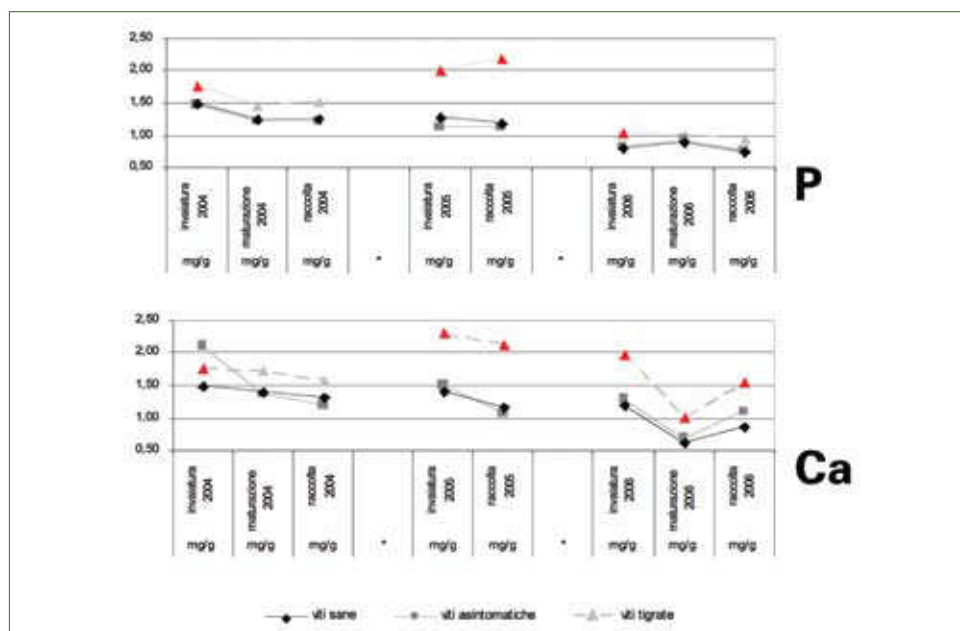


Fig. 4 - Contenuti di fosforo e calcio in acini di viti malate e sane. Per ogni data, il colore rosso del simbolo indica una differenza statisticamente significativa della tesi (Student's t-test) rispetto alle piante sane

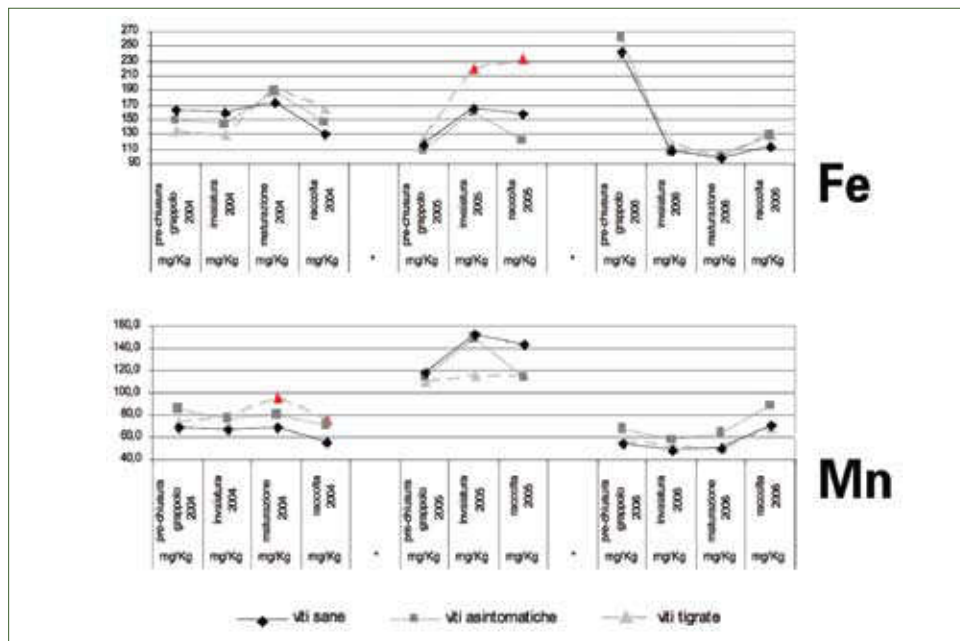


Fig. 5 - Livelli di ferro e manganese in foglie di viti malate e sane. Per ogni data, il colore rosso del simbolo indica una differenza statisticamente significativa della tesi (Student's t-test) rispetto alle piante sane

Nelle foglie di viti sintomatiche è stata osservata una tendenza a un maggiore accumulo di ferro, rispetto alle viti sane, col procedere della stagione; in particolare i contenuti dell'elemento sono apparsi tendenzialmente superiori nel 2004 dalla fase intermedia di maturazione, e nel 2006 dall'invaiaitura, alla maturità di raccolta; nel 2005 in ogni fase e in maniera significativa fin dall'invaiaitura (fig. 5).

I contenuti di manganese nelle foglie di piante sintomatiche sono apparsi meno omogenei e incostanti nei tre anni: significativamente superiori all'invaiaitura e nella fase intermedia di maturazione nel 2004, tendenzialmente inferiori nel 2005 e sostanzialmente simili nel 2006, rispetto a quelli rilevati nelle foglie di piante sane (fig. 5). I livelli di zinco sono apparsi sostanzialmente simili nei tre gruppi di viti, in ognuno dei tre anni, con l'eccezione di livelli inferiori e significativi nelle foglie di piante asintomatiche all'invaiaitura negli anni 2004 e 2006.

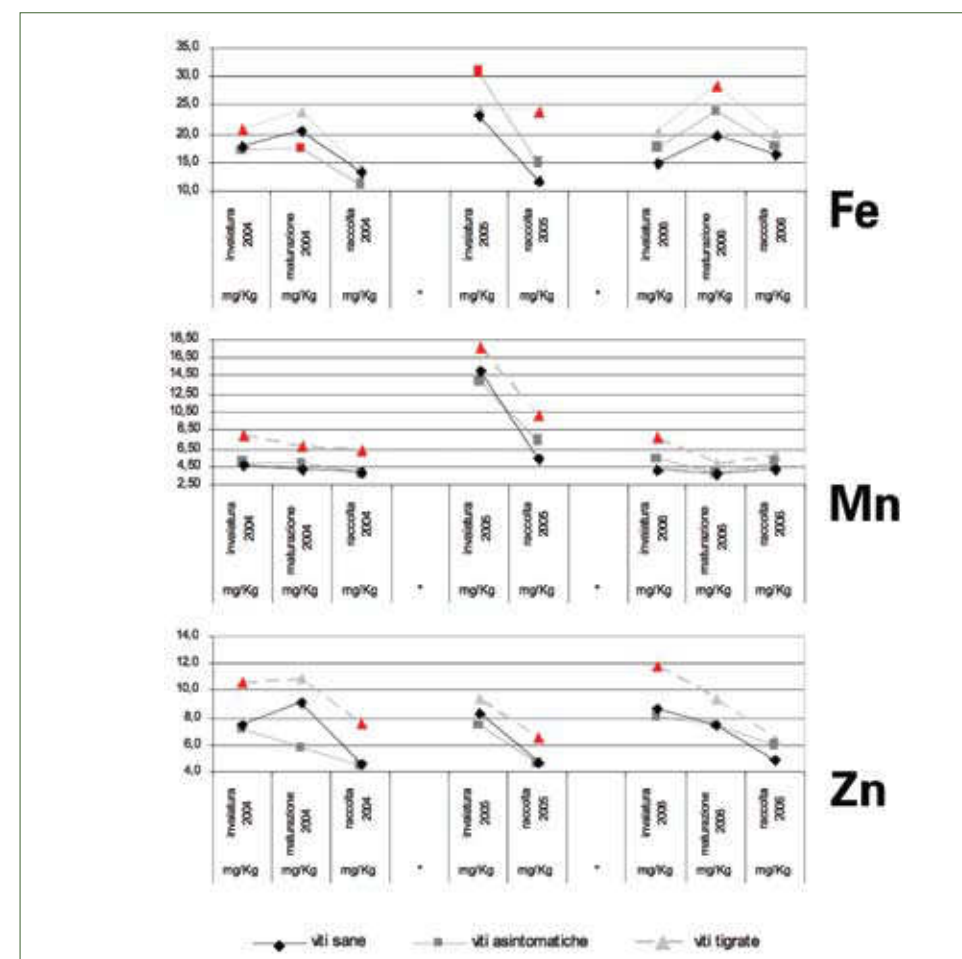


Fig. 6 - Livelli di ferro, manganese e zinco in acini di viti malate e sane. Per ogni data, il colore rosso del simbolo indica una differenza statisticamente significativa della tesi (Student's t-test) rispetto alle piante sane

Negli acini di viti sintomatiche, al pari di quanto osservato per i macroelementi, i livelli di ferro, manganese e zinco sono risultati spesso significativamente maggiori rispetto agli acini di viti sane e in ogni caso tendenzialmente superiori; viceversa negli acini di viti asintomatiche non sono state evidenziate differenze di rilievo, a eccezione di occasionali valori significativamente differenti (fig. 6).

#### VI.2.4 Discussione

Le viti sane del vigneto esaminato sono risultate in equilibrio nutrizionale, pur considerando alcune leggere carenze di potassio, fosforo e azoto registrate nel 2005 e 2006 e viceversa moderati eccessi di potassio e magnesio nel 2004. In tale anno, probabilmente, le concimazioni di fondo insieme alle abbondanti precipitazioni cadute fin dall'inizio della stagione vegetativa hanno determinato una superiore assimilazione dei nutrienti segnalata dai livelli tendenzialmente superiori dei macroelementi e dalle maggiori produzioni, rilevati anche nel 2005 ma non nel 2006, quando non sono state effettuate concimazioni e l'entità delle precipitazioni è stata inferiore, in particolare all'inizio della stagione, in confronto ai primi due anni esaminati. Ciò si è verificato nonostante la superiore incidenza dei sintomi di esca nel 2004 e nel 2005, rispetto al 2006, a riprova delle maggiori disponibilità di nutrienti in tali anni.

Nelle foglie di piante malate non sono stati riscontrati generalmente contenuti di fosforo e microelementi inferiori a quelli determinati nelle foglie di piante sane, nonostante la difficoltà di captazione di tali elementi in un suolo alcalino come quello del vigneto esaminato, indicando soddisfacenti capacità di trasporto e attività radicale delle piante malate. Nelle foglie di viti asintomatiche anche i contenuti degli altri elementi non sono risultati significativamente differenti rispetto a quelli delle foglie di viti sane segnalando un sostanziale equilibrio nutrizionale anche in tali piante.

Nelle foglie sintomatiche sono stati determinati livelli inferiori, spesso significativi, di potassio, magnesio e azoto, elementi legati alle funzionalità fotosintetiche. Data la presenza di disfunzioni del PSII accertate nelle foglie già prima della manifestazione dei sintomi (Christen *et al.*, 2007), la riduzione del contenuto di clorofille e rubisco nelle foglie asintomatiche di tralci sintomatici e nelle parti verdi di foglie sintomatiche, nonché una maggiore chiusura degli stomi non solo in queste ultime ma anche nelle foglie asintomatiche di tralci sintomatici (Petit *et al.*, 2006), risulta possibile ipotizzare che gli inferiori contenuti degli elementi citati, determinati nello studio in oggetto nelle foglie manifestanti la tigratura, possano essere dipesi da una loro progressiva ritraslocazione iniziata già prima della chiara evidenza del sintomo.

La presenza negli acini di viti sintomatiche di livelli superiori di tutti gli elementi, e non solo di potassio, magnesio e azoto, lascia supporre che tali acini abbiano accumulato elementi ad azione salificante per via xilematica, e probabilmente già a partire da periodi anteriori all'inviatura, dati gli elevati livelli di acidità totale (riscontrati in tale fase fenologica, nel medesimo vigneto <sup>☞</sup> capitolo VI.1), nel tentativo di neutralizzare il contenuto acidico.

Il contenuto superiore di azoto nelle bacche di viti sintomatiche, peraltro costantemente rinvenuto anche in studi precedenti, potrebbe invece essere attribuito a contenuti maggiori di sostanze amminoacidiche come la prolina, accumulate in risposta allo stress dovuto alla

malattia (Calzarano *et al.*, 2001; 2004b; 2007). L'innescò di risposte di difesa delle piante colpite, sia di primo che di secondo livello, potrebbe essere segnalato dalla concentrazione dei polifenoli totali (<sup>☞</sup> capitolo VI.1) e dall'aumento dei livelli di trans-resveratrolo nelle bacche e nelle foglie di tali piante (Calzarano *et al.*, 2004b e <sup>☞</sup> capitolo VI.3). Tali risposte potrebbero avere influenzato anche i contenuti di ferro, risultati generalmente superiori nelle foglie di viti sintomatiche, forse indicativi di una maggiore attivazione dei complessi enzimatici di cui l'elemento è cofattore, ad esempio le superossidodismutasi (SOD), che intervengono nella risposta a stress di vario genere (Marschner, 1998). Tuttavia un contenuto di ferro maggiore nelle foglie sintomatiche era già stato osservato e ascritto a una mobilitazione dell'elemento, dovuta alla capacità dei funghi, durante il processo di colonizzazione del legno, di complessare e stabilizzare il ferro nella forma ferrosa (Di Marco *et al.*, 2001).

Mentre gli inferiori contenuti di magnesio e azoto sono stati osservati nelle foglie tigrate, rispetto alle foglie di viti sane, nel 2004 e nel 2005, i decrementi di potassio in tali foglie riguardavano la stagione 2006, in particolare i periodi più caldi, e interessavano, pur se solo in modo tendenziale, anche le foglie di viti asintomatiche. In condizioni critiche di assimilazione, come quelle che possono essersi verificate nel 2006 per la mancanza di concimazioni e la scarsità di acque meteoriche, l'approvvigionamento del potassio da parte delle piante malate sembrerebbe maggiormente penalizzato; ciò potrebbe segnalare una maggiore sensibilità alla disponibilità d'acqua delle piante malate, forse a causa della parziale alterazione della vascolarizzazione, in considerazione delle perdite di potassio dai cloroplasti che si verificano nelle sofferenze idriche (Marschner, 1998). Una ridotta disponibilità d'acqua e minori contenuti di potassio potrebbero ridurre ulteriormente la capacità delle piante sintomatiche di sintetizzare e traslocare i carboidrati; in effetti proprio nel 2006 sono stati registrati il minor contenuto di zuccheri alla raccolta, negli acini di viti sintomatiche dei tre anni di studio (<sup>☞</sup> capitolo VI.1), e simili livelli di magnesio e azoto nei tre gruppi di piante che potrebbero indicare la mancata ritraslocazione di tali elementi dalle foglie lesionate per via della riduzione dei flussi floematici dai siti "source".

Nei primi due anni di studio, la probabile maggiore assimilabilità di nutrienti, indicata anche dalle maggiori produzioni ottenute, rispetto al 2006, potrebbe aver contribuito all'incremento di incidenza dei sintomi fogliari, risultata invece più contenuta nell'ultimo anno esaminato. Quanto osservato risulta in linea con l'effetto di incremento dei sintomi determinato in parcelle trattate con concimi fogliari in ognuno degli anni di sperimentazione (Calzarano *et al.*, 2007; <sup>☞</sup> capitolo VII.6). Il regime nutrizionale delle viti malate potrebbe quindi avere un ruolo nella manifestazione dei sintomi, collegato forse alla disponibilità di nutrienti per gli agenti patogeni. Quando tali disponibilità nelle piante malate sono elevate, la maggiore sintesi e traslocazione dei carboidrati verso i siti d'infezione potrebbe favorire i funghi responsabili; viceversa una condizione di ridotta disponibilità d'acqua e di nutrienti, in particolare di potassio, potrebbe determinare una minore attività fotosintetica nelle piante malate e la prevalente traslocazione di zuccheri verso gli organi riproduttivi col fine di portarli a maturazione, penalizzando quella per accumuli di riserva in tronchi e branche dove risiedono i funghi dell'esca. Ciò è quanto potrebbe essersi verificato nel 2006, anno di minore produzione e di accentuato mascheramento dei sintomi, contraddistinto dalla mancata concimazione e dalla minore disponibilità d'acqua rispetto agli anni precedenti, nel

quale è stato osservato un superiore contenuto di zuccheri, rispetto alle annate precedenti, nelle uve di viti sane, come normalmente si verifica in stagioni siccitose (Fregoni, 1999).

Ulteriori approfondimenti dovranno essere effettuati sul potenziale ruolo del calcio nell'incremento delle difese dell'ospite, dati i contenuti di tale elemento, poco traslocabile, nelle foglie di piante sintomatiche, sempre tendenzialmente inferiori a quelli delle asintomatiche, che invece mostravano spesso tenori superiori rispetto alle sane. Il calcio ha un ruolo di rinforzo delle lamelle mediane e delle membrane (Legge *et al.*, 1982) e ha la capacità di modulare l'attività di risposta a stress (Datnoff *et al.*, 2007). D'altra parte è nota la capacità del calcio di rendere meno suscettibili le piante a malattie di diverso genere anche agendo direttamente sui patogeni (Datnoff *et al.*, 2007).

Quindi, una maggiore virulenza e capacità di espandersi dei funghi pectinolitici *Phaeoacremonium aleophilum* e *Phaeoconiella chlamydospora*, in condizioni di miglior stato nutrizionale e di minor resistenza dei tessuti dell'ospite, come quelle che potrebbero essersi determinate nel 2004 e nel 2005, potrebbero comportare una maggiore probabilità di comparsa dei sintomi rendendo più efficienti, ad esempio, i meccanismi di rilascio di tossine, già ipotizzate come coinvolte nella comparsa delle manifestazioni fogliari (Evidente *et al.*, 2000; Tabacchi *et al.*, 2000).

## VI.3 Contenuto di *trans*-resveratrolo in foglie e acini di viti colpite da esca

F. Calzarano\*, C. Amalfitano, L. Seghetti, M. Del Carlo, V. D'Agostino

### VI.3.1 Introduzione

In entrambi i vigneti di Controguerra e Giulianova, già descritti nel <sup>☞</sup> capitolo VI.1, è stata effettuata un'indagine con lo scopo di rilevare i livelli e le fluttuazioni del *trans*-resveratrolo nelle foglie e negli acini di viti malate durante la stagione vegetativa, per quattro e tre anni consecutivi, nel primo e secondo vigneto rispettivamente. La metodologia di prelievo dei campioni e le fasi fenologiche interessate sono state quelle descritte nel <sup>☞</sup> capitolo VI.1; invece, il trattamento dei campioni, l'estrazione e le analisi del composto sono stati effettuati secondo un metodo messo a punto dopo aver effettuato confronti di differenti protocolli operativi (Calzarano *et al.*, 2008).

### VI.3.2 Materiali e metodi

#### *Estrazione da foglie*

Ogni campione di 10 foglie di vite è stato immerso in azoto liquido per 1 minuto; una volta estratte dal bagno di azoto le foglie sono state finemente triturate con un omogeneizzatore (Modello A505, Moulinex, Francia) per 30 secondi. Tre grammi del materiale ottenuto sono stati sottoposti a estrazione con 15 ml di solvente, utilizzando una miscela etanolo:acqua in rapporto 4:1 v/v con un Ultraturrax (IKA, Milano, Italia) per 5 minuti a 15.000 rpm in bagno di ghiaccio. La miscela è stata sottoposta a centrifugazione (6.000 rpm per 3 minuti), il surnatante prelevato, mentre il solido è stato sottoposto a una seconda estrazione nelle stesse condizioni. Dopo centrifugazione le due fasi liquide sono state riunite e portate a secco, sotto vuoto, a 35°C, 100 rpm, con un Rotavapor (Steroglas, Perugia, Italia). Il residuo è stato ripreso in 1 ml di etanolo e tenuto al buio a 4°C fino al momento dell'analisi.

#### *Estrazione da acini*

Ogni campione, costituito da 200 g di acini, è stato immerso in azoto liquido per 1 minuto; gli acini, una volta estratti dal bagno di azoto, sono stati finemente tritati con un omogeneizzatore (Modello BL470, Amstrad, Milano, Italia) per 1 minuto. Tre grammi del materiale ottenuto sono stati sottoposti a estrazione con 15 ml di solvente, utilizzando una

\* Università di Teramo email: fcalzarano@unite.it

miscela cloroformio:etilacetato in rapporto 1:1 v/v con un Ultraturax (IKA, Milano, Italia) per 5 minuti a 15.000 rpm in bagno di ghiaccio. La miscela è stata sottoposta a centrifugazione (6.000 rpm per 3 minuti), il surnatante prelevato, mentre il solido è stato sottoposto a una seconda estrazione nelle stesse condizioni. Dopo centrifugazione le due fasi liquide sono state riunite e portate a secco, sotto vuoto, a 35°C, 100 rpm, con un Rotavapor (Stegrogas, Perugia, Italia). Il residuo è stato ripreso in 1 ml di etanolo e tenuto al buio a 4°C fino al momento dell'analisi.

**Analisi in HPLC**

I campioni, filtrati su filtro di cellulosa da 0,45 µm, sono stati analizzati in HPLC con un cromatografo HPLC serie 200 (Perkin Elmer, Monza, Italia) equipaggiato con rivelatore UV a 307 nm. La colonna utilizzata è stata una RP-C18, ID 3 mm Grace Vydac (Grace Vydac, Bologna, Italia). Il gradiente utilizzato era dato da acetonitrile (solvente A) e una miscela acqua:acido acetico 99:1 v/v secondo il seguente programma: 7 minuti 10% A, poi fino a 70% di A in 30 minuti, 5 minuti 70% A, poi fino a 10% di A in 15 minuti. Il volume di iniezione è stato di 20 µl.

**VI.3.3 Risultati e discussione**

Nelle foglie sintomatiche di entrambi i vigneti sono stati determinati livelli superiori di *trans*-resveratrolo sempre statisticamente significativi, rispetto a quelli rilevati nelle foglie di piante sane, in occasione della pre-chiusura e alla maturità di raccolta (figg. 1-2). I contenuti delle foglie di viti sintomatiche si discostavano particolarmente da quelli degli altri gruppi di piante nella fase di pre-chiusura grappolo. In questa fase è stato registrato il massimo accumulo della sostanza che, in ogni caso, tendeva a decrescere procedendo verso la maturazione, sebbene non linearmente. Sovente, i contenuti delle foglie di viti asintomatiche, di minore entità rispetto a quelli delle foglie sintomatiche, sono risultati superiori a quelli delle foglie di piante sane; tale differenza tra i due gruppi di viti era sempre significativa a maturità di raccolta, con la sola eccezione riscontrata nel 2007 nel vigneto di Giulianova. Nel vigneto di Controguerra i livelli delle foglie di viti asintomatiche erano sempre tendenzialmente intermedi tra quelli delle foglie tigrate e quelli delle foglie di viti sane e spesso significativi rispetto a queste ultime; nell'altro impianto tale collocamento intermedio nei tre gruppi di viti delle foglie di viti asintomatiche, se pur presente in molti casi appariva comunque meno delineato.

Gli acini di viti sintomatiche di entrambi i vigneti hanno permesso di rilevare livelli di *trans*-resveratrolo sempre più elevati, e in maniera significativa, in tutte le fasi fenologiche, con l'unica eccezione della fase di invaiatura a Giulianova nel 2006, in occasione della quale, a ogni modo, il dato degli acini di viti sintomatiche risultava di molto superiore a quello riscontrato negli acini di viti sane, anche se solo tendenziale (figg. 3-4). La massima concentrazione della sostanza nelle bacche di viti sintomatiche è stata osservata nella fase intermedia di maturazione (post-invaiatura). In seguito, in occasione della raccolta, si è assistito a un marcato decremento. Anche nelle determinazioni analitiche effettuate sugli acini può essere segnalata la posizione intermedia dei dati raccolti nelle viti asintomatiche rispetto agli altri

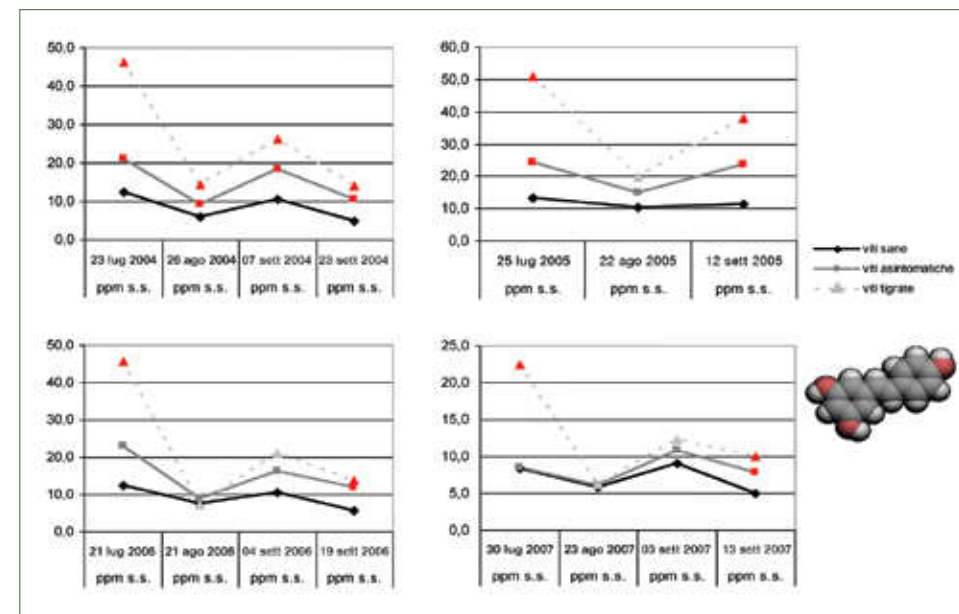


Fig. 1 - Contenuto di *trans*-resveratrolo in foglie di viti malate e sane - Controguerra. Per ogni data, il colore rosso del simbolo indica una differenza statisticamente significativa della tesi (Student's t-test) rispetto alle piante sane

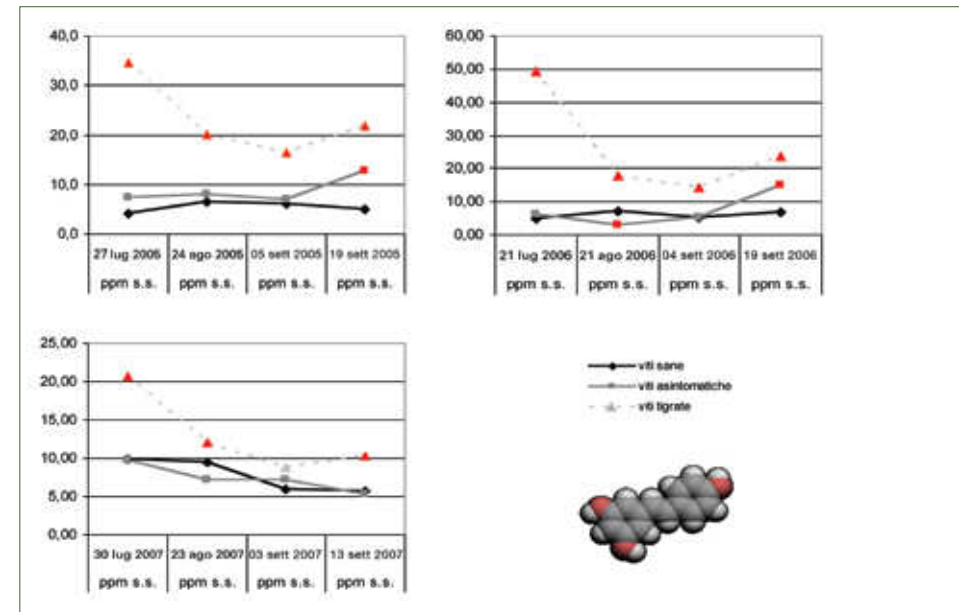


Fig. 2 - Contenuto di *trans*-resveratrolo in foglie di viti malate e sane - Giulianova. Per ogni data, il colore rosso del simbolo indica una differenza statisticamente significativa della tesi (Student's t-test) rispetto alle piante sane

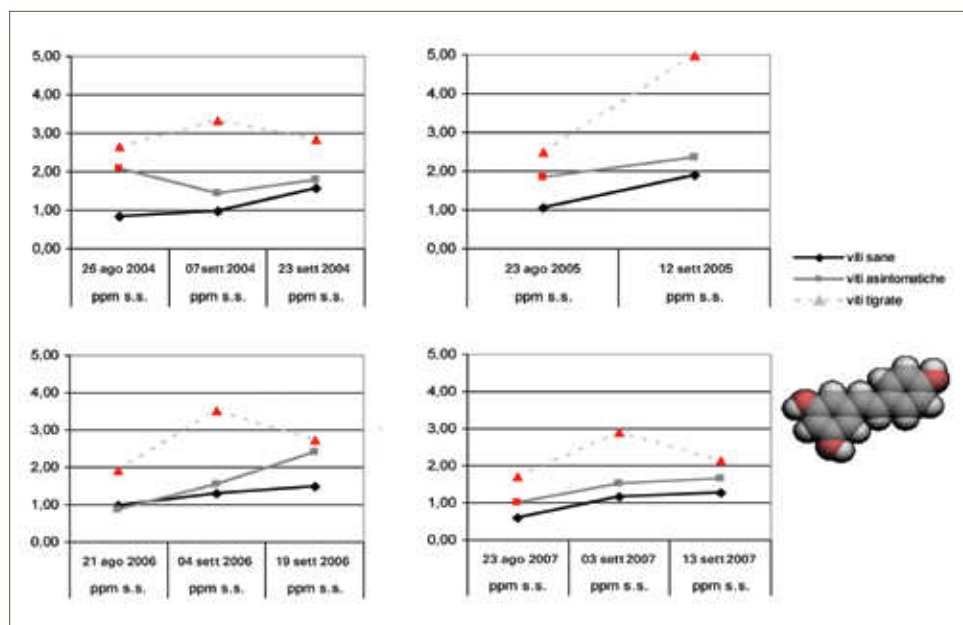


Fig. 3 - Contenuto di trans-resveratrolo in acini di viti malate e sane - Controguerra. Per ogni data, il colore rosso del simbolo indica una differenza statisticamente significativa della tesi (Student's t-test) rispetto alle piante sane

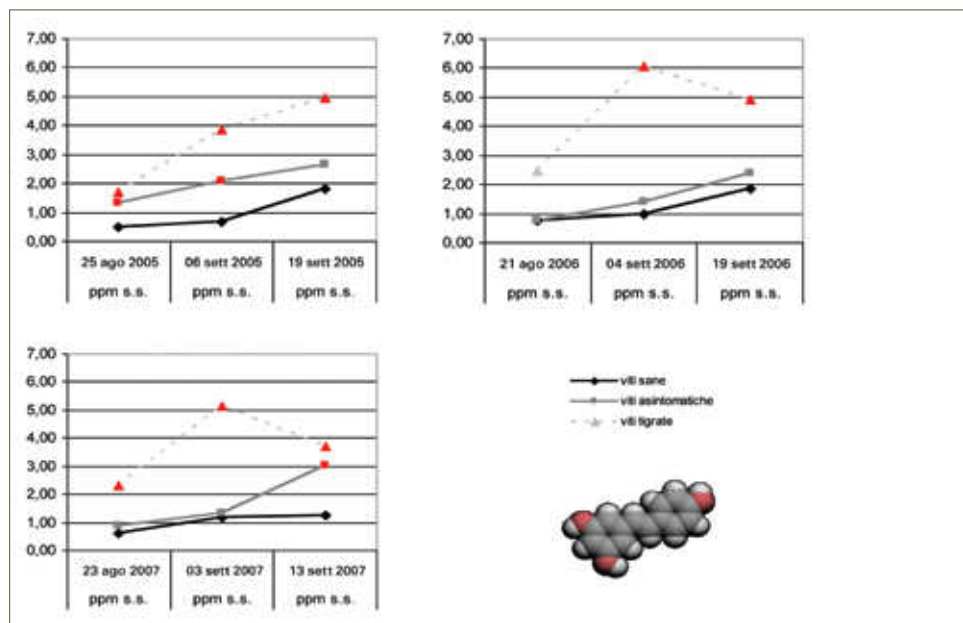


Fig. 4 - Contenuto di trans-resveratrolo in acini di viti malate e sane - Giulianova. Per ogni data, il colore rosso del simbolo indica una differenza statisticamente significativa della tesi (Student's t-test) rispetto alle piante sane

due gruppi, superiori e in modo significativo rispetto a quelli risultati nelle piante sane, nella maggior parte dei casi, in concomitanza dell'invaiaura. L'andamento riscontrato sia negli acini di viti sane che in quelli di viti asintomatiche è apparso differente da quello delle viti sintomatiche, ossia in aumento, sebbene non sempre evidente dall'invaiaura alla raccolta.

I risultati sembrano mettere in luce la presenza di una risposta di difesa variabile in intensità nelle piante malate sintomatiche e asintomatiche e nelle diverse fasi fenologiche considerate. La presenza tendenziale e talvolta significativa di livelli superiori di *trans*-resveratrolo nelle foglie e acini di viti asintomatiche potrebbe segnalare l'induzione sistemica di tale risposta data l'assenza di lesioni sulle matrici vegetali osservate di tali piante, o in alternativa la veicolazione dal legno infetto di quantitativi di tossine insufficienti per la determinazione del sintomo, ma tali da elicitarne la sintesi del *trans*-resveratrolo negli organi raggiunti.

Il livello nettamente superiore osservato nelle parti di chioma considerate delle viti sintomatiche potrebbe essere dovuto alla somma dei quantitativi della sostanza dovuti alla risposta sistemica della pianta con quelli generati localmente, negli acini e nelle foglie dalla presenza di lesioni (Jeandet *et al.*, 1995).

Una ipotesi alternativa potrebbe vedere il coinvolgimento del *trans*-resveratrolo nella comparsa dei sintomi dovuti in tal caso all'innescò di una risposta di difesa incontrollata tale da produrre livelli tanto elevati da risultare tossici e con esiti necrotici nelle varie parti dell'apparato epigeo come foglie e acini; la produzione di tali effetti necrotici potrebbe sempre essere dovuta alla somma dei quantitativi della sostanza dovuti alla induzione sistemica e a quella localizzata, o a una interazione tra tossine prodotte dai funghi, e veicolate con la corrente traspiratoria, e quantitativi elevati di *trans*-resveratrolo, come quelli riscontrati nelle viti sintomatiche, risultante nella produzione di composti tossici.

Il livello di *trans*-resveratrolo particolarmente elevato nelle foglie a luglio, periodo che vedrebbe l'innescò dei meccanismi passibili di generare i sintomi fogliari, dati gli effetti delle piogge o di trattamenti nutrizionali in tale periodo, che sono sembrati determinare entrambi una superiore espressione dei sintomi (Calzarano *et al.*, 2007), sembrerebbe collimare con la caratteristica peculiare delle fitoalessine di accumularsi nel momento idoneo a favorire il fenomeno di resistenza (Hart, 1981).

Negli acini di viti sintomatiche il livello più elevato di *trans*-resveratrolo registrato i primi di settembre (poco dopo l'invaiaura) dovuto probabilmente all'accumulo di stilbene-sintasi, decresce procedendo verso la maturazione per via della competizione che si creerebbe tra stilbene-sintasi e calcone-sintasi, enzima responsabile della sintesi di altri polifenoli (Creasy e Coffee, 1988; Bais *et al.*, 2000).

Infine è da segnalare la presenza costitutiva di *trans*-resveratrolo non solo nel legno ma anche in foglie e acini di viti sane.

Solo il proseguimento degli studi effettuati con il fine di valutare l'eventuale partecipazione del *trans*-resveratrolo, o la sua interazione con le tossine secrete dai funghi dell'esca, nell'occorrere dei sintomi fogliari potranno permettere avanzamenti nella comprensione di tali meccanismi mai indagati prima.

### VI.3.4 Conclusioni generali

La conferma di decrementi qualitativi irrilevanti nelle uve di viti malate asintomatiche permette di consigliare la loro vinificazione insieme alle uve di viti sane senza il pericolo di incorrere in scadimenti dei vini ottenuti. Tale evidenza ribadisce l'importanza degli studi finalizzati alla comprensione dei meccanismi all'origine dei sintomi fogliari e dei conseguenti interventi finalizzati al loro contenimento.

La possibilità di ottenere vini ad alto contenuto di polifenoli, con effetti di stabilizzazione e lunga conservazione del prodotto, o ad alto tenore di *trans*-resveratrolo, con conseguenti effetti benefici sulla fisiologia umana, potrebbe essere considerata nei vitigni delle aree vitate del centro e sud Italia, a elevato livello zuccherino e tenore alcolico.

I risultati sortiti nell'ambito degli studi sullo stato nutrizionale delle viti colpite e dei livelli del *trans*-resveratrolo in foglie e acini di viti malate, durante la stagione vegetativa, rappresentano un punto di partenza per indagini più mirate volte alla comprensione della fisiologia delle piante affette da esca e in generale all'ampliamento delle conoscenze relative alla malattia.

## VI.4 Parametri biochimici correlabili alla qualità e allo stress in grappoli vinificabili di viti sintomatiche per l'esca in vigneti dell'Emilia-Romagna

F. Osti\*, G. Bertazza, S. Di Marco

### VI.4.1 Introduzione

L'esca si manifesta su piante adulte attraverso la caratteristica tigratura fogliare, alterazione che compromette la funzionalità fotosintetica (Mugnai *et al.*, 1999; Petit *et al.*, 2006; Surico *et al.*, 2006), e/o attraverso macchioline scure sugli acini, note come "black measles" (Hewitt, 1957; Dubos e Larignon, 1988; Chiarappa, 2000). Calzarano e collaboratori hanno indagato gli effetti dell'esca nei confronti della composizione zuccherina, acidica, fenolica e minerale del mosto proveniente da impianti commerciali della regione Abruzzo, segnalando una effettiva alterazione del livello di alcune sostanze (Calzarano *et al.*, 2001; 2004). In Emilia-Romagna e nella provincia di Bologna in particolare, sono stati svolti esperimenti volti a verificare l'eventuale alterazione di alcuni parametri biochimici che possano essere indicativi della qualità dell'uva di piante sintomatiche al momento della vendemmia. Il forte legame più volte proposto tra l'esca e le condizioni idriche della vite (Tyree e Sperry, 1989; Surico *et al.*, 2000; Edwards e Pascoe, 2004; Marchi *et al.*, 2006; Edwards *et al.*, 2007), hanno inoltre suggerito di valutare preliminarmente le modificazioni del contenuto di inositolo, sostanza considerata un marcatore molecolare di stress, particolarmente di quelli idrici, anche nella vite (Xiong *et al.*, 2002; Ferree e Streeter, 2004).

Scopo del lavoro è stato quello di caratterizzare in modo complessivo l'effetto della manifestazione dell'esca da sola o in associazione con interferenze di origine stagionale su parametri di qualità della produzione o di stress delle viti colpite.

### VI.4.2 Materiali e metodi

Ogni anno, dal 2003 al 2006, in 8 vigneti caratterizzati da 5 cultivar (*tab. 1*), situati in diversi comprensori della provincia di Bologna, sono state individuate viti "sintomatiche" e "asintomatiche".

Un uguale numero di grappoli sono stati prelevati a maturazione di raccolta da 5 viti sintomatiche e da 5 viti asintomatiche di ciascun vigneto. Il campionamento delle bacche è stato effettuato in laboratorio immediatamente dopo la raccolta prelevando 50 acini per grappolo secondo uno schema casuale. Gli acini provenienti dai diversi grappoli del mede-

\* CNR - IBIMET, Bologna email: f.osti@ibimet.cnr.it

Tab. 1 - Caratteristiche dei vigneti bolognesi oggetto dell'indagine

Impianto				Incidenza annuale di esca	
Cultivar	età*	giacitura	n. piante	min.**	max.***
Albana	15	pianura	200	9,5	11,6
Montuni	13	pianura	300	8,8	54,0
Pignoletto	15	collina	500	1,6	11,5
Pignoletto	14	pianura	500	1,7	9,2
Pignoletto	13	pianura	300	1,6	14,4
Pignoletto	14	pianura	200	0,86	4,7
Sangiovese	11	collina	500	2,1	11,2
Trebbiano	15	pianura	550	0,7	8,9

\* Dato riferito al 2003, anno di inizio dell'indagine.

\*\* Valore minimo di incidenza annuale registrato nell'impianto durante il periodo di indagine.

\*\*\* Valore massimo di incidenza annuale registrato nell'impianto durante il periodo di indagine.

simo campo e della medesima tesi ("viti sintomatiche" o "viti asintomatiche") sono poi stati riuniti e il campione è stato conservato a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Gli acini ghiacciati sono stati rapidamente macinati e ricollocati, ancora ghiacciati, a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Le sostanze da analizzare sono state estratte per 12 ore da 5 g di campione macinato addizionato di 25 mg di fenil-gluco-piranoside quale standard interno, utilizzando come solvente 50 ml di soluzione tampone imidazolo 0,05 M pH 7:etanolo (8:2; v:v). La fase liquida è stata successivamente separata dalla fase solida per centrifugazione e conservata, mentre la fase solida ha subito una nuova estrazione in 50 ml di tampone imidazolo 0,05 M pH 7:etanolo (2:8; v:v) per ulteriori 12 ore. Un'ulteriore centrifugazione ha permesso la separazione tra le fasi liquida e solida e le fasi liquide delle due estrazioni successive sono state riunite. Un'aliquota pari a 2 ml dell'estratto riunito è stata essiccata mediante flusso d'aria. Il residuo secco di ogni campione è stato sciolto a  $50^{\circ}\text{C}$  per 2 ore con 400  $\mu\text{l}$  di piridina e successivamente silanizzato a  $50^{\circ}\text{C}$  per 2 ore con 400  $\mu\text{l}$  di una soluzione di piridina:esametil disilazano:trimetilclorosilano (1:2:1; v:v:v). Un volume pari a 0,5  $\mu\text{l}$  del campione derivatizzato è stato iniettato in un gas-cromatografo CP 9000 (Chrompack) equipaggiato con iniettore splitter, detector a ionizzazione di fiamma e colonna capillare CP SIL 5 CB MS (15 m, ID 0,25 mm, df 0,25  $\mu\text{m}$  - Chrompack). La separazione è stata iniziata alle temperature di esercizio, corrispondenti a  $330^{\circ}\text{C}$  per l'iniettore,  $350^{\circ}\text{C}$  per il detector e  $120^{\circ}\text{C}$  per il forno. Un minuto dopo l'inizio della separazione è stato imposto un incremento programmato a gradiente variabile della temperatura del forno fino a  $350^{\circ}\text{C}$  finali. Per ciascun campione, la prova è stata eseguita in triplicato.

I singoli composti sono stati individuati confrontando tra loro i tempi di ritenzione dei singoli analiti e degli standard di riferimento. La quantificazione di ogni composto è stata eseguita con la metodica dello standard interno ed è stata rapportata a 1 kg di campione. Per ciascun campo e per ogni anno sono stati così ottenuti due valori medi per ciascun analita corrispondenti alle due tesi ("viti sintomatiche" e "viti asintomatiche").

L'interpretazione complessiva dell'effetto della manifestazione di esca sul livello del singolo analita è stata ottenuta come segue.

L'insieme dei dati scaturiti dalle viti sintomatiche di tutti i campi e nell'intero arco del quadriennio di indagine è stato confrontato con l'analogo insieme delle viti asintomatiche. Il confronto è stato effettuato per  $P = 0,01$  mediante il test t di Student accoppiato.

I dati medi riscontrati nei vari campi nel corso degli anni sono stati raggruppati in 2 tesi: quelli provenienti da viti asintomatiche e quelli provenienti da viti sintomatiche. Ogni dato medio ha rappresentato una singola ripetizione. Il confronto tra le tesi è stato poi effettuato mediante il test t di Student accoppiato per  $P = 0,01$ .

La valutazione dell'eventuale effetto della stagione produttiva su ciascun analita ha seguito il seguente schema: i dati medi ottenuti per ciascun campo nel 2003 e relativi alle piante sintomatiche sono stati tra loro mediati. Altrettanto è stato fatto per le viti asintomatiche e lo stesso schema è stato utilizzato in entrambi i casi nei tre anni successivi. I dati sono stati espressi in funzione delle stagioni produttive per viti asintomatiche e sintomatiche in g/kg o mg/kg a seconda dell'opportunità.

### VI.4.3 Risultati

L'acido malico è risultato generalmente superiore, ma non in maniera significativa, nelle bacche di viti sintomatiche, rispetto a quelle asintomatiche, eccetto che nel 2003, quando i due gruppi non presentavano differenze tra loro. Durante tale stagione produttiva, il contenuto di acido malico delle bacche delle viti asintomatiche è risultato almeno dimezzato (circa 2 g/kg) rispetto a quanto riscontrato nelle stagioni successive e pari a 4-6 g/kg (fig. 1). Dal momento che il dato del 2003 è parso anomalo, l'analisi statistica utilizzata per una valutazione complessiva del fenomeno è stata ripetuta come descritto restringendo però l'indagine al periodo 2004-2006. In questo caso l'incremento di acido malico delle bacche di viti sintomatiche è risultato significativo.

L'acido tartarico è risultato costantemente superiore, ma non in maniera significativa, nella produzione di piante sintomatiche, rispetto a quelle asintomatiche.

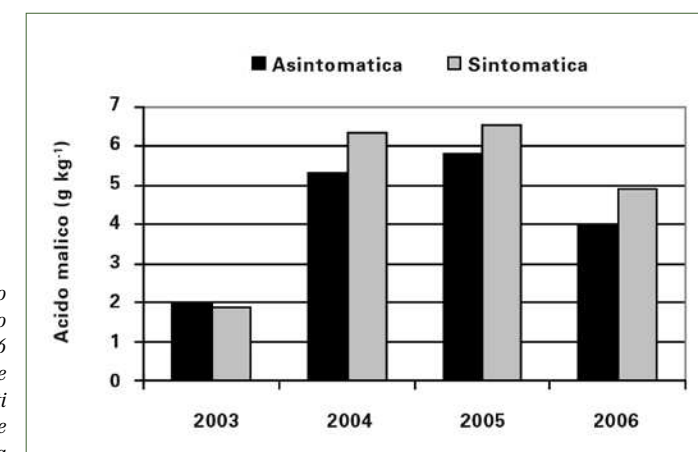


Fig. 1 - Contenuto di acido malico nella produzione 2003-2006 di viti asintomatiche e sintomatiche di vigneti della provincia bolognese affetti da esca

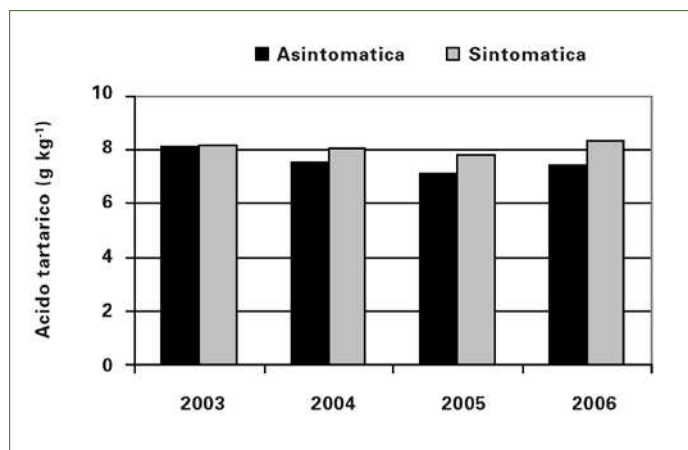


Fig. 2 - Contenuto di acido tartarico nella produzione 2003-2006 di viti asintomatiche e sintomatiche di vigneti della provincia bolognese affetti da esca

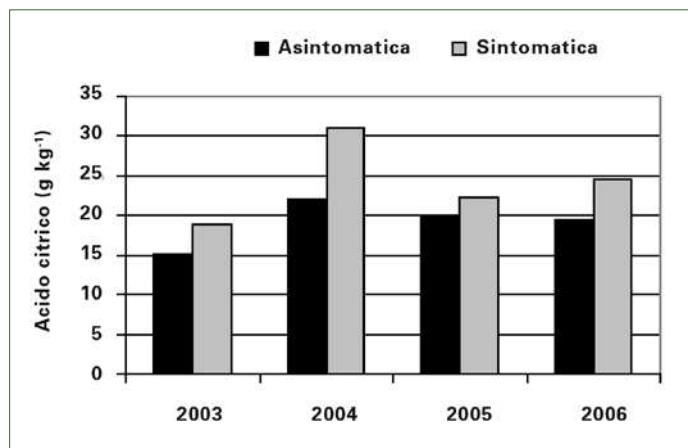


Fig. 3 - Contenuto di acido citrico nella produzione 2003-2006 di viti asintomatiche e sintomatiche di vigneti della provincia bolognese affetti da esca

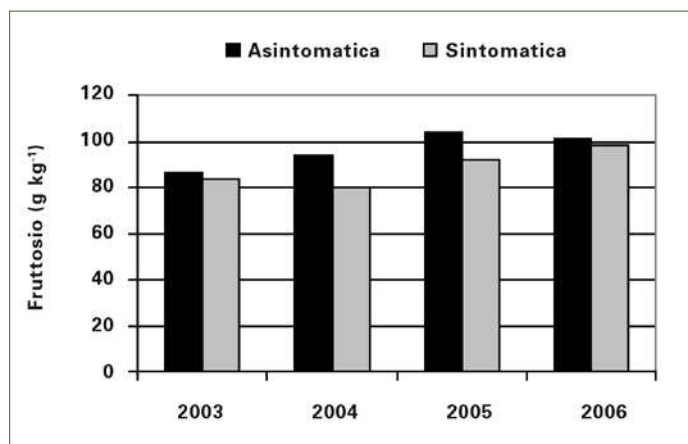


Fig. 4 - Contenuto di fruttosio nella produzione 2003-2006 di viti asintomatiche e sintomatiche di vigneti della provincia bolognese affetti da esca

Relativamente alle bacche provenienti da viti asintomatiche, nel 2003, il contenuto in acido tartarico è apparso il maggiore del quadriennio (8,1 g/kg) e paragonabile, solo in quell'anno, ai livelli generalmente raggiunti dalle viti sintomatiche. Il livello di acido tartarico delle bacche di viti sintomatiche è risultato meno sensibile alla stagionalità in quanto il massimo scarto registrato nel contenuto di acido tartarico delle bacche da pianta sintomatica è stato di 0,6 g/kg, invece di uno scarto massimo di circa 1 g/kg registrato per le viti asintomatiche (fig. 2). Anche in questo caso, l'analisi statistica ristretta all'ultimo triennio ha consentito di mettere in evidenza la significatività dell'aumento di acido tartarico nelle bacche di viti sintomatiche.

Il livello di acido citrico riscontrato in presenza di esca è risultato significativamente maggiore rispetto alla pianta asintomatica durante l'intero quadriennio. Valori relativamente bassi di acido citrico sono stati registrati nel 2003 e, al contrario, particolarmente alti nel 2004. In quest'ultima stagione produttiva si è registrata anche la massima differenza tra le tesi asintomatiche e quelle sintomatiche, che sono risultate pari a 22 e 31 mg/kg, rispettivamente (fig. 3).

I valori di fruttosio riscontrati nelle bacche di viti asintomatiche sono oscillati da 85 a più di 100 g/kg, e i valori inferiori dell'intervallo sono stati registrati nel 2003. Per quanto concerne le bacche di viti sintomatiche, i valori del contenuto in fruttosio si sono rivelati costantemente inferiori rispetto a quanto riscontrato nelle viti asintomatiche. La maggiore differenza tra le tesi è risultata pari a circa 15 g/kg ed è stata registrata nel 2004 e nel 2005 (fig. 4). Piante sintomatiche e asintomatiche sono risultate significativamente differenti quando valutate nell'arco dell'intero quadriennio.

L'andamento del livello di glucosio riscontrato in presenza e in assenza di sintomi di esca ricalca sostanzialmente quanto già descritto per il fruttosio e, anche in questo caso, le differenze, valutate nell'arco del quadriennio, sono risultate significative. Anche nel caso del glucosio, le maggiori differenze tra sintomatico e asintomatico sono state registrate nel 2004 e nel 2005 (fig. 5).

L'inositolo contenuto nelle bacche di viti asintomatiche si è rivelato nettamente superiore nel 2003, e inferiore nel 2004 (circa 40 e 30 mg/kg, rispettivamente), se confrontato con quanto registrato nei due anni successivi. Bacche di viti sintomatiche hanno costantemente

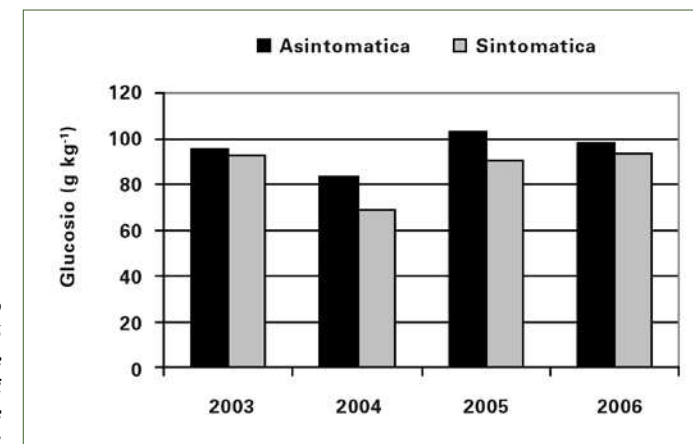


Fig. 5 - Contenuto di glucosio nella produzione 2003-2006 di viti asintomatiche e sintomatiche di vigneti della provincia bolognese affetti da esca



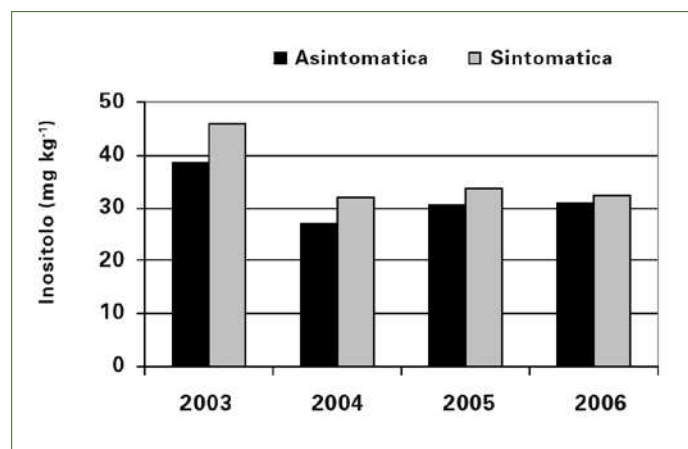


Fig. 6 - Contenuto di inositolo nella produzione 2003-2006 di viti asintomatiche e sintomatiche di vigneti della provincia bolognese affetti da esca

manifestato un contenuto di inositolo superiore a quanto rilevato nelle bacche delle viti asintomatiche e anche in questo caso il livello maggiore di inositolo è stato registrato nel 2003. L'oscillazione stagionale degli anni successivi è stata inferiore a quanto registrato per le bacche di viti asintomatiche. La differenza tra viti asintomatiche e sintomatiche è stata massima nel 2003, con un eccesso di inositolo nelle bacche delle piante sintomatiche pari a circa 7 mg/kg (fig. 6). In ogni caso, l'alterazione del contenuto di inositolo è risultata significativa nell'arco dei 4 anni di indagine.

#### VI.4.4 Discussione

Nel complesso, i risultati ottenuti sono in linea con quanto riferito nel presente capitolo e relativo agli impianti dell'Abruzzo. I parametri studiati hanno spesso mostrato valori che nelle viti sintomatiche si sono rivelati significativamente alterati, se valutati nell'intero arco del quadriennio, rispetto alla condizione asintomatica. Tali risultati denotano una alterazione complessiva dello stato fisiologico della bacca a seguito della manifestazione di esca.

La minore presenza di zuccheri è probabilmente da attribuire alla ridotta attività fotosintetica della foglia sintomatica, che non appare in grado di fissare la CO<sub>2</sub> ambientale (Petit *et al.*, 2006; Mattii *et al.*, *capitolo IV.4a*). Il minore contenuto zuccherino registrato nel 2003 per le viti asintomatiche rispetto al resto del periodo di indagine potrebbe essere dovuto alle condizioni di elevata temperatura e limitata piovosità che si sono protratte per un bimestre e particolarmente in agosto. Tali temperature elevate potrebbero infatti avere limitato nelle viti asintomatiche (testimoni) l'attività fotosintetica e quindi l'accumulo degli zuccheri nella bacca in reazione allo stress siccitoso (Flexas *et al.*, 2004).

I risultati ottenuti dall'analisi degli acidi organici sono in linea con quanto già evidenziato da Calzarano e collaboratori (2004). L'aumento di acido malico messo in evidenza nelle viti sintomatiche è stato interpretato da tali Autori attraverso l'intervento della glicolisi nella generazione non fisiologica degli acidi organici, a spese probabilmente di un consumo par-

ziale di zuccheri (Stafford e Loewus, 1958; Beckman, 1964; Hardy, 1967; Daly, 1976; Asahi *et al.*, 1979). La degradazione dell'acido malico è inoltre favorita dalle alte temperature (Volschenk *et al.*, 2006) che, verificatesi particolarmente in luglio-agosto 2003 e luglio 2006 potrebbero spiegare il minor contenuto di acido malico registrato nel 2003 e, in minor misura, nel 2006. D'altronde, l'aumento del livello di acido malico è risultato significativo solamente se verificato per il triennio 2004-2006. Ciò può essere spiegato solamente se si assume che i dati del triennio 2004-2006 siano tra loro più omogenei rispetto a quanto registrato nel 2003, che risulterebbe così anomalo. L'alterazione dell'acido tartarico è meno evidente, in linea con quanto precedentemente evidenziato e nell'arco del quadriennio non risulta significativa. Il suo decremento valutato nell'arco del triennio 2004-2006, cioè nel periodo di indagine relativamente non anomalo, appare invece significativo, suggerendo l'intervento di una parziale compromissione del metabolismo acidico (Fregoni, 1999). L'accumulo nel frutto di acido citrico, riferibile a situazioni di stress idrico (Esteban *et al.*, 1999; Hudina e Stampar, 2000) e a carenze nutrizionali, ad esempio carenza di ferro (Shlizerman *et al.*, 2007), è significativamente correlabile con la manifestazione della malattia, ma non è parso subire alterazioni in relazione alla stagionalità. Ciò può essere spiegato se si assume che i meccanismi patogenetici siano molto più importanti nel determinare l'aumento di acido citrico, rispetto a quanto imposto dall'ambiente. È possibile ipotizzare diversi meccanismi di modificazione dell'acido citrico nella bacca a seguito dell'esca. In particolare è probabile che le difficoltà di trasporto idrico causate sia dalla parziale occlusione del tessuto vascolare compromesso dai funghi tracheomicotici (Edwards *et al.*, 2007), sia dalla minore evapotraspirazione della foglia (Petit *et al.*, 2006) possano essere percepite come carenza idrica. La mancata funzionalità fogliare registrata da Petit e collaboratori, inoltre, potrebbe impedire all'organo il corretto utilizzo del ferro comunque accumulato (Di Marco *et al.*, 2001) e essere percepito come carenza di ferro, con ulteriori ripercussioni sul contenuto in acido citrico della bacca.

L'inositolo è sostanza correlabile con stati di stress e in particolare degli stress idrici. I valori di inositolo significativamente elevati riscontrati nelle viti sintomatiche, rispetto a quelle asintomatiche, conferma come la manifestazione di esca possa essere considerata un evento stressante per la vite. I bassi livelli di inositolo registrati nel 2004 per le viti asintomatiche potrebbero indicare l'instaurarsi di una qualche forma di stress da eccesso di disponibilità idrica del terreno, probabilmente determinata da un luglio particolarmente piovoso (Ferree e Streeter, 2004). Particolarmente interessanti risultano tuttavia i dati del 2003: limitatamente alle viti asintomatiche, in questa stagione il livello di inositolo è risultato superiore a qualsiasi altro dato scaturito nel triennio successivo. Nonostante ciò, le viti sintomatiche non solo presentano nello stesso anno un livello ancor superiore di inositolo, ma la differenza tra le due tesi risulta la più alta tra quelle registrate nel quadriennio. Questi dati sembrano suggerire l'instaurarsi nel 2003 di uno stress importante che potrebbe anche spiegare la bassa differenza tra "viti sintomatiche" e "viti asintomatiche" fatta registrare per i parametri legati alla qualità (acido malico, acido tartarico e zuccheri). Tale osservazione corrisponde al fatto che l'estate 2003 è stata considerata una stagione anomala per l'intera Europa, soprattutto a causa delle elevate temperature riscontrate in luglio e agosto, con probabili ripercussioni sulla fisiologia delle piante ormai adattate a ciascun ambiente (Schär *et al.*, 2004).

In conclusione, in condizioni stabili l'esca appare avere effetti sulla qualità della produzione per tutti i parametri indagati, confermando e approfondendo quanto già segnalato precedentemente (Calzarano *et al.*, 2001; 2004) e in questo capitolo. In condizioni di stress le alterazioni risultano meno evidenti, probabilmente per l'importanza che viene ad assumere l'ulteriore stato di sofferenza imposto dall'ambiente sui complessi processi fisiologici che determinano i normali livelli di analita di volta in volta riscontrati.

## VI.5 Danni e qualità delle uve

G. Scalabrelli\*, L. Andreini, G. Ferroni

### VI.5.1 Introduzione

Uno studio sugli effetti del mal dell'esca sulla qualità delle uve e dei mosti è stato effettuato anche su uve ottenute da piante sintomatiche e piante apparentemente sane di "Sangiovese" e Cabernet Sauvignon di vigneti in Toscana. Inoltre, è stato valutato l'eventuale effetto modificante dell'irrigazione sull'influenza del mal dell'esca sui parametri qualitativi delle uve.

### VI.5.2 Materiali e metodi

Alla fine di settembre 2005, in coincidenza della maturazione tecnologica sono state condotte le seguenti determinazioni: analisi sensoriale, applicando il metodo messo a punto presso il Dipartimento di Coltivazione e Difesa delle Specie Legnose della Facoltà di Agraria di Pisa (*tab. 1*), derivato dalla modifica di precedenti protocolli (Scalabrelli, dati non pubblicati); composizione fisica dell'acino (buccia, polpa e vinaccioli); macrostruttura delle uve (zuccheri, pH e acidità titolabile); ricchezza fenolica (antociani e polifenoli) mediante il metodo Di Stefano e Cravero (1991).

### VI.5.3 Risultati e discussione

Limitate variazioni sono state osservate a carico della macrostruttura del mosto (zuccheri, acidità titolabile e pH, la cui oscillazione rispetto al controllo è variata tra il -10% e il +6%) (*fig. 1*). Su Sangiovese è stata evidenziata la diminuzione del peso medio dell'acino e del singolo vinacciolo in piante infette non irrigate, mentre le piante sintomatiche irrigate non mostravano la riduzione di nessuno dei due parametri (*fig. 2*). Ciò indica la possibilità che l'irrigazione può modulare la crescita dell'acino di piante sintomatiche. Su Cabernet Sauvignon sono stati osservati analoghi effetti, ma la presenza del mal dell'esca su questo vitigno ha indotto soprattutto la diminuzione dello spessore della buccia e del peso medio dei vinaccioli senza alterare il peso complessivo dell'acino.

Meno attendibili sono risultate le variazioni su antociani e polifenoli, data la variabilità

\* Università di Pisa email: gscalabrelli@agr.unipi.it

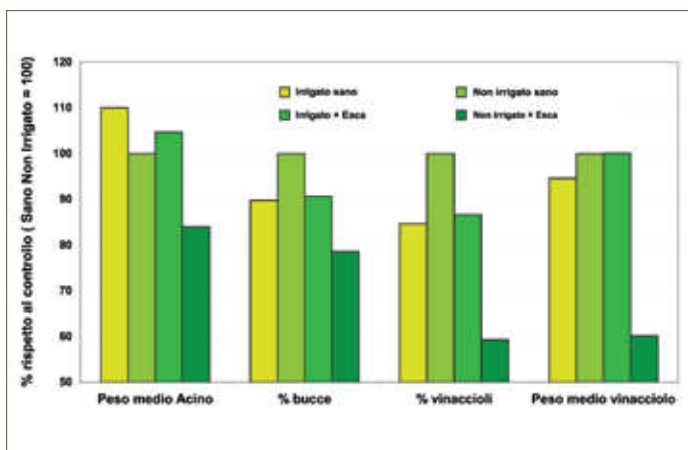


Fig. 1 - Caratteristiche del mosto a vendemmia in funzione dello stato sanitario e dell'intervento irriguo - Vendemmia Sangiovese 2005

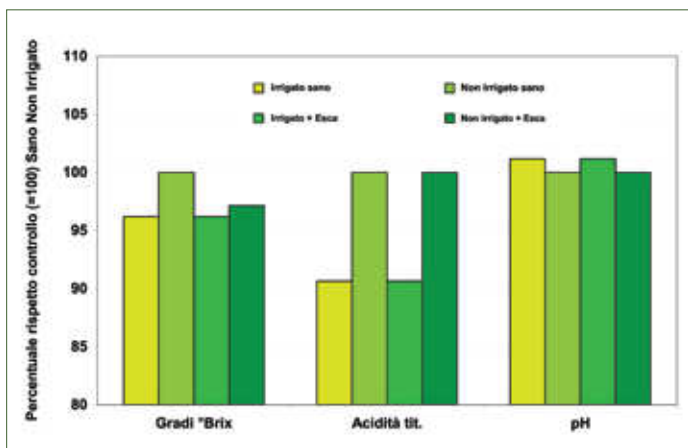


Fig. 2 - Caratteristiche delle bacche a vendemmia in funzione dello stato sanitario e dell'intervento irriguo - Vendemmia Sangiovese 2005

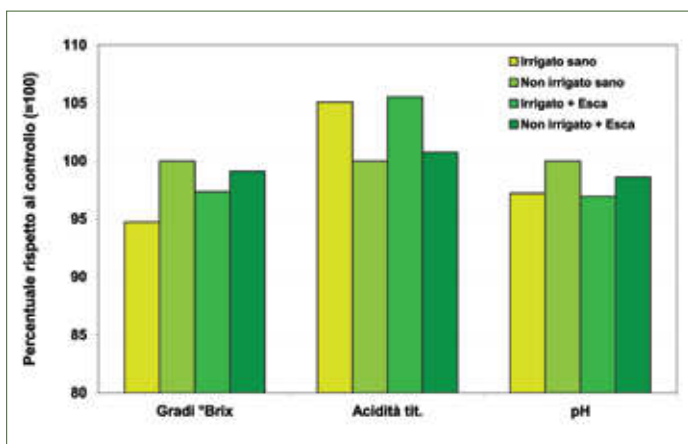


Fig. 3 - Caratteristiche delle bacche a vendemmia in funzione dello stato sanitario e dell'intervento irriguo - Vendemmia Cabernet Sauvignon 2005

esistente tra i campioni. Tuttavia, l'apparente incremento della concentrazione dei polifenoli della buccia su viti di Sangiovese esca-sintomatiche, è da attribuire a un effetto di diluizione e non all'aumento della biosintesi, essendo diminuita la dimensione degli acini (fig. 3).

È interessante osservare che la maturità fenolica delle uve è risultata, come prevedibile, migliore nelle uve di piante non sintomatiche, in questo caso, sia su Cabernet che su Sangiovese l'irrigazione ha favorito la maturazione fenolica degli acini (figg. 4-5).

Al momento della vendemmia, oltre all'analisi della macrostruttura nel mosto è stata effettuata la degustazione separata delle varie parti dell'acino (buccia, polpa e vinaccioli) utilizzando una scheda parametrica messa a punto dal Dipartimento di Coltivazione e Difesa delle Specie Legnose, attribuendo per ogni descrittore un punteggio crescente in funzione dello stato di maturazione raggiunto dai vari organi (tab. 1). Tale esigenza è importante, dal punto di vista tecnico, in quanto in funzione del vitigno e delle condizioni in cui si svolge la maturazione possono verificarsi delle sfasature di maturazione che possono essere di par-

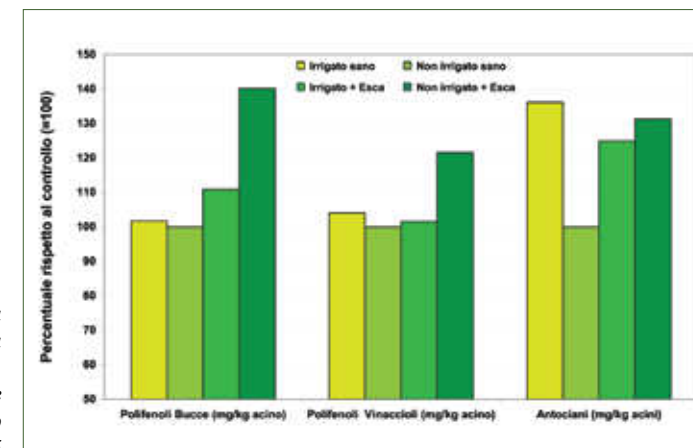


Fig. 4 - Ricchezza fenolica delle uve a vendemmia in funzione del vitigno, dello stato sanitario e dell'intervento irriguo - Vendemmia Sangiovese 2005

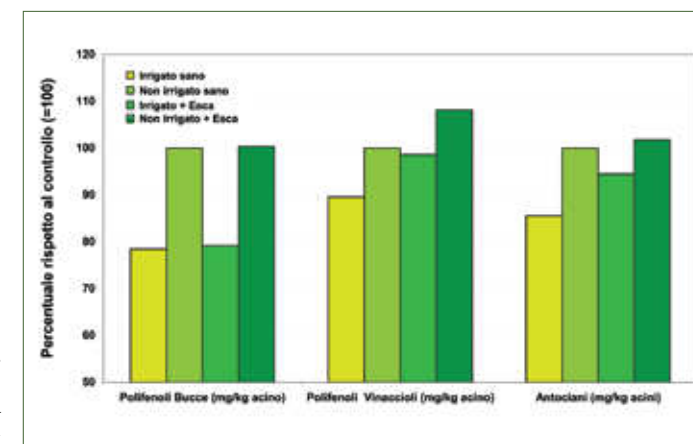


Fig. 5 - Ricchezza fenolica delle uve a vendemmia in funzione del vitigno, dello stato sanitario e dell'intervento irriguo - Vendemmia Cabernet Sauvignon 2005

**Tab. 1 - Scheda sintetica dei descrittori sensoriali e relativo punteggio attribuito per ogni livello percepito durante la degustazione separata delle varie parti dell'acino alla vendemmia**

Organo	Descrittori sensoriali				
<b>Buccia</b>	Colore buccia	Attitudine trituraz. buccia	Astringenza tannini	Aromi dominanti	Sensazione di amaro
1	rosa	molto dure	forte	erbaceo	amaro
2	rosso	dure	media	neutro	medio
3	rosso scuro	poco dure	leggera	fruttato	leggero
4	nero blu	tenere	nessuna	marmellata	poco
<b>Polpa</b>	Facilità di separazione polpa	Sensazione di dolce	Sensazione di acido	Aromi dominanti	Sensazione di amaro
1	molto aderente	poco	poco	erbaceo	—
2	media aderente	media	media	neutro	—
3	aderente	dolce	poco	fruttato	—
4	facile	molto dolce	assenza	marmellata	—
<b>Vinacciolo</b>	Colore	Durezza	Astringenza tannini	Aromi dominanti	Sensazione di amaro
1	verde	molli	forte	erbaceo	amaro
2	verde-marrone	poco molli	media	neutro	medio
3	marrone	duri	leggera	tostato	leggero
4	scuri	lignificati	nessuna	torrefatto	poco

**Tab. 2 - Analisi sensoriale dell'acino (a bacca nera) durante la maturazione: valori numerici e descrizione sommaria delle sensazioni percepite**

Codice	Buccia		Polpa	Vinaccioli	Giudizio tecnologico
1	poco colorata	aderente alla polpa, sapore erbaceo, astringente	dura, acida, di sapore erbaceo	verdi, consistenza gommosa, astringenti e amari	acerbo
2	colorazione incompleta, con striature verdi	aderente alla polpa, spessa e consistente, sapore legg. erbaceo, astringente	consistente, acida, di sapore erbaceo	marroni con striature verdi, di consistenza semi-legnosa astringenti e amari	in corso di maturazione – da non raccogliere
3	colore rosso abbastanza uniforme	consistente, un po' fragile legg. fruttata con finale erbaceo	un po' consistente leggermente acida	marroni, legnosi, un poco astringenti	quasi maturo – vinificabile solo con particolari accorgimenti
4	colore bleu-nero	facilmente distaccabile friabile, note fruttate intense senza finale erbaceo	polpa succosa dolce, con aroma di fruttato e di confettura	legnosi, speziati, leggermente piccanti, con sapore di mandorla, non amari, non astringenti	maturo: idoneo alla vinificazione

ticolare rilievo dal punto di vista tecnologico. Infatti, con l'analisi sensoriale eseguita da un panel addestrato, si possono percepire le differenze nello stadio di maturazione delle varie parti dell'acino, che difficilmente possono essere determinate per via analitica. Ad esempio, le sensazioni di astringenza, di amaro e le note aromatiche possono essere quantificate immediatamente, senza dover ricorrere all'analisi di laboratorio, mentre per la sensazione di dolce e di acido l'analisi del mosto può fornire un valido complemento.

Pertanto, è stato ipotizzato che anche in viti sintomatiche possano essersi verificate modificazioni nel processo di maturazione. I risultati ottenuti dalle osservazioni effettuate sui 14 descrittori sono state prima riportati su *spider plot* per ciascun vitigno e successivamente aggregati per ogni organo come valori medi per ottenere una visione sintetica mediante uno *spider plot quadrangolare* in cui è presente il colore dell'acino e lo stadio medio di maturazione di buccia, polpa e vinacciolo (figg. 6-9). Ai codici numerici attribuiti corrispondono giudizi tecnologici sintetici espressi nella *tab. 1*, dai quali si evince che ai valori più elevati corrisponde uno stadio di maturazione tecnologica più avanzata.

Esaminando in dettaglio le degustazioni di Sangiovese si può verificare che mediante l'irrigazione le viti sintomatiche (i sintomi non erano tuttavia molto intensi) presentano una maturazione tecnologica migliore di quelle non irrigate e sintomatiche (figg. 6, 8). Analogamente accade per il Cabernet Sauvignon, dove in presenza di sintomi più importanti la maturazione tecnologica delle varie parti dell'acino è stata maggiormente ridotta, soprattutto a carico dei vinaccioli, mentre nelle viti sintomatiche irrigate si ha complessivamente una maturazione tecnologica meno ritardata della buccia e della polpa (figg. 7, 9). In sostanza sono state notate differenze tra i due vitigni, con maggiori ripercussioni dell'esca sugli aspetti sensoriali degli acini di Cabernet Sauvignon e un apparente effetto favorevole dell'irrigazione. Sulla base delle note sensoriali determinate, si può ipotizzare che le sensazioni di amaro e astringenza siano dovute alla presenza di componenti flavonoidi (flavan 3-oli) poco polimerizzati dovuti al mancato completamento della maturazione.

Osservazioni condotte in un altro vigneto di Sangiovese su grappoli prelevati da piante aventi diversi livelli di intensità della malattia hanno evidenziato che gli effetti sulle compo-

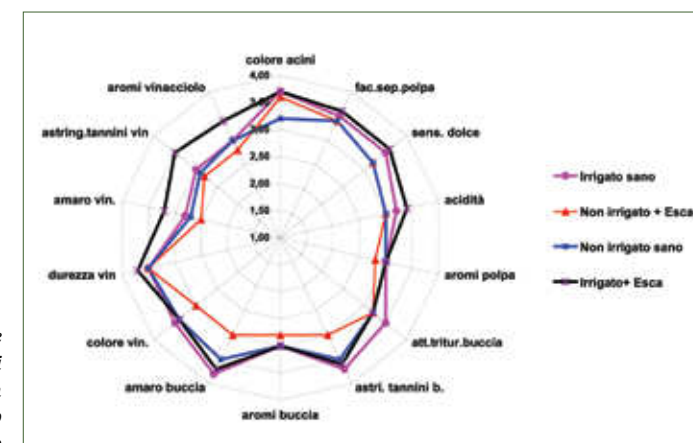


Fig. 6 - Caratteristiche sensoriali delle uve di Sangiovese a vendemmia in funzione dello stato sanitario e dell'intervento irriguo

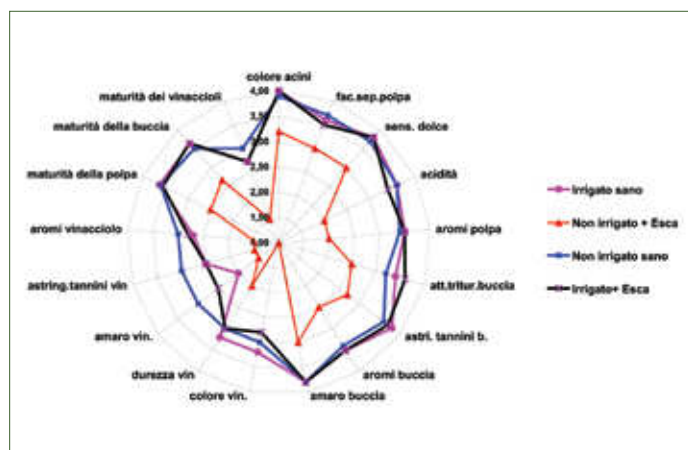


Fig. 7 - Caratteristiche sensoriali delle uve di Cabernet Sauvignon a vendemmia in funzione dello stato sanitario e dell'intervento irriguo

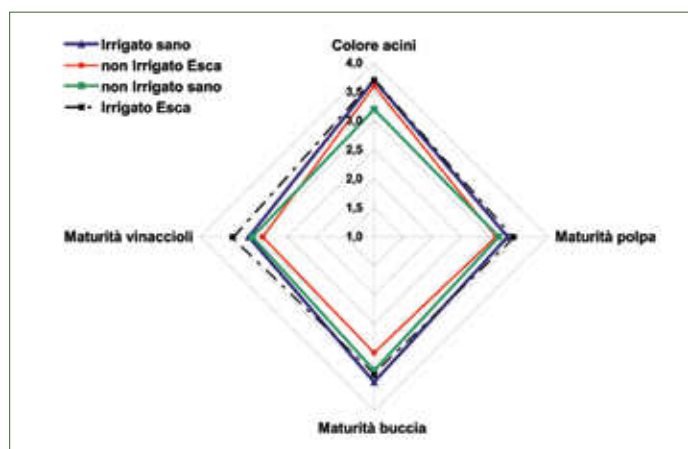


Fig. 8 - Caratteristiche sensoriali complessive delle varie parti dell'acino di Sangiovese a vendemmia in funzione dello stato sanitario e dell'intervento irriguo

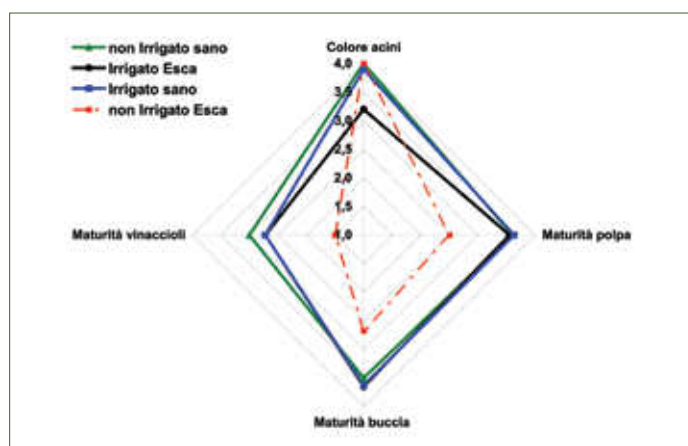


Fig. 9 - Caratteristiche sensoriali complessive delle varie parti dell'acino di Cabernet Sauvignon a vendemmia in funzione dello stato sanitario e dell'intervento irriguo

Tab. 3 - Qualità delle uve in Sangiovese affetto da esca di diversa intensità (2006)

Campione	° Brix	Acidità totale	Peso medio acino (gr)	Polifenoli bucce (mg/kg acini)	Polifenoli vinaccioli (mg/kg acV)	Antociani (mg/kg acini)
<b>Colignola</b>						
Esca 2005	19,8	6,45	2,41	1.588	1.942	489
Controllo	21,8	6,05	2,71	1.087	1.694	426
Esca 2005 e 2006	21,2	6,77	1,87	1.661	2.473	616
<b>Crespina</b>						
Esca leggera 2006	21,4	6,24	1,66	2.785	3.117	472
Esca 2005	19,0	9,78	1,87	1.848	2.019	635
Esca forte 2006	17,8	6,86	1,69	1.688	2.251	295
Controllo	23,2	6,21	2,00	1.802	1.617	902

Tab. 4 - Qualità delle uve in Sangiovese affetto da esca di diversa intensità (2006)

Campione	Polifenoli bucce (mg/kg acini)	Polifenoli vinaccioli (mg/kg acini)	Polifenoli totali (mg/acino)	Antociani totali (mg/kg acini)	Antociani totali (mg/acino)
<b>Colignola</b>					
Esca 2005	1.588	1.942	3,8	489	1,18
Controllo	1.087	1.694	2,9	426	1,16
Esca 2005 e 2006	1.661	2.473	3,1	616	1,15
<b>Crespina</b>					
Esca leggera 2006	2.785	3.117	4,6	472	0,78
Esca 2005	1.848	2.019	3,5	635	1,19
Esca forte 2006	1.688	2.251	2,8	295	0,50
Controllo	1.802	1.617	3,6	902	1,80

menti della macrostruttura degli acini e della ricchezza fenolica dipendono dalla gravità dei sintomi. Più in particolare, quando si manifestano forti danni alle foglie (fino alla loro caduta) gli antociani e il contenuto degli acini rischia di essere compromesso (tabb. 3-4), inoltre anche i tralci non lignificano completamente. Infatti, in caso di limitazione della quantità di zuccheri i processi di accumulo nei grappoli (maturazione) e nei tralci (agostamento) che normalmente sono processi sfalsati nel tempo, finiscono per diventare contemporanei e quindi in competizione tra loro.

## VI.6 Resveratrolo e salute umana

A. Evidente, A. Andolfi\*

### VI.6.1 Introduzione

Le fitoalessine (o sostanze ad attività fitoalessinica) della vite hanno suscitato grande interesse negli ultimi 10 anni sia in fitopatologia, per la loro potenziale attività antifungina, sia nel più ampio ambito della salute umana, per le loro capacità antiossidanti e quindi per l'attività cardioprotettiva e chemiopreventiva (Soleas *et al.*, 1997; Cichewicz e Kouzi, 2002; Jeandet *et al.*, 2002).

In particolare, l'interesse per il resveratrolo proviene dal fatto che, secondo dati riportati nella letteratura medica, tale composto è la componente attiva di un medicamento popolare cinese e giapponese noto come "kojokon" (a base di polvere essiccata di radici di *Polygonum cuspidatum*) utilizzato per vari scopi (ad esempio contro l'iperlipemia, l'aterosclerosi, le allergie e le infiammazioni) (Nomomura *et al.*, 1963).

Prima dell'individuazione del resveratrolo nel vino, alcuni ricercatori si stavano interessando da tempo al vino come bevanda alcolica con funzioni protettive contro le malattie cardiovascolari. Nel 1990, per esempio, una ricerca dimostrò che il consumo di vino rosso (Bordeaux), ma non vino bianco o etanolo, induceva una ipoaggregazione piastrinica e un aumento del colesterolo HDL, fattori importanti per la salute umana. Sulla base di queste evidenze sperimentali, Siemann e Creasy formularono l'ipotesi di un legame diretto tra la presenza del resveratrolo nel vino e l'effetto protettivo di questo nei confronti delle malattie coronariche. Nel 1992 la rivista scientifica *The Lancet* pubblicò un'indagine epidemiologica di Renaud e de Lorgeril relativa al paradosso francese. Questi autori studiarono la correlazione esistente tra la mortalità dovuta a malattia coronarica (in uomini e donne, nel 1987) e l'assunzione di grassi di origine animale nella dieta di campioni di popolazione di alcuni stati europei (16) e dell'Australia. L'elaborazione dei dati raccolti mise in evidenza la relazione diretta tra il consumo medio giornaliero di calorie provenienti da grassi animali e la mortalità.

Solo la Francia era un'eccezione in quanto la popolazione campione francese analizzata (città di Lille, Strasburgo e Tolosa) era caratterizzata da un consumo di grassi animali elevato, ma dalla più bassa mortalità per malattia coronarica, rispetto agli altri Paesi indagati. Indagini successive hanno messo in relazione tale "anomalia" con l'elevata assunzione di vino rispetto agli altri paesi esaminati. Si è pertanto ipotizzato che non è l'alcool (presente nel vino) il responsabile di questo effetto positivo, ma altre sostanze, all'epoca non ancora

indagate, poiché altre bevande contenenti alcool non avevano dato gli stessi effetti del vino. I due studiosi francesi conclusero la loro ricerca affermando che l'effetto protettivo del vino e la sua superiorità su altre bevande alcoliche era solo un'ipotesi che aspettava conferme da studi più approfonditi.

Una delle sostanze ritenute responsabili (in parte) degli effetti benefici del vino è il resveratrolo. A iniziare dal 1992 numerosi studi sono stati condotti sul resveratrolo, sia in campo medico (con lo scopo di investigare gli effetti benefici della sostanza sulla salute umana), che in campo enologico (con lo scopo di dosare la sostanza nei vini e di studiarne le trasformazioni).

Le attività del resveratrolo sulla salute umana sono le seguenti:

- a) L'attività antiaggregante piastrinica* che è stata provata per entrambi gli isomeri *trans*- e *cis* (Pace-Asciak *et al.*, 1995; Bertelli *et al.*, 1995 e 1996). In particolare, è stato osservato che l'effetto del *trans*-resveratrolo veniva aumentato quando somministrato assieme al vino, evidenziando una interazione positiva tra la sostanza in oggetto e altre presenti nel vino;
- b) L'attività dell'adesione di granulociti e monociti all'endotelio* (Ferrero *et al.*, 1998);
- c) L'attività preventiva nei confronti del cancro* che secondo studi fatti *in vitro*, è risultata legata all'inibizione del processo carcinogenico nei tre principali stadi di sviluppo. L'attività anti-iniziazione è stata documentata dall'effetto antimutageno del resveratrolo, dall'inibizione della funzione iperperossidasi nell'attività della cicloossigenasi (COX), e nell'induzione degli enzimi "phase II" (Jang *et al.*, 1997). L'attività anti-promozione è stata evidenziata dagli effetti antiinfiammatori, dall'inibizione della produzione di metaboliti dell'acido arachidonico catalizzata dagli enzimi COX-1 e COX-2, e dal blocco di trasformazioni neoplastiche di fibroblasti di topo indotte chimicamente (Jang e Pezzuto, 1999). L'azione anti-progressione è stata dimostrata dalla capacità di indurre la differenziazione di cellule leucemiche promielocitiche (Jang *et al.*, 1997). Secondo Jang *et al.* (1997) il consumo giornaliero di vino, fino a un massimo di 375 ml al giorno, fornisce mediamente una quantità di resveratrolo in grado di alterare il metabolismo dell'acido arachidonico;
- d) L'attività antiossidante* che risulta legata alla capacità del resveratrolo di inibire l'ossidazione delle LDL (Frankel *et al.*, 1993). Questa inibizione risulta positiva perché la modificazione ossidativa delle LDL (*Low Density Lipoprotein*) è considerata un evento primario nella patogenesi dell'arteriosclerosi (Frémont, 2000).

L'azione antiossidante del resveratrolo si realizza attraverso due importanti meccanismi. In particolare, la presenza di gruppi fenolici consente al resveratrolo di formare un radicale stabilizzato dalla delocalizzazione elettronica sui due anelli aromatici e sul doppio legame. L'interazione tra questo radicale, particolarmente stabile, e radicali pericolosi per l'uomo è in grado di rallentare i processi di ossidazione monoelettronica a carico di acidi nucleici, proteine, carboidrati e lipidi. In particolare, tra questi ultimi gli acidi grassi poliinsaturi (PUFA: *PolyUnsaturated Fatty Acid*) e il colesterolo che sono i più suscettibili a essere ossidati attraverso una serie di reazioni che prendono il nome di perossidazione lipidica (Frankel, 2005).

Il *trans*-resveratrolo agisce quindi inibendo la perossidazione lipidica come "*free radical scavenger*" (Belguendouz *et al.*, 1997).

L'ulteriore azione antiossidante è la conseguenza della capacità del resveratrolo di chelare ioni metallici, in particolare il rame. Infatti, ioni quali ferro e rame nel loro stadio di

\* Università di Napoli "Federico II" email: andolfi@unina.it

ossidazione più basso sono in grado di determinare la formazione del radicale idrossile ( $\bullet\text{OH}$ ) una tra le specie reattive più tossiche (Belguendouz *et al.*, 1997).

Infatti, ulteriori studi hanno consentito di dimostrare che il *trans*-resveratrolo in esperimenti *in vitro*, è in grado di ridurre l'ossidazione delle LDL catalizzata dal rame (Frankel *et al.*, 1993). Infatti alla concentrazione di 10  $\mu\text{mol/l}$ , la perossidazione delle LDL è fortemente inibita dal *trans*-resveratrolo rispetto ad altre sostanze polifenoliche presenti nel vino. Lo studio dei prodotti della perossidazione delle LDL ha evidenziato un maggiore effetto chelante per il *trans*-resveratrolo rispetto agli altri flavonoidi del vino che agiscono essenzialmente come *free radical scavenger* (Belguendouz *et al.*, 1997).

Attualmente la capacità antiossidante del resveratrolo è stata parzialmente ridimensionata (Frankel *et al.*, 1995) perché la concentrazione plasmatica di resveratrolo somministrato oralmente è più bassa di quella utile per una attività antiossidante (Bertelli *et al.*, 1996); è probabile comunque che un uso moderato ma continuativo di vino possa permettere un assorbimento di resveratrolo utile per questa funzione.

Ulteriori studi sono in corso, volti a indagare altre funzioni del resveratrolo sulla salute umana, quali ad esempio il ruolo contro il morbo di Alzheimer e il suo effetto come fitoestrogeno (Calabrese, 1999) e come regolatore della risposta immunitaria.

Attività del resveratrolo sono esplicabili solo quando il resveratrolo viene assunto assieme al vino, poiché probabilmente avvengono interazioni con altri composti, specie quelli polifenolici che anche recentemente sono stati associati all'effetto preventivo del vino rosso nei confronti dell'aterosclerosi (Frémont, 2000).

### VI.6.2 Il resveratrolo come agente antiossidante di specie nitrosanti mutagene

Studi recenti sono stati condotti, anche nell'ambito del progetto, per valutare la capacità deossificante del resveratrolo nei confronti di specie citotossiche contenenti ossigeno e azoto. Infatti poco è noto sulla capacità del resveratrolo di agire da agente antiossidante di specie nitrosanti mutagene generate da ioni nitrito in ambiente acido e implicate nell'insorgenza di tumori dell'apparato gastrointestinale.

In particolare, il principale precursore biologico di NO è lo ione nitroso ( $\text{NO}_2^-$ ) presente in elevate concentrazioni nella saliva (30-210  $\mu\text{M}$ ), ma anche in alcuni vegetali (ad esempio, spinaci), in fertilizzanti e in alimenti a base di carne dove è utilizzato come conservante (Duncan *et al.*, 1995; Coss *et al.*, 2004). Tale ione, nello stomaco e in altri compartimenti acidi viene convertito in  $\text{HNO}_2$  (Samouliov *et al.*, 1998) e può causare deaminazione, indurre la formazione di legami intermolecolari delle nucleobasi e favorire la formazione di N-nitrosammine (Bartsch *et al.*, 1992).

In particolare, sono stati condotti studi approfonditi sull'isolamento e la caratterizzazione dei prodotti della reazione del resveratrolo con nitrito a differenti concentrazioni (25  $\mu\text{M}$  o 1mM) in ambiente acido (tampone fosfato 0,1 M, pH 3) alla temperatura di 37°C. Tale reazione ha portato alla formazione di un *pattern* complesso di prodotti. In particolare, sono stati isolati e identificati dei nitroderivati del resveratrolo quali: il (E)-3,4',5 triidrossi-

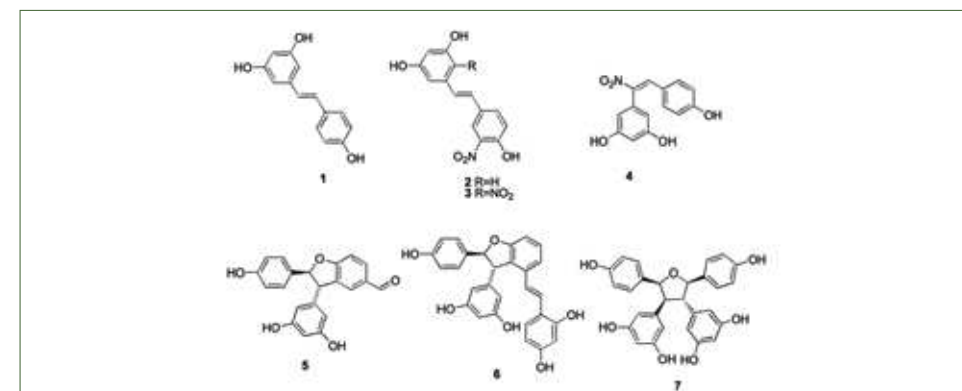


Fig. 1 - Prodotti ottenuti dalla reazione del *trans*-resveratrolo (1) con ioni nitrito in ambiente acido: 2 (E)-3,4',5 triidrossi-3'-nitrostilbene; 3, (E)-3,4',5-triidrossi-2,3'-dinitrostilbene; 4, (E)-3,4',5-triidrossi- $\alpha$ -nitrostilbene; 5, (2R,3R)-3-(3,5-diidrossifenil)-2-(4-idrossifenil)-2,3-diidrobenzofuran-5-carbaldeide; 6, (E)-deidrodimero di 1; 7, restituito B

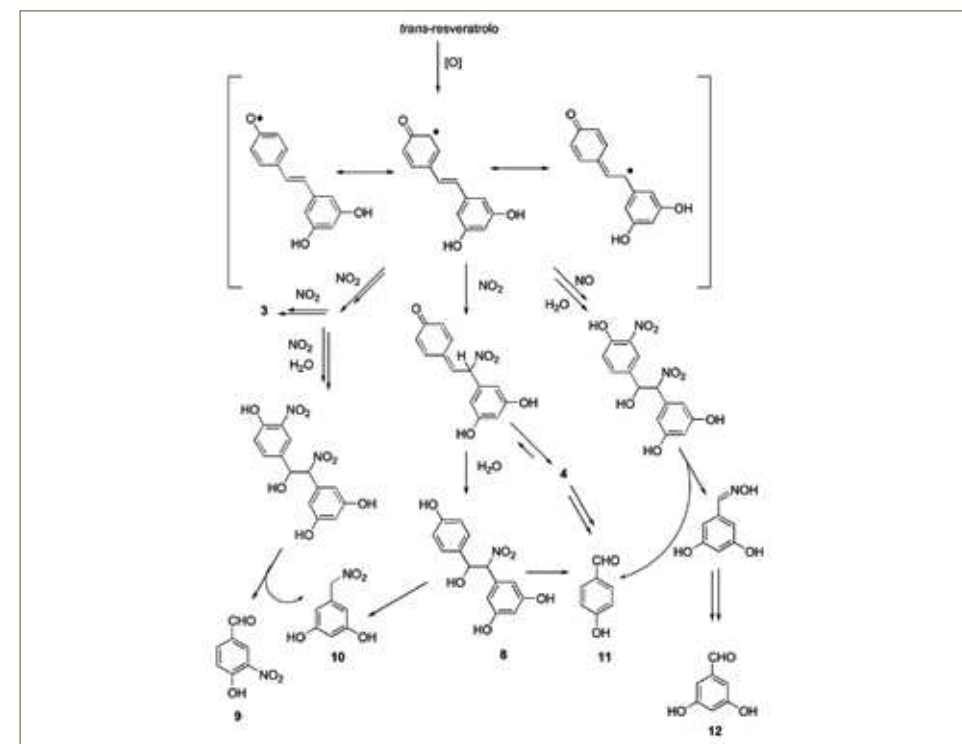


Fig. 2 - Meccanismo proposto per la reazione del *trans*-resveratrolo con ioni nitrito in ambiente acido relativo alla formazione dei nitroderivati e dei prodotti di scissione: 3, (E)-3,4',5-triidrossi-2,3'-dinitrostilbene; 4, (E)-3,4',5-triidrossi- $\alpha$ -nitrostilbene; 8, 3,4',5, $\beta$ -tetraidrossi- $\alpha$ -nitro  $\alpha,\beta$ -diidrostilbene; 9, 4-idrossi-3-nitrobenzaldeide; 10, 3,5-diidrossifenilnitrometano; 11, 4-idrossibenzenaldeide; 12; 3,5-diidrossibenzenaldeide

3'-nitrostilbene (**2**), il (*E*)-3,4',5-triidrossi-2,3'-dinitrostilbene (**3**) e il (*E*)-3,4',5-triidrossi- $\alpha$ -nitrostilbene (**4**) e dei suoi dimeri quali: la (2*R*,3*R*)-3-(3,5-diidrossifenil)-2-(4-idrossifenil)-2,3-diidrobenzofuran-5-carbaldeide (**5**), il (*E*)-deidrodimero del *trans*-resveratrolo (**6**) e il restituito B (**7**) (*fig. 1*). Inoltre, sono stati isolati inattesi prodotti di scissione ossidativi, quali la 4-idrossi-3-nitrobenzaldeide (**9**), la 3,5-diidrossifenilnitrometano (**10**), la 4-idrossibenzenzaldeide (**11**) e la 3,5-diidrossibenzenzaldeide (**12**) (*fig. 2*). Gli stessi prodotti di reazione sono stati ottenuti operando nelle stesse condizioni ma in assenza di ossigeno evidenziando in questo modo l'indipendenza di tali reazioni di ossidazione dell'ossigeno stesso.

Estese indagini NMR bidimensionali tra cui  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  HMBC e indagini cromatografiche condotte utilizzando LC/MS effettuati sulla miscela di reazione hanno suggerito la presenza del 3,4',5, $\beta$ -tetraidrossi- $\alpha$ -nitro- $\alpha,\beta$ -diidrostilbene (**8**, *fig. 2*) come intermedio chiave instabile e pertanto impossibile da isolare. Esperimenti meccanicistici hanno dimostrato che la generazione del radicale fenossilico in posizione 4', che come visto in precedenza è coinvolto in uno dei meccanismi antiossidanti del *trans*-resveratrolo, costituisce anche lo stato iniziale nei processi di nitrificazione, dimerizzazione e scissione ossidativi che coinvolgono il doppio legame del resveratrolo (*fig. 2*). Infatti i radicali così formati possono accoppiarsi con le specie nitrosanti quali  $\text{NO}_2$  sul doppio legame (posizione  $\alpha$ ) o su uno degli anelli aromatici (posizione 3') per dare nitroderivati e/o prodotti di fissione ossidativi al doppio legame (*fig. 2*) oppure possono accoppiarsi tra loro generando dimeri (Panzella *et al.*, 2006).

### VI.6.3 Conclusioni

I risultati di questo studio ampliano le conoscenze attuali sulla chimica dei sistemi idrossistilbenici, e soprattutto sulla loro reattività in condizioni blande e fisiologiche e forniscono nuove basi per la comprensione del meccanismo dell'azione chemioprotettiva del resveratrolo nei riguardi di importanti specie mutagene (Panzella *et al.*, 2006). Ulteriori studi consentiranno di valutare gli effetti biologici dei sistemi stilbenici in particolare degli oligomeri del resveratrolo quali dimeri, trimeri e tetrametri. Questo consentirà di evidenziarne i potenziali effetti benefici sulla salute umana.

## VII. Strategie di lotta contro il mal dell'esca: note storiche e nuove conoscenze





## VII.1 La lotta contro il mal dell'esca: cenni storici

Stefano Di Marco\*

### VII.1.1 Introduzione

Le prime indicazioni sulla coltivazione della vite e sulla raccolta dell'uva risalgono all'antico Egitto, ma è soprattutto in epoca romana che il vino e le tecniche di coltivazione della vite hanno richiamato l'attenzione di diversi scrittori e naturalisti, quali Catone, Virgilio e Columella. Quest'ultimo dedica all'argomento ampio spazio nel *De Re Rustica* (60-65 d.C.), vero e proprio trattato di agronomia, in cui sottolinea la maggiore difficoltà che la coltura della vite presenta rispetto ad altre specie “*omnis tamen arboris cultus simplicior quam vinearum est*”, trattando tecniche colturali e indicando metodi di difesa nei confronti di insetti, uccelli ecc.

L'insorgenza di problemi legati a forme di deterioramento del legno genericamente associabili al mal dell'esca potrebbe avere avuto origine proprio nell'antichità, in occasione della trasformazione della vite da condizioni spontanee a quelle di coltivazione, con le prime operazioni di potatura. Gli iniziali tentativi di contenimento della malattia furono caratterizzati da un approccio empirico, fatto di osservazioni condotte su piante in avanzato stato d'infezione, con il tronco e le branche interessate da consistenti fenomeni di carie. Si ricordano almeno due tipologie di interventi, praticati in alcune regioni della Grecia e in Asia minore e che di tanto in tanto si è avuta occasione di osservare anche in tempi recenti, soprattutto in Francia e in Italia.

Un intervento consisteva nell'inserimento di un sasso all'interno del tronco di viti malate, preventivamente fessurato al punto di unione con le branche principali e in tal modo tenuto divaricato. L'esposizione del legno infetto all'aria e al sole si riteneva contribuisse a bloccare lo sviluppo del micelio. Alla luce delle attuali conoscenze sulla biologia dei patogeni responsabili dell'esca, l'efficacia dell'intervento potrebbe anche essere ascrivibile a un effetto della luce su scitalone e isosclerone, fitotossine prodotte da funghi vascolari, recentemente individuate e attualmente associate alla manifestazione di sintomo fogliare (Evidente *et al.*, 2000; Tabacchi *et al.*, 2000).

Un'altra antica pratica di dendrochirurgia, definita “slupatura”, era adottata in presenza di piante con consistenti sintomi di carie. Mutuata dall'olivicoltura e impiegata anche nei confronti di marciumi del castagno e in generale di piante ornamentali, la pratica consiste nell'asportazione del legno alterato dal tronco e dalle branche delle viti infette e nella successiva disinfezione dei lembi della ferita con catrame, in taluni casi riempiendo di terra la cavità così formata nel tronco.

---

\* CNR - IBIMET, Bologna email: s.dimarco@ibimet.cnr.it

La slupatura e la fessurazione del tronco con inserimento di un sasso hanno fornito risultati incerti consentendo a volte un ritardo della ricomparsa dei sintomi. Gli interventi, non sorretti da un appropriato supporto sperimentale, si dimostrarono comunque onerosi, per il lungo lavoro richiesto di mano d'opera specializzata, e di relativa efficacia, se non altro per la transitorietà degli effetti riscontrati (Graniti, 1960; Rui, 1971).

Per quasi duemila anni, dunque, i tentativi di cura o di contenimento della malattia sono stati concepiti e realizzati in condizioni di avanzato sviluppo della malattia, ovvero dopo la comparsa dei sintomi sull'apparato epigeo e in presenza di carie. Gli studi condotti in Francia tra la fine dell'ottocento e gli anni venti del secolo successivo, ritenevano la malattia propria degli impianti vecchi, che interessava piante deperienti, nella fase finale della vita produttiva. L'esca si associava a infezioni del legno originate da grosse ferite e per opera di due basidiomiceti, *Stereum hirsutum* (Willd.) Pers. e *Phellinus (Fomes) igniarius* (L.:Fr.) Quél., agenti di carie bianca; la malattia aveva carattere endemico, con sporadici esiti estivi di morte della pianta per apoplezia (Ravaz, 1898, 1909; Vinet, 1909; Viala, 1926).

Questo convincimento ha limitato fortemente l'efficacia e un positivo sviluppo degli interventi di lotta nei confronti di una malattia rivelatasi poi assai complessa e, per molti versi, unica (Di Marco *et al.*, 2000).

## VII.1.2 Evoluzione delle strategie di difesa

### La protezione delle ferite

L'associazione tra alterazioni del legno ascrivibili al mal dell'esca e le ferite è un'ipotesi nota fin dai tempi antichi. In tal senso Rui (1971) riferisce di alcune affermazioni di Plinio il Vecchio che sarebbero contenute nella *Naturalis historia* (23-79 d.C.), secondo cui possibili cause di viti cariate sono i "tagli rivolti verso l'alto", nei confronti dei quali si suggerisce "praticarvi delle specie di canaletti, affinché l'acqua non ristagni".

La protezione delle ferite quale principale veicolo d'infezione è stata una pratica da sempre percepita come fondamentale nella difesa contro il mal dell'esca, e che trova ancora oggi consensi pressoché unanimi tra tecnici e ricercatori.

Il convincimento che l'esca fosse prerogativa di piante che avevano superato i 20-25 anni di età, ha indirizzato la protezione delle ferite a quelle generalmente caratterizzate da ampie superfici di taglio, procurate sia da importanti interventi di risanamento, sia da rinnovi colturali, in condizioni tali da non poter certamente assicurare il conseguimento di un efficace risultato, indipendentemente dal tipo di prodotto utilizzato nel trattamento. I *Manuali di patologia vegetale* di Ciferri (1955) e Goidanich (1964) raccomandavano la protezione delle superfici di taglio derivate da operazioni di potatura, di risanamento o di ricostituzione della forma d'allevamento della pianta con mastici d'innesto o asfalto, al fine di "evitare la diffusione dell'apoplezia e limitarne i danni".

Dalla fine degli anni cinquanta e per circa un ventennio, sono state condotte in Italia sperimentazioni con prodotti chimici finalizzate alla protezione delle ferite di potatura. Particolare attenzione è stata riservata a un formulato a base di dinitroortocresolo (DNOC) (Graniti, 1960; Rui e Battel, 1962; Grasso, 1969; Svampa e Tosatti, 1977; Ponti e Laffi, 1982; Egger, 1983;

1987; 1988). I trattamenti, effettuati a poca distanza dalla potatura e al "pianto", sembravano produrre una riduzione dell'incidenza e dell'intensità dei sintomi. Successive esperienze hanno dimostrato la transitorietà di tali effetti e una scarsa efficacia delle applicazioni, soprattutto in ragione dell'impossibilità da parte del formulato di esercitare la propria azione caustica per tutto il tempo in cui le ferite di potatura rimangono suscettibili all'infezione (Cavanni *et al.*, 1987; Parrini e Pandolfo, 1990; Bisiach *et al.*, 1995). L'utilizzo del DNOC in agricoltura è stato definitivamente abbandonato nel 1999, a causa dell'elevata tossicità del principio attivo, con apposita revoca di autorizzazione alla commercializzazione. Tale circostanza, unitamente all'indisponibilità di altri prodotti chimici con caratteristiche di attività e persistenza confacenti a questo tipo di applicazione, ha contribuito a determinare il temporaneo abbandono di interventi specifici di protezione delle ferite, eccezion fatta per l'utilizzo di formulati a base di rame a seguito di grandinate di particolare gravità in grado di provocare ferite alle piante. All'inizio del nuovo millennio sono state avviate ricerche volte a verificare le potenzialità del *Trichoderma* per la protezione delle ferite fresche di potatura, consapevoli della prolungata recettività della ferita, che si protrae per numerose settimane (Larignon, 1999b). I primi risultati sembrano indicare, in ambiente controllato, una certa capacità di protezione della superficie di taglio da parte dell'agente biologico, applicato prima dell'inoculazione di *P. chlamydospora* e una possibilità di trasferimento in campo del trattamento, associata a un opportuno ritardo delle operazioni di potatura, così da ridurre la possibilità del manifestarsi di basse temperature, in presenza delle quali l'agente biologico potrebbe ridurre o veder compromessa la propria azione (Di Marco *et al.*, 2000; 2004).

La protezione delle grosse ferite causate da interventi risananti di capitozzatura del tronco, finalizzati all'eliminazione della parte di legno deteriorata dall'azione dei patogeni, è tuttora tecnica seguita, anche in ragione del successo agronomico di tali interventi se effettuati tempestivamente, in funzione dello sviluppo dell'infezione lungo il tronco. Non sono numerose le sperimentazioni specificamente indirizzate alla selezione dei preparati più idonei alla protezione dei grossi tagli (Vercesi, 1988; Frausin e Spessotto, 1996). Dalla metà degli anni novanta sono stati provati diversi preparati, alcuni appositamente formulati, tra i quali una particolare combinazione tra flusilazol e carbendazim (Escudo®) è stata registrata in Francia per l'esca e utilizzata per l'eutipiosi (Dumot *et al.*, 2004). Tali formulati sono stati applicati anche attraverso cesoie munite di piccoli serbatoi a pressione contenenti il prodotto distribuito sulla ferita fresca dopo il taglio (Dubos, 1996). Questi tentativi, condotti prevalentemente in Francia, suscitavano forti perplessità presso gli operatori, soprattutto di ordine pratico, unitamente all'impossibilità di verificare in tempi brevi i vantaggi sperati. Tutto ciò ha limitato l'utilizzo del formulato.

In linea generale, l'esperienza maturata in vigneto sembra accreditare ai formulati rameici un'azione complessivamente più convincente. Nondimeno buone indicazioni sono state ottenute con mastici cicatrizzanti anche addizionati da fungicidi, nonostante siano state segnalate crepe e fessurazioni in tempi successivi l'applicazione dei mastici, con la formazione di fenditure tra mastice e superficie della ferita in cui i microrganismi possono trovare ricovero o un ambiente favorevole al loro sviluppo.

Infine, le esperienze condotte con *Trichoderma* per la protezione di ferite su grosse superfici di taglio non hanno sortito risultati positivi (Bisiach *et al.*, 1996; Spiers e Brewster, 1997).

### L'impiego di prodotti a base di arsenico

La lotta al mal dell'esca della vite è stata storicamente associata all'utilizzo di formulati a base di arsenico. Questi prodotti sono stati impiegati per la prima volta in Francia negli anni venti del secolo scorso, a seguito di studi di laboratorio condotti da Viala (Rui, 1971). Temporaneamente abbandonati nel 1959 a causa di un aumento dei costi dovuti all'aggiunta di un repellente per la salvaguardia della fauna selvatica, gli arseniti sono stati poi riutilizzati poiché ritenuti unica forma di contenimento nei confronti dell'esca, anche in ragione di fenomeni di recrudescenza della malattia. Il definitivo ritiro dal mercato, per comprovati effetti cancerogeni, è avvenuto in Italia nel 1977, ma procrastinato in altri Paesi fino al 2001 (Calzarano e Di Marco, 1997).

Le numerose esperienze di lotta con l'arsenito di sodio, prevalentemente condotte in Francia, concordano sull'efficacia di trattamenti effettuati in inverno, durante il riposo vegetativo, attraverso un'unica applicazione del prodotto alla dose di 1250 g/hl, ripetuta l'anno successivo e seguita da 2 o 3 anni di riposo. Negli ultimi anni, soprattutto a seguito delle restrizioni o del definitivo ritiro del prodotto in altri Paesi europei, i trattamenti con il formulato si effettuavano mediante particolari attrezzature operanti a cavallo dei filari, munite di pannelli recuperatori, per contenere la dispersione del prodotto nell'ambiente. Questa evoluzione fu resa possibile grazie alle tipiche forme d'allevamento della vite in Francia, caratterizzate da piante piccole allevate in sestri stretti, con elevato numero di viti per ettaro (Geoffrion, 1971, 1979, 1982; Boubals e Mur, 1983; Castaing, 1987; Payan, 1987; Desache *et al.*, 1992; Le Gall, 1994; Desache *et al.*, 1995).

Nonostante le numerose esperienze condotte, sussistono ancora notevoli incertezze sul meccanismo d'azione dell'arsenico. Goidanich nel Manuale di Patologia Vegetale (1964) relativamente ai rimedi contro il mal dell'esca – non propriamente allora definito come tale, ma come carie causata da *S. hirsutum*, con la partecipazione di *Fomes igniarius* – relativamente all'arsenico riporta la “constatata tossicità sul microrganismo allevato in coltura artificiale”. Al contrario, studi recenti (Santos *et al.*, 2006a) sembrano escludere un'azione diretta sui patogeni dell'esca (dai quali attualmente sembra escluso *S. hirsutum*). Osservazioni su tessuti legnosi trattati con l'arsenico, condotti in microscopia elettronica, paiono indicare un accumulo dell'elemento in alcuni vasi del legno e una sua progressiva liberazione, che contrasta, in qualche modo, lo sviluppo o il metabolismo dei funghi. Quest'ultima ipotesi potrebbe spiegare l'efficacia delle strategie adottate, basate sulla possibilità di non eseguire i trattamenti ogni anno (Dubos, 1996). L'arsenico ha esercitato dunque un'azione di mascheramento sull'espressione della malattia, attraverso il contenimento dei sintomi, senza produrre significativi effetti sullo sviluppo dei patogeni all'interno del tessuto legnoso. Quindi l'intervento non assicurava una reale prevenzione dalla malattia, né consentiva alcuna forma di guarigione delle piante infette. Tuttavia, la sospensione dei trattamenti ha comportato una pericolosa recrudescenza della malattia, stimata da Dubos (1996) in un incremento annuo di manifestazione di circa il 4-5%.

In definitiva, il meccanismo d'azione dell'arsenico, ancora oggi non chiarito, è probabilmente frutto di un'interazione complessa, in linea con le peculiarità di una malattia caratterizzata dall'interazione tra sviluppo e natura dei patogeni coinvolti, fisiologia dell'ospite e condizioni agro-ambientali. Gli studi volti a individuare possibili sostituti, intensificatisi dopo il ritiro del prodotto, non hanno sortito ancora risultati positivi.

### Trattamenti alla pianta

A partire dalla seconda metà degli anni settanta, in ragione della scarsa efficacia e della elevata tossicità del DNOC, diversi principi attivi quali ossicarbossina, carbossina, anche in associazione rispettivamente con dodina e thiram, benodanil, fenarimol, triadimefon e furmetamide furono saggiate attraverso applicazioni al terreno. Le sperimentazioni, condotte in Centro Italia, non evidenziarono alcun effetto degno di nota sul contenimento della malattia, anche se, in taluni casi, sembrava rallentare l'evoluzione (Bisiach *et al.*, 1996).

Dalla fine degli anni ottanta, la crescente disponibilità di principi attivi dotati di ampio spettro d'azione, attività a bassi dosaggi ed elevata sistemicità, unitamente alle nuove ipotesi eziologiche elaborate da Laignon e Dubos (1987; 1993; 1997) sul mal dell'esca, diedero nuovo impulso allo sviluppo di strategie di difesa. Buona parte delle ricerche fu realizzata utilizzando fungicidi triazolici, anche in ragione dei risultati ottenuti da studi condotti in vitro e su piante in vaso nei confronti di patogeni associati all'ampelopatia (Di Marco, 1990a; 1990b; Contesini e Faretra, 1991; Di Marco e Draghetti, 1993; Bisiach *et al.*, 1996; Jaspers *et al.*, 2001). Alcuni formulati furono utilizzati in prove di campo su viti infette che manifestavano sintomi della malattia, attraverso applicazioni al terreno in prossimità dell'apparato radicale con palo iniettore, e al tronco, attraverso siringhe a pressione dotate di serbatoio contenente il formulato e applicate nella zona basale.

Queste applicazioni, sviluppate e condotte prevalentemente in Italia, Francia e Spagna, hanno fornito risultati solo parzialmente positivi, attraverso una temporanea riduzione dell'espressione del sintomo fogliare. Tale riduzione, peraltro, è apparsa subordinata alla effettuazione degli interventi nelle prime fasi di comparsa della malattia e quando la diffusione di quest'ultima nel vigneto si dimostrava piuttosto contenuta (Di Marco, 1990a; 1990c; Di Marco e Draghetti, 1992b; Di Marco *et al.*, 1993; Dubos, 1996; Pérez Marín *et al.*, 1996; Di Marco *et al.*, 2000). I migliori risultati sono stati ottenuti in prove condotte nella provincia di Teramo, abbinando l'intervento di capitozzatura all'iniezione al tronco (Calzarano *et al.*, 2004a; Cesari *et al.*, 2005).

Ulteriori studi sono stati avviati nella seconda metà degli anni novanta, al fine di verificare l'effetto di applicazioni di fosetyl Al nei confronti dell'esca. Le ricerche sono state intraprese sulla base di prime osservazioni empiriche in vigneto e in ragione della complessità del meccanismo d'azione del principio attivo, basato su un incremento di resistenza della pianta e su un'attività diretta nei confronti del patogeno verificando possibili effetti sui funghi associati all'esca, sull'espressione della malattia e/o sulla sua diffusione nell'impianto. L'ipotesi si basa su un possibile effetto collaterale di trattamenti antiperonosporici realizzati per anni nel vigneto, prima della manifestazione della malattia, nel tentativo di sviluppare una strategia “preventiva”, per lo meno svincolata dalla comparsa del sintomo fogliare.

Ricerche condotte in ambiente controllato hanno consentito di verificare una limitazione, talvolta significativa, dello sviluppo di necrosi prodotte da *P. chlamydospora* e *P. aleophilum* in giovani piante allevate in vaso, a seguito di applicazioni fogliari di fosetyl Al precedenti l'inoculazione e, in campo, un iniziale contenimento della manifestazione dei sintomi fogliari (Di Marco *et al.*, 1999). Ulteriori ricerche di laboratorio, sembrano far emergere un'interazione positiva tra acido fosforoso, principale metabolita di fosetyl Al e fitoalessine della vite, principalmente resveratrolo, sulla cui modulazione nei tessuti legnosi, a seguito dei trattamenti e in presenza dell'infezione, si sta ancora indagando (Di Marco *et al.*, 1997; 1998; 1999; Mazzullo *et al.*, 2000; Di Marco *et al.*, 2000; Laukart *et al.*, 2001).

### *Interventi in vivaio*

I tentativi di contenimento della malattia in vivaio sono di recente sviluppo e mutuati dalle osservazioni sulla presenza di patogeni associati all'esca in barbatelle, che stanno contribuendo a delineare un quadro della malattia quanto mai complesso, dalla produzione di barbatelle in vivaio alla maturità degli impianti (Surico *et al.*, 1998; Surico, 2001a; Stamp, 2001; Fourie e Halleen, 2002).

La maggior parte delle ricerche è stata finalizzata alla verifica dell'efficacia di trattamenti termici effettuati immergendo piante madri e marze in acqua a 50°C per 30 minuti, immediatamente seguiti da un ulteriore bagno di 30 minuti in acqua fredda (Crous *et al.*, 2001; Fourie *et al.*, 2001). Le ricerche, condotte prevalentemente all'estero, sembrano fornire indicazioni positive ma non definitive. Alcuni autori hanno infatti evidenziato effetti transitori dell'intervento, verificando nel tempo la sopravvivenza di *P. chlamydospora* e *P. aleophilum* (Rooney e Gubler, 2001).

Ulteriori indagini sono state avviate al fine di valutare trattamenti con prodotti biologici a base di *Trichoderma* in diverse fasi di produzione delle barbatelle. Si indaga su possibili effetti dei trattamenti nei confronti dei patogeni associati all'esca e sulla possibilità di produrre piante con caratteristiche tali da poter meglio resistere a patologie correlate a situazioni di stress, quali l'esca.

### *Le pratiche agronomiche*

Sebbene questi ultimi anni siano stati caratterizzati da un'intensa attività di ricerca, finalmente organizzata in gruppi di lavoro, e recenti studi sulla malattia offrano indicazioni sempre nuove su aspetti eziologici ed epidemiologici, l'attuazione delle pratiche colturali, già nel 1964 indicate da Goidanich, nel suo *Manuale di Patologia Vegetale*, costituiscono un momento importante per la limitazione della diffusione della malattia e dei suoi effetti.

Di seguito sono sintetizzate le principali pratiche allora consigliate:

- disinfettare con prodotti a base di rame le piante che hanno subito danni da gelo o forti grandinate; disinfettare tempestivamente i grossi tagli con mastici cicatrizzanti, anche formulati con fungicidi;
- non lasciare, per quanto possibile, residui di potatura nel vigneto per eliminare possibili sorgenti di inoculo;
- effettuare la potatura invernale poco prima della ripresa vegetativa per favorire un più rapido processo di cicatrizzazione della ferita;
- contrassegnare le piante colpite dalla comparsa dei primi sintomi fogliari: l'operazione consente potature separate tra apparentemente sane e sintomatiche e una percezione più reale dell'incidenza della malattia;
- disinfettare gli attrezzi di potatura resta ancora oggi una misura profilattica di carattere generale;
- asportare tempestivamente piante morte o irrimediabilmente colpite o parti di esse;
- ricorrere tempestivamente a interventi di risanamento di viti con sintomi della malattia, attraverso "tagli di ritorno".

In più occasioni si è sottolineato come tali pratiche siano spesso, a torto, trascurate, forse anche a causa della mancanza di risultati verificabili per lo meno nel breve periodo,

condizione questa che da sempre rappresenta un limite per la valutazione degli interventi di difesa contro il mal dell'esca.

### **VII.1.3 Conclusioni**

Quanto sopra riportato evidenzia come, storicamente, lo sviluppo di strategie di difesa sia stato limitato dalle scarse conoscenze della malattia e per questo concepito dopo la manifestazione dei sintomi fogliari e in presenza di un elevato numero di soggetti colpiti.

I progressi compiuti in questi ultimi anni, quali ad esempio più circostanziate ipotesi sulla natura del sintomo fogliare – cui spesso si lega la percezione della malattia da parte dei viticoltori – e il rapporto tra entità del sintomo e danno prodotto alla produzione, aprono nuove possibilità di intervento. In questo quadro complesso e dinamico si innesta il lavoro svolto nell'ambito del progetto, finalizzato a determinare l'efficacia e soprattutto la trasferibilità di interventi di contenimento della malattia e dei suoi effetti agli operatori del settore vivaistico e vitivinicolo.

## VII.2 La lotta contro il mal dell'esca in vivaio

S. Di Marco\*, F. Osti

### VII.2.1 Introduzione

L'evoluzione delle conoscenze sul mal dell'esca maturate nell'ultimo decennio ha consentito di associare funghi tracheomicotici dell'esca, *Phaeoacremonium aleophilum* (*Pal*) e, soprattutto, *Phacomoniella chlamydospora* (*Pch*), a fenomeni di imbrunimento e di formazione di strie nere con essudati gommosi scuri presenti nei portinnesti, in talee autoradicate e in barbatelle pronte per essere messe a dimora (Bertelli *et al.*, 1998; Surico *et al.*, 1998; Rego *et al.*, 2000; Zanzotto *et al.*, 2001; Sidoti *et al.*, 2000; Stamp, 2001; Laukart *et al.*, 2001; Fourie e Halleen, 2002; Whiteman *et al.*, 2003).

I diversi autori sopra citati riportano dati assolutamente variabili (da 0 all'80%), in termini di percentuali di isolamento di funghi per pianta e di piante infette. I risultati ottenuti non chiariscono in maniera definitiva l'origine della presenza dei patogeni nel materiale di propagazione, le complesse relazioni esistenti tra le alterazioni del legno, i microrganismi e gli eventi traumatici che intervengono nella lavorazione di detto materiale, né i fenomeni fitopatologici a cui una barbatella così infettata può andare incontro. Tuttavia, la presenza di imbrunimenti e l'isolamento dei funghi tracheomicotici dell'esca costituiscono serio motivo di preoccupazione per vivaisti e viticoltori.

La presenza di patogeni all'interno della barbatella rappresenta dunque una condizione di allarme per la maggiore probabilità di un successivo sviluppo dell'esca in campo o, nondimeno, anche di ulteriori nuove infezioni dei patogeni associati alla malattia che possono aver luogo su soggetti già "infetti", pur in fase latente e verosimilmente più predisposti a affezioni di diversa natura.

Quanto sopra riportato ha stimolato lo sviluppo di interventi realizzati durante le fasi di produzione delle piante in vivaio, volti a ridurre le occasioni di infezione, a risanare anche parzialmente il materiale di propagazione o a produrre piante più resistenti all'infezione e ai suoi effetti.

### VII.2.2 Impiego di formulati biologici

La presenza di *Pch* e *Pal* nel tessuto legnoso è stata accertata in diverse fasi della lavorazione in vivaio; tra queste, la raccolta del materiale di propagazione in dormienza, l'immersione

in acqua e reidratazione, l'innesto, la forzatura e il trapianto in barbatellaio sono risultate a maggior rischio d'infezione (Ridgway *et al.*, 2002).

Questa potenziale capacità di contrarre l'infezione in tanti momenti del processo di produzione delle barbatelle, unitamente al prolungato e complesso rapporto che si instaura tra patogeno e pianta ospite, che non si esaurisce in una semplice relazione di causa ed effetto, ha indirizzato gli interventi alla verifica dell'efficacia di formulati commerciali a base di *Trichoderma*. Il microrganismo è stato quindi scelto e utilizzato per la molteplicità degli effetti, esercitati direttamente nei confronti del patogeno e/o attraverso l'induzione di una maggiore resistenza alle malattie e di un miglioramento delle caratteristiche morfologiche della pianta ospite (Harman *et al.*, 2004). Tale azione complessa può produrre effetti positivi e duraturi nel tempo, in ragione della colonizzazione della pianta da parte del prodotto biologico.

### Materiali e metodi

L'attività è stata condotta principalmente presso i vivai Dalmonte Guido e Vittorio, struttura commerciale operante nell'ambito di un territorio caratterizzato da consistente attività vivaistica di produzione di barbatelle di vite, e dalla vicinanza del Polo scientifico tecnologico di Tebano, al cui interno opera il CAV (Centro Attività Vivaistiche) e in cui hanno luogo attività didattiche associate al corso di Viticoltura ed Enologia dell'Università di Bologna.

Si è operato utilizzando prevalentemente Rootshield granules® un formulato a base di *Trichoderma harzianum* T22 a 150 g di formulato commerciale per 10 litri di acqua, (formulazione commerciale a  $1 \times 10^7$  UFC/g). Diverse applicazioni sono state condotte anche con Remedier®, a base di *T. harzianum* icc 012 2,0% e *Trichoderma viride* icc 080 2,0%, nei confronti del quale i dosaggi d'applicazione sono in corso di ulteriore messa a punto.

I trattamenti sono stati quindi realizzati operando su 3 diverse combinazioni innesto-portinnesto utilizzando Trebbiano Romagnolo TR3T innestato su 1103P, K5BB e SO4. La produzione delle barbatelle ha seguito le normali operazioni di vivaio e mazzi di 700-900 piante, predisposti dai vivaisti secondo consuetudine, sono state trattate in base al seguente schema:

1. alla forzatura, immergendo completamente per 1 ora barbatelle innestate nella sospensione del formulato a base di *Trichoderma* e collocando poi le stesse all'interno dei cassoni di forzatura (aprile);
2. in pre-trapianto in terreno di vivaio (maggio) immergendo le barbatelle all'altezza del callo radicale (stesso tempo e dose). Questa seconda modalità ha previsto un'ulteriore applicazione al terreno, nell'area sottostante la chioma, in prossimità dell'apparato radicale in sviluppo, a dosi ridotte di formulato;
3. intervenendo sommando le applicazioni sopra descritte ai punti 1 e 2.

A supporto delle prove in vivaio, le tre tipologie di intervento sono state riprodotte in condizioni controllate al fine di condurre prove parallele su barbatelle trapiantate in vaso e infettate artificialmente al tronco applicando un cilindretto di agar-micelio di *Pch* all'interno di un foro procurato con trapano a mano, proteggendo poi l'area d'inoculo con parafilm. Queste prove sono state condotte al fine di valutare più compiutamente l'azione dei formu-

\* CNR - IBIMET, Bologna email: s.dimarco@ibimet.cnr.it



Fig. 1 - Applicazione di Trichoderma in vivaio. Immersione delle barbatelle in pre-forzatura (a, b); immersione delle barbatelle all'altezza del callo radicale (c) e ulteriore applicazione al terreno a dosi ridotte di formulato (d, e)

lati biologici, soprattutto in ragione della nota variabilità dei dati riscontrati nella determinazione delle infezioni naturali. Le prove sono state condotte sia operando in regime di agricoltura biologica (Reg. CEE 2092/91, sue successive modifiche e integrazioni), sia in condizioni di produzione vivaistica tradizionale.

**Risultati ottenuti**

Al termine del triennio di prove, i risultati più interessanti sono stati conseguiti con il trattamento al callo radicale e al terreno con l'apparato radicale in crescita (punti d, e, in fig. 1). Di seguito si riferiscono i risultati più significativi, ottenuti in maniera costante nei 3 anni di prove relativamente alle 3 diverse combinazioni innesto-portinnesto oggetto d'indagine.

**Barbatelle vegetate**

Il trattamento al callo radicale e al terreno, non ha di norma interferito in maniera significativa sulla percentuale di barbatelle vegetate, sia in vivaio tradizionale sia in regime di agricoltura biologica (tab. 1 e fig. 1). In generale, ove l'effetto è stato registrato, ha avuto un andamento contraddittorio, con riduzioni o incrementi di barbatelle vegetate.

L'effetto dei trattamenti è stato osservato soprattutto nei rilievi condotti nel corso dello sviluppo delle barbatelle in campo, dove una differenza fra trattato e non trattato si è verificata all'inizio (K5BB) o alla fine (1103P) della stagione stessa.

**Tab. 1 - Percentuale di barbatelle raccolte alla fine stagione vegetativa in vivaio a conduzione biologica\***

Tesi	Rootshield 2005		Rootshield 2006		Remedier 2006	
	K5BB	1103P	K5BB	1103P	K5BB	1103P
Trichoderma	46,8	57,0	52,0	73,0	54,0	67,3
Testimone	47,8	67,3	53,6	64,0	53,6	64,0

I valori in colonna non differiscono statisticamente secondo il Test di Duncan (P = 0,05).

\* Fonte: DI MARCO S., OSTI F. (2008b) – *Effects of Trichoderma applications ...*, vol. 1, pp. 484-487.

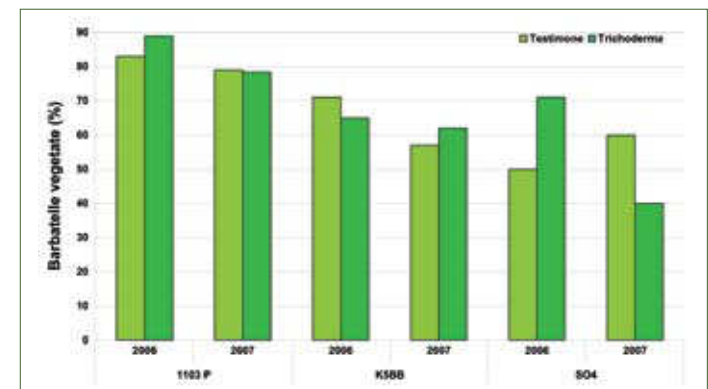


Fig. 2 - Percentuale di barbatelle raccolte in vivaio a fine ciclo vegetativo. Per ogni anno e portinnesto, i valori del testimone e della tesi Trichoderma (Rootshield) non differiscono statisticamente secondo il Test di Duncan (P = 0,05)

**Selezione delle barbatelle a banco**

La selezione delle barbatelle è avvenuta con l'ausilio di operatori del vivaio secondo i parametri definiti dalla direttiva UE 2005/43, del 23 giugno 2005 (fig. 3, punto b). Per ogni anno di prova e per ogni combinazione innesto-portinnesto, sono state condotte osserva-



Fig. 3 - Raccolta delle barbatelle a fine stagione vegetativa (a) e selezione a banco (b)

zioni su alcune centinaia di piante, confrontando quelle trattate al callo radicale e al terreno (punto 2 dello schema) rispetto a quelle non sottoposte ad alcun tipo di intervento.

In generale, la percentuale delle viti di prima scelta non varia significativamente in funzione del trattamento, indipendentemente dalla combinazione innesto-portinnesto esaminata.

Nel caso del vivaio biologico si è registrato un incremento a volte significativo della percentuale di barbatelle di prima scelta, anche se la percentuale di piante vegetate in campo è risultata minore del testimone (fig. 2). La percentuale totale di barbatelle di prima scelta è risultata superiore nella tesi trattata con *Trichoderma* (Di Marco e Osti, 2006; 2008b).

**Effetti del trattamento sulle caratteristiche morfologiche della barbatella**

L'applicazione al callo radicale e al terreno dei formulati a base di *Trichoderma* ha sempre prodotto un migliore sviluppo dell'apparato radicale, con particolare riferimento alla formazione di capillizio (figg. 4-5).

Questi effetti sono stati registrati per tutte le combinazioni innesto-portinnesto, in piante in vaso e provenienti da terreno di vivaio, nei 3 anni di prova, in condizioni di vivaio biologico e tradizionale. La valutazione è stata effettuata dividendo l'apparato radicale in base al diametro delle radici (primarie, secondarie e capillizio) e misurandone la superficie con sistemi di analisi d'immagine. Le differenze registrate tra le tesi testimone e *Trichoderma* sono riportate nella fig. 5.

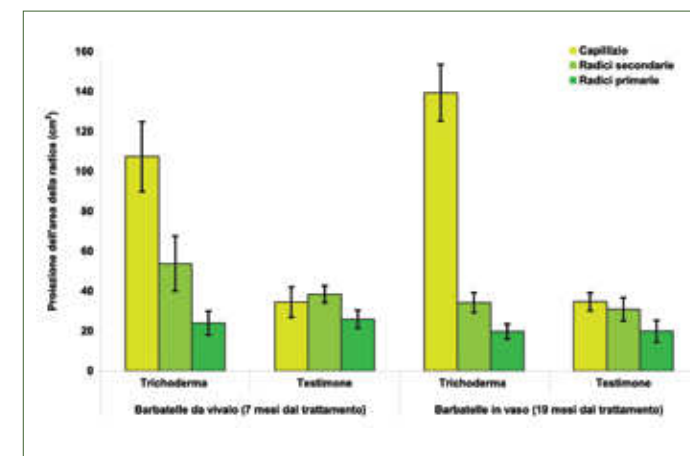
**Attività nei confronti di patogeni**

Osservazioni condotte su infezioni naturali da *Pch* e *Pal* a fine stagione vegetativa non hanno consentito di mettere in evidenza differenze rilevanti tra la tesi trattata e quella testimone soprattutto in ragione della bassa percentuale di isolamento dal testimone.



Fig. 4 - Apparato radicale di barbatelle allevate in vaso (a); classificazione in base al diametro delle radici, capillizio, radici secondarie e primarie (b); capillizio (c);

Fig. 5 - Sviluppo dell'apparato radicale di barbatelle di Trebbiano Romagnolo innestate su K5BB e allevate in vaso o in terreno di vivaio. Le barre sugli istogrammi rappresentano la deviazione standard. Fonte: Di Marco e Osti, 2007



**Sviluppo di necrosi da infezioni artificiali di Phaeomoniella chlamydospora**

La prova è stata indirizzata alla verifica dell'efficacia del trattamento con *Trichoderma* al callo radicale e al terreno, nei confronti di inoculazioni effettuate attraverso inserimento di cilindretti di agar-micelio di *Pch* in ferite artificialmente provocate al tronco di piante allevate in vaso Trebbiano Romagnolo su K5BB.

I rilievi sono stati condotti a 5 e 15 mesi dall'inoculazione. A 5 mesi dall'inoculazione, la necrosi si è sviluppata mediamente per non più di 2 centimetri, risultando perciò problematico valutare la tendenziale riduzione osservata nella tesi trattata. A 15 mesi dall'inoculazione, il trattamento appare in grado di ridurre significativamente l'estensione delle necrosi originate dall'inoculazione con *Pch*, senza peraltro impedirne lo sviluppo (tab. 2).

**Sviluppo di Botrytis cinerea sulla superficie fogliare**

Scopo della prova è stato la verifica di eventuali fenomeni associabili a una resistenza indotta dal trattamento nei confronti di infezioni che hanno luogo lontano dal sito d'applicazione. Lo studio è stato effettuato in laboratorio raccogliendo in settembre, in vivaio, foglie

Tesi	Lunghezza media della necrosi (cm)		Tesi	Lunghezza media della necrosi (cm)	
	5 mesi	15 mesi		5 mesi	15 mesi
Rootshield	1,4 a**	3,6 b	Remedier	1,8 a	3,3 b
Testimone	1,9 a	7,0 a	Testimone	2,5 a	4,9 a

\* Effetti di applicazioni di *Trichoderma* sullo sviluppo di necrosi da inoculazioni artificiali di *Pch* eseguite 10 settimane dopo il trapianto in vaso, al tronco di barbatelle di Trebbiano Romagnolo innestato su K5BB. I rilievi sono stati effettuati a 5 e 15 mesi dall'inoculazione [Fonte parziale: Di Marco e Osti, 2007].

\*\* I valori in colonna seguiti dalla stessa lettera non differiscono statisticamente secondo il Test di Duncan (P= 0,05).

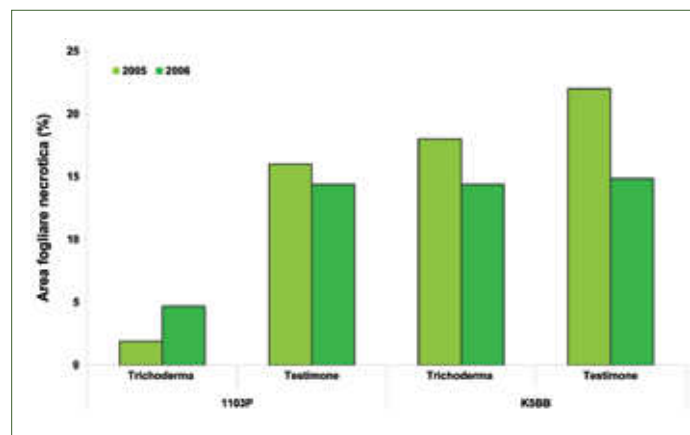


Fig. 6 - Percentuale di area fogliare affetta da necrosi causata da *Botrytis cinerea* inoculata artificialmente su foglie prelevate da barbatelle di Trebbiano Romagnolo TR3T innestato su 1103P o K5BB allevate in terreno di vivaio

dalle barbatelle trattate con *Trichoderma* o testimoni. Le foglie sono state inoculate secondo metodologia nota, applicando diverse gocce per foglia di sospensione conidica di *Botrytis cinerea*, (acqua per il testimone), monitorando lo sviluppo dell'infezione rilevata poi a 7 giorni dall'inoculazione e calcolando con sistemi di analisi d'immagine la percentuale di superficie interessata da necrosi rispetto alla superficie totale.

Il trattamento ha evidenziato uno minor sviluppo di botrite su foglia, statisticamente significativo per il portinnesto 1103P (fig. 6).

### VII.2.3 Considerazioni conclusive

Le applicazioni di formulati a base di *Trichoderma* realizzate nel triennio 2005-07 in vivaio tradizionale o condotto in regime di agricoltura biologica, hanno permesso di verificare una serie di tesi di seguito esposte.

L'attività dei formulati a base di *Trichoderma* è apparsa subordinata a fasi determinate della produzione di barbatelle in vivaio. In particolare, i risultati più interessanti e trasferibili sono stati conseguiti operando un intervento al callo radicale, poco prima del trapianto in campo, seguito da un'ulteriore applicazione al terreno, a dose ridotta, durante lo sviluppo dell'apparato radicale. I trattamenti effettuati in altre fasi o ripetuti hanno a volte determinato effetti peggiorativi rispetto a piante non trattate.

Il trattamento eseguito secondo la modalità 2 dello schema ha prodotto una serie di effetti positivi sia direttamente verificati sulla pianta, sia nei confronti di infezioni di patogeni artificialmente inoculati. Di seguito sono elencati i più importanti benefici riscontrati:

- i trattamenti non hanno interferito in maniera significativa sulla percentuale di barbatelle vegetate in campo;
- le barbatelle trattate hanno evidenziato un forte incremento e miglioramento dello sviluppo dell'apparato radicale, attraverso un significativo aumento di capillizio;
- un significativo contenimento della crescita della necrosi originata da *P. chlamydospora*

inoculata al tronco delle barbatelle è stato verificato a un anno dall'occorrere dell'infezione; non è stato possibile, tuttavia, conseguire un completo contenimento dell'infezione;

- un'azione a distanza da parte del *Trichoderma* è stata evidenziata attraverso il contenimento degli effetti di infezioni di *Botrytis cinerea* sulle foglie di piante trattate.

I trattamenti con *Trichoderma* non hanno permesso di conseguire una completa protezione delle barbatelle da *Phaeoconiella chlamydospora*. I risultati riassunti nei punti sopra riportati sono in linea con prove condotte in vivaio da altri autori che hanno verificato, su infezioni naturali, una minor incidenza totale di patogeni in barbatelle trattate con *Trichoderma*, senza conseguire una piena esenzione da potenziali infezioni (Fourie e Halleen, 2004b).

Le prove condotte hanno permesso di evidenziare primariamente i momenti di lavorazione più appropriati per l'applicazione del prodotto, che ha garantito un livello di efficacia uniforme e costante relativamente alle diverse combinazioni innesto-portinnesto saggiate nei tre anni di prove. I risultati dell'applicazione dei formulati a base di *Trichoderma* al callo radicale e al terreno sono stati caratterizzati da andamenti ripetuti nel tempo. L'uniformità di risposta, evidente in maggior misura nelle prove condotte in vivaio a conduzione tradizionale, è condizione di grande importanza, non sempre riscontrabile operando con prodotti biologici nelle applicazioni in campo.

Questo studio ha dimostrato che ripetute applicazioni del prodotto biologico hanno in taluni casi (ad esempio: percentuale di barbatelle vegetate, resistenza alla botrite ecc.) sortito effetti negativi e, in generale, mai sinergici, evidenziando una volta di più la complessità dell'interazione *Trichoderma*-pianta-patogeno. Il trattamento al callo radicale, seguito da applicazione a dose ridotta in terreno di vivaio, ha prodotto effetti atti a migliorare caratteristiche qualitative attinenti la morfologia e la fisiologia della pianta, riducendone inoltre la sensibilità alle infezioni e loro effetti.

Il miglioramento della qualità delle barbatelle, assai evidente attraverso l'eccellente sviluppo dell'apparato radicale, ha verosimilmente permesso alle piante un migliore utilizzo dell'acqua e dei soluti e un più efficace accumulo di sostanze di riserva. Questa condizione, può favorire un successivo attecchimento all'atto dell'impianto in vigneto, favorendo inoltre una maggiore resistenza a fenomeni legati a stress durante le prime e delicate fasi di crescita della pianta.

La maggiore resistenza agli stress è stata anche espressa dalla minor suscettibilità delle barbatelle ai patogeni inoculati artificialmente che sono stati contenuti sulle in varia misura a seguito del trattamento all'apparato radicale con il *Trichoderma*. La capacità di contenere le necrosi causate da *Phaeoconiella chlamydospora*, si conferma non significativa in un arco temporale relativamente breve (circa 4-5 mesi dall'inoculazione e nella medesima stagione del trattamento), mentre appare più consistente a distanza di almeno un anno dalle inoculazioni. Tale fatto farebbe presumere un'attiva colonizzazione delle radici della pianta *Trichoderma* con conseguente aumento del suo grado di attività nei confronti della pianta ospite.

In definitiva, il lavoro ha indicato da un lato la capacità da parte di formulati a base di *Trichoderma* di determinare un miglioramento di parametri qualitativi del materiale di propagazione, anche finalizzati a una potenziale minore sensibilità ai patogeni, *Pcb* incluso, dall'altro ha definito le migliori condizioni e modalità di utilizzo dei prodotti biologici utilizzati, potenzialmente in grado, se ben gestiti, di produrre in vivaio effetti positivi multipli.



## VII.3 La lotta contro il mal dell'esca in vigneto

### VII.3.1 Protezione delle ferite fresche di potatura con prodotti biologici a base di *Trichoderma*

Stefano Di Marco

#### Introduzione

La lotta al mal dell'esca in vigneto costituisce la parte più complessa e difficile della strategia di difesa, soprattutto in ragione del fatto che nella maggior parte dei casi l'analisi del risultato è basata sulla manifestazione del sintomo fogliare, parametro soggetto a fluttuazioni naturali. La sperimentazione deve quindi svolgersi in più anni se si vogliono ricavare dati utili sulla reale efficacia di un qualsiasi intervento di lotta e sulla sua trasferibilità.

L'abbandono dei trattamenti a base di arsenico che hanno consentito, in determinate condizioni, di contenere gli effetti della malattia in vigneto, non è stato compensato da prodotti o tipologie di intervento di uguale efficacia. L'ampia sperimentazione su diverse modalità di applicazione di agrofarmaci al terreno o al tronco condotta per diversi anni su singole piante sintomatiche ha determinato, nel migliore dei casi, una riduzione temporanea della manifestazione del sintomo fogliare (Di Marco *et al.*, 2000). In definitiva, i risultati più interessanti e duraturi sono stati conseguiti abbinando l'applicazione di fungicidi al tronco a interventi di capitozzatura, metodo peraltro piuttosto oneroso e non facilmente trasferibile in tutte le realtà viticole in cui l'esca produce danni (Calzarano *et al.*, 2004a).

I progressi conseguiti sulla malattia a proposito dei processi infettivi in atto nelle diverse età della pianta hanno consentito di formulare ipotesi più circostanziate sul rapporto tra patogeni, espressione del sintomo fogliare, fisiologia della pianta e condizioni agro-ambientali (Surico *et al.*, 2006). A seguito di tali studi e dei risultati conseguiti in ricerche condotte in ambiente controllato e, in via preliminare, in campo, sono state approntate prove atte a verificare l'effetto di trattamenti condotti con formulati biologici e chimici in vigneto, nella maggior parte dei casi su piante interessate da esca propria (Di Marco *et al.*, 1999; Di Marco e Osti, 2005a; 2005b).

Nell'ambito del progetto sono state così approfondite e sviluppate applicazioni di formulati biologici per la protezione delle ferite fresche di potatura e verificati gli effetti sulla malattia di trattamenti effettuati con fosetyl Al in funzione antiperonosporica e con prodotti biostimolanti distribuiti nel vigneto durante la stagione vegetativa.

Le ferite di potatura sono considerate la principale via di penetrazione dei funghi associati al mal dell'esca. L'utilizzo di formulati biologici a base di *Trichoderma* è stato valutato per l'efficacia in vitro nei confronti di *Phaeoconiella chlamydospora* (*Pch*) e *Phaeoacremonium aleophilum* (*Pal*) (Di Marco *et al.*, 2002) e per l'eventuale capacità di colonizzazione della fe-

rita da parte del microrganismo, potenzialmente in grado di esercitare un effetto prolungato nel tempo (John *et al.*, 2005). Quest'ultima caratteristica è di grande importanza, considerando che le ferite possono rimanere infette per diverse settimane (Larignon, 1988).

#### Materiali e metodi

Le applicazioni sono state realizzate con formulati a base di *Trichoderma harzianum* (inizialmente con Trichodex® e successivamente utilizzando una formulazione di Rootshield® in polvere bagnabile) alle dosi indicate, in vigneti ubicati nella zona vini DOC Colli bolognesi, cv. Riesling e Sauvignon, di oltre 12 anni d'età e affetti da esca propria (tracheomicosi + carie). I prodotti sono stati distribuiti anche in miscela con pinolene, emulsione concentrata ottenuta da resina di pino (Vapor Gard®) per favorirne l'adesione alle parti legnose della pianta. Si è operato su un totale di circa 2000 piante.

I trattamenti sono stati realizzati con atomizzatore aziendale immediatamente dopo le operazioni di potatura, opportunamente posticipata al fine di ridurre il periodo d'esposizione delle ferite all'infezione ed evitare eventuali problemi al *Trichoderma* derivanti dalle basse temperature.

In alcuni casi il trattamento è stato ripetuto a distanza di 3 settimane.

A supporto dell'attività in vigneto, sono state condotte prove su viti cv. Montuni allevate in vaso, sottoponendo i tralci dell'anno a un taglio di potatura a fine inverno. La ferita è stata immediatamente trattata con sospensione conidica ricavata da colonie di *Trichoderma viride* e *Trichoderma longibrachiatum* allevate in piastra e con i formulati commerciali prima citati. Un'inoculazione è stata eseguita 24 ore dopo il trattamento applicando una goccia di sospensione conidica ( $1,7 \times 10^7$  conidi/ml) di *Pch* sulla superficie del taglio. Sono stati effettuati controlli periodici e un rilievo finale a circa un anno dal trattamento, eseguendo tagli radiali in prossimità delle ferite e isolamenti in laboratorio dei microrganismi presenti. Si è operato anche con l'ausilio di analisi istologiche condotte con microscopio ottico su campioni preventivamente fissati in gluteraldeide. Le prove sono state eseguite a fine di valutare l'azione dei formulati biologici in presenza di infezioni certe.

#### Risultati

Il triennio di prove ha consentito di ottenere dati sulle capacità di colonizzazione del legno da parte del *Trichoderma* e, limitatamente alle prove su viti in vaso, di riduzione degli effetti dell'infezione di *Pch*. Di seguito sono riportate le principali acquisizioni.

##### *Persistenza del Trichoderma sulla pianta*

Gli isolamenti effettuati su frammenti di legno provenienti dalla ferita e dall'area a essa adiacente hanno permesso di isolare di nuovo il *Trichoderma* dopo oltre 60 giorni dall'applicazione, confermando quanto preliminarmente rilevato e riportato in *fig. 1*.

Ulteriori isolamenti condotti su piante in vaso inoculate con *Pch*, trattate con diversi formulati a base di *Trichoderma* e mantenute all'aperto, hanno evidenziato la presenza dell'agente di bio-controllo fino a 8-9 mesi dal trattamento.

\* CNR - IBIMET, Bologna email: s.dimarco@ibimet.cnr.it

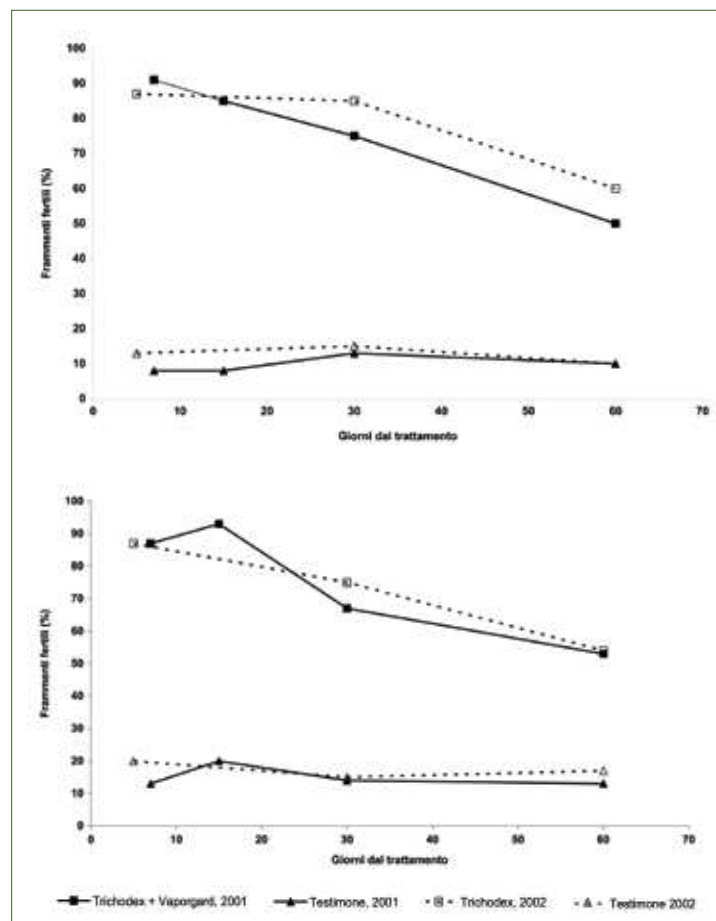


Fig. 1 - Isolamenti di *Trichoderma harzianum* da legno di vite proveniente da viti cv. Riesling (sopra) e cv. Sauvignon (sotto) prelevato nel corso della stagione vegetativa, a diversi giorni dal trattamento. I dati rappresentano i frammenti fertili. Applicazioni effettuate in vigneto con Trichodex®. Fonte: Di Marco et al., 2004

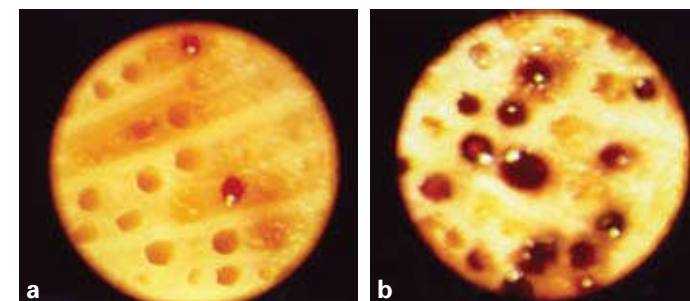
**Effetto del trattamento sulla manifestazione di mal dell'esca nel vigneto**

Nel primo anno di prova la percentuale di piante sintomatiche rilevate a fine stagione vegetativa appariva tendenzialmente inferiore nelle piante trattate con *Trichoderma*. Al contrario, negli anni successivi non è stata rilevata alcuna differenza tra i testimoni e il trattato.

**Effetti del trattamento sull'infezione**

I dati sono relativi a indagini condotte su piante in vaso con l'ausilio di infezioni artificiali. Nella maggior parte dei casi non è stato possibile reisolare in maniera consistente il *Pch* in precedenza inoculato su pianta. Tuttavia, le prove hanno evidenziato esiti positivi a seguito dell'applicazione del *Trichoderma* sulla ferita fresca, attraverso una riduzione degli effetti dell'infezione sulla pianta visibili attraverso la produzione di gommosi all'interno dei vasi (fig. 2).

Fig. 2 - Sezione di tralcio potato e inoculato con *Pch* su ferita fresca. Il fungo non è stato re-isolato in maniera significativa, ma la pianta trattata (a) non ha prodotto la gommosi nera rilevata nel testimone (b)



**Considerazioni conclusive**

Le applicazioni di formulati a base di *Trichoderma* su ferite fresche di potatura hanno permesso di verificare quanto segue:

1. un solo intervento effettuato immediatamente dopo la potatura ha consentito di ottenere effetti simili a quelli ottenuti con due interventi, il secondo dei quali ripetuto a distanza di circa 2 settimane; l'aggiunta di pinolene non ha aumentato la persistenza del formulato biologico;
2. i formulati a base di *Trichoderma* sono apparsi in grado di colonizzare la ferita e il tessuto legnoso adiacente per almeno 60 giorni in vigneto e per oltre 8 mesi su piante in vaso allevate all'aperto.

I risultati conseguiti in più anni di sperimentazione non hanno permesso di rilevare un'attività nei confronti dei patogeni associati all'esca nella fase di contaminazione della ferita. Tuttavia, le ricerche condotte su pianta in vaso, con trattamenti e inoculazioni artificiali di *Pch*, hanno fatto rilevare una riduzione degli effetti dell'infezione sulle piante trattate con *Trichoderma*, attraverso una pressoché totale assenza di gommosi nera provocata dalla presenza del patogeno.

Non è stato possibile evidenziare alcun effetto positivo nei confronti della manifestazione dei sintomi fogliari del mal dell'esca nei vigneti trattati, in termini di riduzione dell'incidenza annuale o cumulata.

In definitiva, una protezione efficace delle ferite di potatura, principale via di penetrazione dei patogeni, resta un problema aperto. Il principale limite è rappresentato soprattutto dalla mancanza di prodotti che, pur dimostratisi efficaci in laboratorio nei confronti dei patogeni dell'esca (Jaspers, 2001; Eskalen *et al.*, 2007b) assicurino una persistenza d'attività commisurata alla prolungata infettività dei tagli di potatura (Eskalen *et al.*, 2007a; Serra *et al.*, 2007; van Niekerk *et al.*, 2007).

Il lavoro, supportato dalle indagini condotte nei primi anni duemila, ha permesso di evidenziare che il trattamento con *Trichoderma* assicura una colonizzazione della ferita consentendo una prolungata interazione con la pianta. Ricerche attualmente in corso tendono a definire l'efficacia dei trattamenti nei confronti dei patogeni dell'esca, al fine di poter sviluppare più compiutamente un'efficace forma di protezione delle ferite di potatura.

## VII.3.2 Ipoclorito di sodio per la protezione delle ferite

G. Scalabrelli\*, G. Ferroni

### Introduzione

È fatto acclarato che i tagli di potatura sono una via di ingresso dei patogeni che, poi, vanno a colonizzare il legno della vite, anche se non si può escludere che un certo ruolo nel decorso della malattia possano averlo funghi che si trovano sin dall'inizio nella pianta stessa. In attesa dell'approfondimento degli studi sulle relazioni tra pianta e ospite sono stati fatti vari tentativi per proteggere le ferite di potatura, soprattutto i grossi tagli che si eseguono nei vigneti adulti, che sono quelli più esposti alle infezioni dei funghi dell'esca. In questa ottica si inquadra l'esperienza che è stata condotta in località Crespina (Pisa), in un vigneto di Sangiovese di 12 anni di età, che aveva iniziato a mostrare già nel 1991 i primi sintomi di mal dell'esca.

### Materiali, metodi e risultati

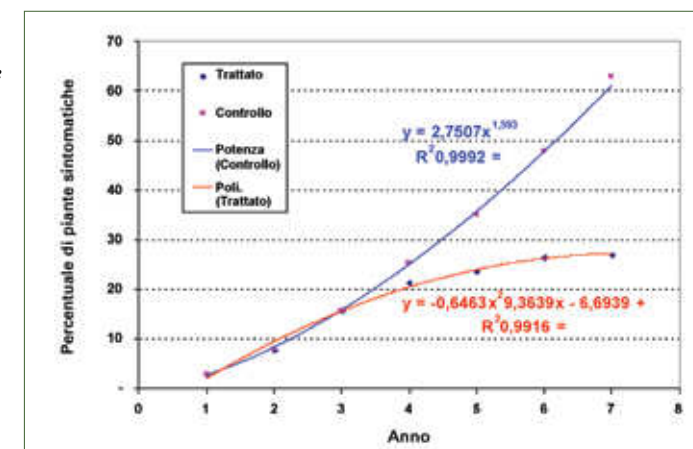
Il vigneto, della superficie di circa 2 ettari, è stato all'epoca suddiviso in due parcelle poi sottoposte alla stessa tecnica colturale con un'unica variante impostata al momento della potatura invernale. Nella parcella di controllo, infatti, la potatura è stata eseguita mediante una potatrice pneumatica portata da un trattore, mentre nella parcella trattata la potatrice pneumatica, era equipaggiata di un contenitore mantenuto a pressione, che a ogni taglio irrorava una soluzione acquosa (1/5 in volume) di ipoclorito di sodio (conc. dell'8%) in modo da mantenere costantemente pulite le lame durante il taglio.

La prova ha avuto inizio a partire dal 1992. Dal 1998 al 2000, le piante che manifestavano sintomi fogliari di esca sono state estirpate e sostituite l'anno successivo con nuove piante.

Durante il periodo 1992-2000 sono stati condotti rilievi sulla presenza di piante sintomatiche (su circa 1900 piante per tesi) ed è stata calcolata l'infezione cumulata (*fig. 1*). Dopo un periodo di interruzione dei rilievi (2001-2003) è stato condotto l'ultimo rilievo nell'autunno 2004 (*figg. 1-3*), a dodici anni dall'inizio della prova, osservando la diversa casistica che si era determinata in conseguenza di attacchi di diversa intensità. Si passava cioè da danni lievi a danni gravi che avevano determinato la perdita della parte aerea, con ricaccio del portainnesto, fino alla morte dell'intera pianta (*tab. 1*).

\* Università di Pisa email: gscalabrelli@agr.unipi.it

Fig. 1 - Effetto del trattamento con soluzione di ipoclorito di sodio durante l'esecuzione della potatura invernale con forbici pneumatiche sul decorso del mal dell'esca



Tab. 1 - Stato delle piante nell'autunno 2004 nelle due parcelle di vigneto

Categorie	Controllo		Trattato	
	numero	%	numero	%
Numero di piante monitorate	1.884		1.923	
Numero di piante sintomatiche	1.102	58,49	647	33,65
Piante morte	767	40,71	141*	7,33
Morte del tronco + ricaccio del portainnesto	203	10,77	51	2,65
Morte del tronco + ricaccio del vitigno	19	1,01	16	0,83
Piante con sintomi di esca nel 2004	113	6,00	60	3,12
Piante rimpiazzate	0	0,00	459**	23,87
Piante vive senza sintomi di esca	782	41,51	1.655	86,06

\* Piante morte dopo il 2000; \*\* Il rimpiazzo è stato effettuato nel periodo 1998-2000.

Nel primo anno di esperimento le viti con sintomi erano circa il 3% in entrambe le parcelle, mentre dopo due anni dall'inizio delle osservazioni l'incidenza cumulata delle piante affette da esca raggiungeva circa il 16%, senza differire tra i due trattamenti.

Le prime differenze sono comparse a partire dal quinto anno, quando è stato osservato nella parcella non trattata un rapido incremento delle piante sintomatiche, il cui modello seguiva una curva di potenza ( $y = 2,7507 \times 1,593$ ;  $R^2 = 0,9992$ ), mentre nella parcella trattata, cioè sottoposta a irrorazione durante la potatura invernale, l'incidenza era nettamente inferiore, essendo rappresentata da una curva quadratica ( $y = -0,6463x^2 + 9,3639x - 6,6939$ ;  $R^2 = 0,9916$ ). In sostanza, negli anni successivi la differenza riscontrata fra le due parcelle è andata sempre aumentando, mentre nel vigneto trattato l'infezione cumulata è rimasta pressoché stazionaria.

Le viti nella parcella non trattata sono state poi spiantate nel corso del 2005, avendo l'infezione cumulata superato il 58% (sintomatiche + morte) nel 2004 (*fig. 2*) mentre il vigneto

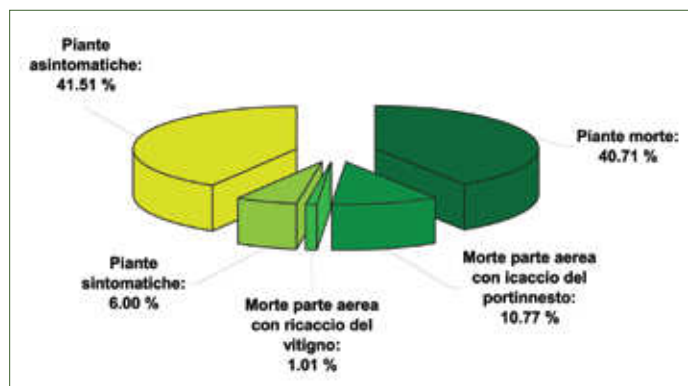


Fig. 2 - Stato delle piante nell'autunno 2004 nella parcella di vigneto non trattata

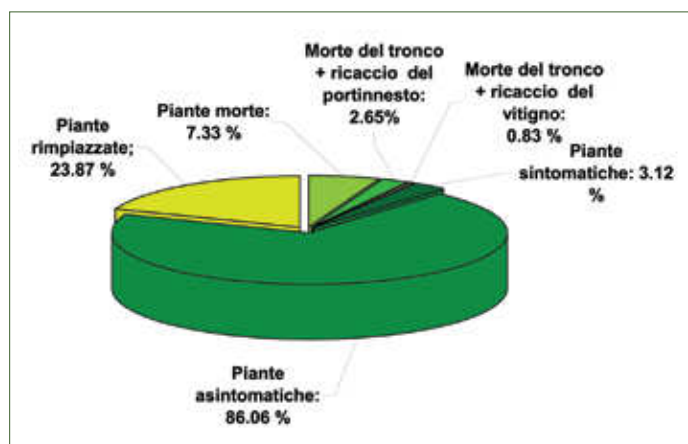


Fig. 3 - Stato delle piante nell'autunno 2004 nella parcella di vigneto trattato con irrorazione di ipoclorito di sodio durante la potatura invernale

trattato presentava una infezione cumulata di circa il 33,65%, a cui contribuivano anche il 23,87% di piante che erano state rimpiazzate, facendo quindi salire la percentuale di piante realmente non sintomatiche all'86,06%. Grazie a questo miglioramento del quadro sanitario il vigneto trattato è tuttora presente e viene gestito sempre con la stessa tecnica: negli anni successivi al 2004 ha mostrato una percentuale di piante sintomatiche abbastanza contenuta (incremento annuale del 4-6%).

### Conclusioni

Il diverso andamento dell'incidenza del mal dell'esca nelle due parcella sottoposte ad analisi, una trattata con ipoclorito di sodio e una non trattata, sembra portare alla conclusione che il trattamento effettuato contrasta il diffondersi della malattia nel vigneto. Inoltre, la sostituzione delle piante ammalate ha da un lato consentito di mantenere una buona produttività del vigneto e, dall'altro, ha contribuito, presumibilmente, a diminuire l'entità dell'inoculo disponibile per nuove infezioni.

Le differenze riscontrate mostrano dunque che l'irrorazione della soluzione di ipoclorito di sodio sulle lame al momento della potatura può ridurre significativamente la percentuale di piante con sintomi di mal dell'esca. Non si può tuttavia escludere che durante il taglio, l'irrorazione, oltre alla pulizia delle lame, possa contribuire a formare temporaneamente una barriera alla contaminazione/infezione del taglio di potatura. Pur non potendo scientificamente provare come questo trattamento funzioni è certo che l'utilizzo ripetuto di questa tecnica, associata alla sostituzione delle piante ammalate, sia in grado di attenuare l'incremento della infezione cumulata. L'utilizzo della pratica di cui si riferisce richiederebbe tuttavia una modifica del cantiere di lavoro di potatura che in questi ultimi anni si è orientato verso pre-potatrici con rifinitura a mano mediante forbici elettriche a zaino. Sarebbe comunque interessante approfondire questi aspetti, dal momento che la lotta contro il mal dell'esca è al momento affidata a interventi di natura esclusivamente preventivi.

### VII.3.3 Utilizzazione di mastici nella protezione delle ferite da potatura e nella prevenzione delle infezioni

S. Frisullo, A. Carlucci\*, F. Lops

L'impiego di mastici è stato sperimentato in Puglia, in un vigneto della cv. Italia di 15 anni di età, su piante con evidenti sintomi di mal dell'esca e piante apparentemente sane. Nel mese di gennaio degli anni 2005, 2006 e 2007, le ferite di potatura dell'anno in corso e quelle degli anni precedenti di alcune piante sono state protette con quattro differenti mastici con azione cicatrizzante, o impermeabilizzante, o antifungina (fig. 1). Altre ferite di potatura eseguite su piante malate e piante apparentemente sane non hanno ricevuto nessun trattamento.

I risultati ottenuti in laboratorio (tabb. 1, 2 e 3) indicano che dalle porzioni di branche di piante malate e di piante apparentemente sane non protette o protette con i mastici, sono quasi sempre



Fig. 1 - Tagli di potatura di piante di viti coperti con i diversi mastici: Pik (a, b), cera (c), Asfaltol (d, e), Bayleton (f)

\* Università di Foggia email: a.carlucci@unifg.it

Tab. 1 - Micoflora isolata (%) dai monconi di branche della cv. Italia (nel dicembre 2005)\*

Specie fungine isolate	Tagli di potatura protetti con:								Tagli di potatura non protetti	
	Pik		Bayleton		Asfaltol		Cera		M	S
	M	S	M	S	M	S	M	S		
<i>B. dothidea</i>	7,2	16,7	23,3	20,0	13,5	—	8,86	—	3,4	3,3
<i>N. parvum</i>	6,0	—	21,0	20,0	10,8	—	4,43	—	2,9	3,2
<i>D. seriata</i>	4,2	—	6,9	—	—	16,7	1,90	—	1,0	1,0
<i>D. mutila</i>	1,2	—	6,9	—	—	—	—	—	—	10,7
<i>F. mediterranea</i>	—	—	—	—	—	—	2,0	—	1,5	—
<i>P. aleophilum</i>	1,2	—	—	20,0	—	—	1,5	—	1,4	—
<i>P. chlamydospora</i>	1,1	16,7	—	—	—	16,7	—	—	1,3	6,9
<i>S. Ionicerae</i> <i>S. lichenicola</i>	1,3	—	1,1	—	1,3	—	—	—	2,0	—
<i>P. guepinii</i>	3,0	—	—	—	—	—	3,0	—	1,2	1,4

\* Micoflora isolata (%) nel dicembre 2005 dai monconi di branche della cv. Italia a 2 cm di distanza dalla superficie di taglio di piante naturalmente infette o apparentemente sane le cui ferite nel mese di gennaio 2005 erano state non protette o protette con i mastici: Pik, Bayleton, Asfaltol e Cera. M = piante malate; S = piante apparentemente sane.

Tab. 2 - Micoflora isolata (%) dai monconi di branche della cv. Italia (dicembre 2006)\*

Specie fungine isolate	Tagli di potatura protetti con:								Tagli di potatura non protetti	
	Pik		Bayleton		Asfaltol		Cera		M	S
	M	S	M	S	M	S	M	S		
<i>B. dothidea</i>	5,4	—	4,5	20,0	4,5	—	5,8	18,2	4,5	0,9
<i>N. parvum</i>	3,6	16,7	2,5	20,0	3,5	—	4,1	—	2,5	—
<i>D. seriata</i>	1,2	—	1,2	—	1,5	16,7	0,6	—	2,0	1,0
<i>D. mutila</i>	—	—	2,8	—	—	—	—	9,1	3,0	1,2
<i>F. mediterranea</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	1,5	—
<i>P. aleophilum</i>	1,2	—	—	20,0	—	—	—	9,1	1,7	—
<i>P. chlamydospora</i>	0,9	—	6,6	—	1,5	16,7	4,1	9,1	2,5	—
<i>S. Ionicerae</i> <i>S. lichenicola</i>	—	16,7	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>P. guepinii</i>	1,2	33,3	0,8	—	0,5	—	0,6	—	—	—

\* Micoflora isolata (%) nel dicembre 2006 dai monconi di branche della cv. Italia a 2 cm di distanza dalla superficie di taglio di piante naturalmente infette o apparentemente sane le cui ferite nel mese di gennaio 2006 erano state non protette o protette con i mastici: Pik, Bayleton, Asfaltol e Cera. M = piante malate; S = piante apparentemente sane.

stati isolati funghi e che la composizione della micoflora isolata non è significativamente variata, mentre sono variate le percentuali di isolamento probabilmente anche in funzione dell'andamento climatico di ciascun anno. In particolare, la micoflora isolata dai tagli di potatura non protetti con mastici è risultata spesso percentualmente più alta di quella isolata dai tagli protetti.

## VII.4 Effetti di trattamenti antiperonosporici con fosetyl Al sul mal dell'esca

Stefano Di Marco

### VII.4.1 Introduzione

Formulati a base di fosetyl Al in miscela con altri principi attivi sono da tempo utilizzati per la difesa della vite da infezioni di peronospora. L'alcoilfosfonato possiede un meccanismo d'azione multiplo che stimola la formazione di sostanze di difesa della pianta (fitoalessine) e, in seguito a una trasformazione del principio attivo all'interno della pianta in acido fosforoso e acido fosforico, agisce direttamente nei confronti del patogeno (Fenn e Coffey, 1984; Sukarno *et al.*, 1998). Ricerche condotte in laboratorio nei primi anni duemila evidenziarono un'attività fungicida di resveratrolo e pterostilbene in combinazione con acido fosforoso nei confronti di *Phaeoacremonium aleophilum* (*Pal*) e *Phaeoconiella chlamydospora* (*Pch*) e una tendenziale riduzione dell'incidenza annuale di mal dell'esca in vigneti trattati con fosetyl Al (Di Marco *et al.*, 1999; 2000; Mazzullo *et al.*, 2000).

Questi dati hanno stimolato la realizzazione di ricerche volte a verificare eventuali effetti sul mal dell'esca di applicazioni di fosetyl Al nell'ambito di normali programmi di difesa antiperonosporica.

### VII.4.2 Materiali e metodi

Le prove sono state realizzate in diversi vigneti dell'Emilia Romagna, già oggetto di monitoraggio per l'esca e sui quali in anni precedenti era stata avviata l'indagine sull'effetto dei trattamenti con fosetyl Al sulla malattia. Sono stati effettuati 4 trattamenti a stagione (3 nell'ultimo biennio) a distanza di 10-14 giorni, posizionati tra allegagione e pre-chiusura grappolo.

Si è operato con formulati commerciali a base di fosetyl Al in miscela con cimoxanil e mancozeb o con ossicloruro di rame (Aliette Bordeaux, Rhône-Poulenc Agro; R6Erresei Bordeaux, Bayer) a 300 g/hl di formulato commerciale distribuito mediante atomizzatore aziendale.

Sono stati condotti rilievi periodici durante la stagione vegetativa e un rilievo finale, nel momento di massima espressione sintomatologica della malattia, tra l'ultima decade d'agosto e i primi giorni di settembre.

Sono state effettuate prove su piante di vite cv. Montuni e cv. Albana, allevate in vaso all'aperto, trattate con fosetyl Al (Aliette 80 WG<sup>®</sup>, Aventis) per via fogliare, radicale o con iniezioni al fusticino mediante particolari siringhe appositamente utilizzate. Le piante sono state inoculate al tronco con cilindretti d'agar-micelio di *Pch*, proteggendo successivamente la ferita

\* CNR - IBIMET, Bologna email: s.dimarco@ibimet.cnr.it

Tab. 3 - Micoflora isolata (%) dai monconi di branche della cv. Italia (dicembre 2007)\*

Specie fungine isolate	Tagli di potatura protetti con:								Tagli di potatura non protetti	
	Pik		Bayleton		Asfaltol		Cera		M	S
	M	S	M	S	M	S	M	S		
<i>B. dothidea</i>	9,2	4,0	24,1	8,4	16,6	11,1	12,76	18,8	19,1	10,9
<i>N. parvum</i>	6,9	—	22,0	6,6	14,2	10,7	8,5	—	15,7	16,4
<i>D. seriata</i>	6,6	3,1	7,8	4,8	10,4	—	2,6	—	10,3	—
<i>D. mutila</i>	1,8	—	7,5	—	2,6	—	—	8,6	1,6	—
<i>F. mediterranea</i>	—	—	—	—	0,9	—	3,4	—	3,3	—
<i>P. aleophilum</i>	1,8	2,2	—	5,6	—	11,1	1,4	10,1	—	15,2
<i>P. chlamydospora</i>	1,8	4,4	—	4,8	—	—	1,7	11,4	2,0	2,3
<i>S. lonicerae</i> <i>S. lichenicola</i>	1,8	—	1,2	—	1,9	—	2,7	—	3,9	—
<i>P. guepinii</i>	2,3	—	13,7	—	—	—	1,4	—	1,1	—

\* Micoflora isolata (%) nel dicembre 2007 dai monconi di branche della cv. Italia a 2 cm di distanza dalla superficie di taglio di piante naturalmente infette o apparentemente sane le cui ferite nel mese di gennaio 2007 erano state non protette o protette con i mastici: Pik, Bayleton, Asfaltol e Cera. M = piante malate; S = piante apparentemente sane.

I mastici utilizzati nella protezione dei tagli di potatura delle piante apparentemente sane non sono dunque risultati, negli anni, particolarmente efficaci, in quanto probabilmente le piante erano già infette (in effetti, a causa della fluttuazione nella manifestazione dei sintomi esterni, non è possibile individuare con certezza piante sicuramente sane se non con l'esame distruttivo delle stesse). Pertanto, in tali situazioni (piante già infette o comunque ospitanti nel legno una ricca microflora endofita) e in annate particolarmente umide, i mastici potrebbero fungere addirittura da camera umida e favorire così lo sviluppo di corpi fruttiferi dei funghi dell'esca o di altri funghi patogeni per la vite.

In conclusione, l'utilizzo di mastici per proteggere le ferite effettuate su legno di due o più anni appare proficuo solo se si provvede all'applicazione fin dall'inizio, su viti molto giovani e ancora sane. Al contrario, su viti adulte e infette può essere controproducente, considerando che può favorire la formazione dei corpi fruttiferi su legno infetto. Protezioni tali da persistere per molti mesi potrebbero forse essere ottenute con l'utilizzo di mezzi biologici, e in particolare di microrganismi antagonisti in grado di colonizzare attivamente la superficie di taglio.

con parafilm (Di Marco *et al.*, 2000). I trattamenti fogliari sono stati eseguiti per 2 stagioni consecutive, avendo cura di seguire lo schema dei trattamenti di campo. Le prove sono la prosecuzione di lavori iniziati alla fine degli anni novanta, nell'ambito dei quali si effettuarono 5-6 trattamenti e inoculazioni di *Pal* o *Pch*.

L'attività è stata concepita al fine di verificare un'eventuale azione di fosetyl AI nei confronti dei funghi tracheomicotici dell'esca (*Pch* in particolare) o dei loro effetti sulla pianta.

**VII.4.3 Risultati**

I risultati hanno evidenziato un certo contenimento della percentuale di piante che manifestavano sintomi fogliari di esca in determinate condizioni di coltivazione del vigneto e, con maggiore evidenza, in certe annate, e una riduzione a volte significativa della necrosi da *Pch* inoculato su viti in vaso. In particolare, è stato riscontrato quanto segue.

**Effetto dei trattamenti in vigneto di prodotti a base di fosetyl AI sulla manifestazione sintomatologica di esca**

I dati rilevati in campo negli appezzamenti sottoposti a indagine pluriennale hanno evidenziato un certo decremento della percentuale di piante che manifestavano sintomi di mal

Tab. 1 - Attività di applicazioni fogliari di fosetyl AI nei confronti di <i>Pal</i> e <i>Pch</i> *		
Tesi	Lunghezza media della necrosi (mm)	
	fosetyl AI	Testimone non trattato
<i>Phaeoacremonium aleophilum</i> ( <i>Pal</i> )	22	49
<i>Phaeomoniella chlamydospora</i> ( <i>Pch</i> )	30	48
Agar sterile	—	19

\* Fonte: Di Marco *et al.*, 2000.

dell'esca. Tale riduzione, il cui andamento relativo a un impianto monitorato per anni è visibile nella *fig. 1* ha riguardato sia l'incidenza annuale sia l'incidenza cumulata, non è stata riscontrata in tutti gli impianti in prova.

I dati rilevati nel vigneto cv. Albana riportato in *fig. 1* nei successivi anni di prova hanno confermato una tendenza al contenimento dell'espressione della malattia nella parcella trattata, attraverso una minor percentuale di piante con manifestazione di sintomi fogliari.

**Effetto dei trattamenti su piante in vaso di prodotti a base di fosetyl AI su *Pal* e *Pch***

A conferma dei dati preliminari a suo tempo ottenuti e riportati nella *tab. 1*, le diverse verifiche condotte nel corso del triennio di prove su piante in vaso trattate e inoculate con *Pch* hanno ribadito la capacità di fosetyl AI di contenere l'estensione della necrosi originata dall'infezione.

Il trattamento non ha tuttavia consentito l'inibizione della crescita dei patogeni, che si sono dimostrati vitali a seguito dei re-isolamenti effettuati su substrato artificiale nei confronti del tessuto legnoso necrotico.

**VII.4.4 Considerazioni conclusive**

Il giudizio sull'attività, nei confronti del mal dell'esca, di trattamenti con formulati a base di fosetyl AI utilizzati come antiperonosporici è basato su diversi studi realizzati in ambiente controllato e in vigneti soggetti a monitoraggi di 5-9 anni.

I dati ottenuti ci consentono di affermare quanto segue:

- i trattamenti hanno evidenziato una certa riduzione della manifestazione della malattia in vigneto a livello d'incidenza annuale e cumulata. Tale riduzione è apparsa in alcuni anni significativa, in altri appena tendenziale;
- l'esito favorevole dell'intervento appare subordinato a una conduzione corretta ed equilibrata degli impianti, caratterizzati da condizioni fitosanitarie soddisfacenti. Un aspetto particolarmente rilevante emerso durante le osservazioni di campo è la necessità di evitare ristagni idrici in occasioni di piogge intense o prolungate;
- non è stato mai possibile conseguire un'inibizione delle infezioni da *Pal* e *Pch* in piante trattate con fosetyl AI, se non in termini di sviluppo delle necrosi all'interno del tessuto legnoso di giovani piante trattate. Tuttavia, approfondimenti riguardanti la capacità dei trattamenti di limitare l'estensione della necrosi, stanno mettendo in evidenza possibili

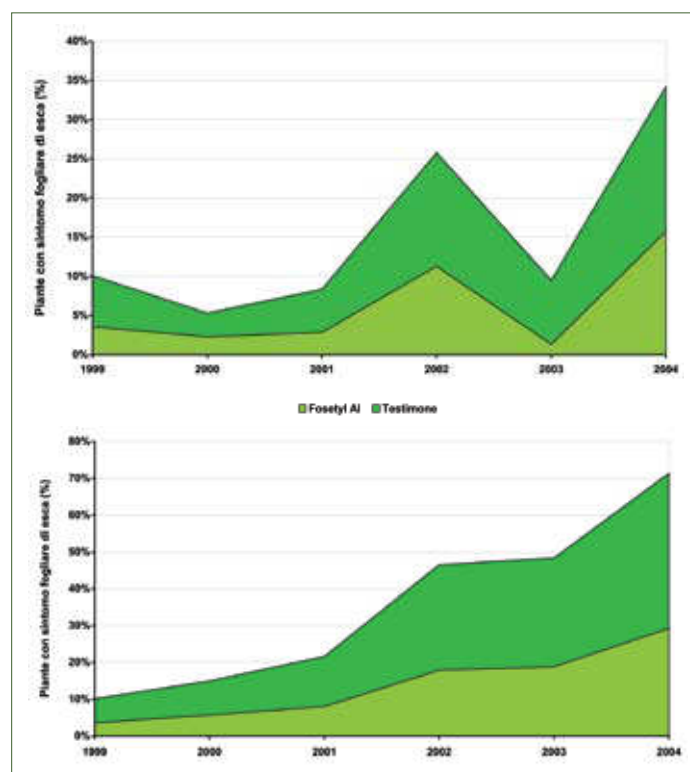


Fig. 1 - Percentuale di piante sintomatiche rilevata, per ogni anno di prova, in un impianto della cv. Albana della collina romagnola ed espressa come incidenza annuale (sopra) e cumulata (sotto). Fonte: Di Marco e Osti, 2005b.

interpretazioni sull'attività del fosetyl Al sia in termini di rapporto con la fisiologia della pianta, sia d'interazione con i patogeni.

In conclusione, l'utilizzo dei formulati a base di fosetyl Al non può essere considerata una forma di protezione dal mal dell'esca, ma un ausilio al contenimento degli effetti della malattia in vigneto, più efficace e costante negli anni operando tempestivamente, prima o immediatamente dopo la prima comparsa della malattia e nell'ambito di impianti condotti in maniera equilibrata.

Ricerche in corso di ultimazione indicano che l'attività di fosetyl Al nei confronti della manifestazione dell'esca e/o dei funghi a essa associati è il frutto di una serie di interazioni tra il prodotto e i suoi metaboliti, la fisiologia della pianta, i patogeni e l'ambiente, dal cui esito dipende il livello di efficacia dell'intervento.

## VII.5 Effetti di trattamenti con biostimolanti sul mal dell'esca

*Stefano Di Marco*

### VII.5.1 Introduzione

In vigneto, i danni alla produzione provocati dal mal dell'esca sono visibili attraverso una perdita diretta dei grappoli e, ove sia possibile raccogliere, un'eventuale alterazione di parametri che incidono sulla qualità del prodotto. È stato recentemente dimostrato che il danno alla produzione è correlato alla manifestazione sintomatologica della malattia sulla pianta (Calzarano *et al.*, 2001; 2004a; 2006) sebbene non esista una correlazione tra stato d'avanzamento dell'infezione e sintomo fogliare (Calzarano *et al.*, 2007), la cui manifestazione dipende, oltre che dall'azione patogenetica dei funghi, da fattori climatici e da altri parametri non ancora ben definiti (Marchi *et al.*, 2005; Surico *et al.*, 2006).

Risulta perciò fondamentale lo sviluppo di interventi volti a contenere la manifestazione della malattia, per ridurre il danno alla produzione.

I biostimolanti sono prodotti che interagiscono con meccanismi fisiologici della pianta e in grado di consentire un più efficace assorbimento dei nutrienti, un incremento e miglioramento della crescita e una superiore resistenza agli stress (Fregoni M. e Fregoni C., 2005).

Sono state quindi approntate prove atte a valutare una possibile attività di biostimolanti nei confronti del mal dell'esca in vigneti in cui la malattia è già da anni manifesta ed è presente nella forma d'esca propria, con legno affetto da tracheomicosi più carie, in condizioni in cui normalmente non è possibile effettuare con successo alcun tipo d'intervento di contenimento, eccezion fatta per massicce e onerose operazioni di risanamento per capitozzatura.

### VII.5.2 Realizzazione delle prove

Il lavoro è stato condotto in diversi vigneti dell'Emilia Romagna, ubicati prevalentemente nella zona tipica "Colli Bolognesi". Si è operato su oltre 2000 viti allevate in impianti di diversa età (superiore a 13-14 anni) delle cultivar Pignoletto, Albana, Montuni, Cabernet Sauvignon e Sangiovese, in cui l'esca si era già manifestata.

Sono stati eseguiti controlli periodici verificando possibili effetti collaterali dei trattamenti sulla comparsa e sullo sviluppo della malattia e un rilievo finale nel momento della massima espressione sintomatologica. Campioni d'uva sono stati inoltre raccolti al fine di valutare eventuali modifiche di parametri di maturazione, quali acidi e zuccheri o eventuali indicatori di stress.

\* CNR - IBIMET, Bologna email: s.dimarco@ibimet.cnr.it



Tab. 1 - Dettagli dei trattamenti effettuati in vigneto con biostimolanti				
Società fornitrice	Prodotto commerciale	Principali componenti	Numero trattamenti ed epoca d'intervento	Dose formulato
Valagro	Kendal	Glutazione, oligosaccarine, estratti vegetali, potassio	4 (ogni 10-14 giorni, da pre-fioritura a chiusura grappolo)	30 ml/hl
Agrometodos	Brotomax	Azoto, rame, manganese, zinco	4 (germogli 25 cm, 20 giorni dopo, pre-chiusura grappolo, al bruno 10-15 giorni dopo la vendemmia)	1 l/hl
Agroqualità	Marvita	Estratto di <i>Ascophyllum nodosum</i>	5 (ogni 14 giorni, da pre-fioritura a chiusura grappolo)	300 g/ha
Scam	Fitostim	Aminoacidi, peptidi, peptoni	4 (ogni 14 giorni, da pre-fioritura a chiusura grappolo)	150 ml/hl
Italpollina	Trym	Enzimi solubili, aminoacidi, vitamine, acido borico, sale di manganese, sale di zinco	4 (ogni 15 giorni, da pre-fioritura a chiusura grappolo)	600 g/ha
Tricoderma	Agribioprop	Solfati di rame, di ferro e di manganese, composti naturali (propoli, equiseto...)	4 (ogni 15 giorni, da pre-fioritura a chiusura grappolo)	150 ml/hl

Sono stati saggiati diversi prodotti, modalità ed epoche di trattamento. I dettagli sono riportati in *tab. 1*.

Analogamente a quanto previsto per tutte le altre prove di campo, ulteriori verifiche sono state realizzate su viti allevate in vaso all'aperto, trattate con i biostimolanti utilizzati in vigneto e inoculate al tronco con cilindretti di agar-micelio di *Phaeoconiella chlamydospora* (*Pch*).

Le piante sono state trattate per due stagioni consecutive secondo lo schema adottato in vigneto, eseguendo controlli periodici e un rilievo finale al fine di valutare effetti dei prodotti sull'infezione al legno.

### VII.5.3 Risultati

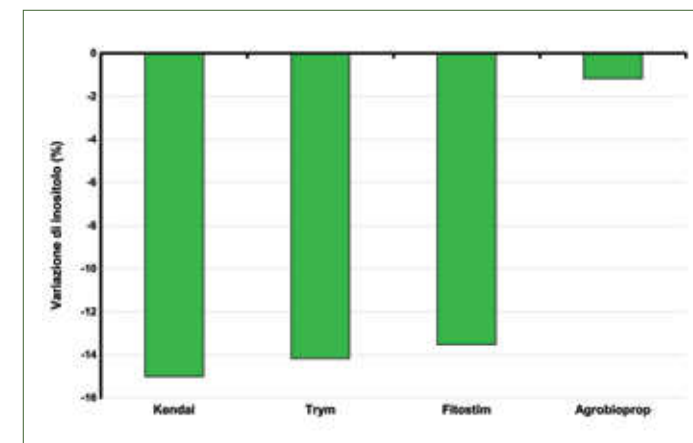
I risultati conseguiti nel triennio di prove in parte costituiscono la prosecuzione di studi avviati negli anni immediatamente precedenti il progetto.

Analizzando complessivamente i risultati ottenuti, i prodotti, di norma, non hanno mostrato effetti positivi sulla manifestazione dei sintomi fogliari di esca che, in diversi casi, è porsa aumentare. A ciò fa eccezione il dato riguardante le applicazioni con Marvita® che sono sembrate in grado di esercitare una tendenziale riduzione della percentuale di piante sintomatiche.

La percentuale di piante morte è porsa diminuire in pressoché tutte le tesi trattate con biostimolanti, soprattutto nei primi anni di rilievo. Tuttavia, la bassa percentuale di mortalità rilevata nei vigneti al termine delle prove non ha consentito di elaborare una corretta valutazione dell'effetto dei trattamenti su tale parametro (Di Marco e Osti, 2009).

Le analisi su campioni di uva relative alla determinazione degli acidi organici e degli

Fig. 1 - Percentuale di variazione dei valori d'inositolo rilevati nell'acino di grappoli provenienti da parcelle trattate con biostimolanti, rispetto a quanto rilevato sul testimone  
Fonte: Di Marco e Osti, 2005c



zuccheri riducenti non ha consentito di determinare un effetto univoco dei trattamenti effettuati con i diversi biostimolanti. Le analisi hanno invece consentito di rilevare con una certa continuità una riduzione del contenuto d'inositolo nell'acino proveniente da grappoli maturati in impianti trattati con i diversi biostimolanti, soprattutto nei primi anni di trattamento (*fig. 1*).

Le prove su piante in vaso hanno permesso di evidenziare una certa riduzione di sviluppo della necrosi causata dalle infezioni di *Pch* nelle piante trattate. In particolare, questa riduzione è apparsa più marcata nelle tesi trattate con Marvita® e Brotomax®. Le viti allevate in vaso e trattate con Brotomax® hanno mostrato un maggior sviluppo della vegetazione, una più intensa colorazione delle foglie e una maggiore capacità fotosintetica, rilevata attraverso analizzatore di gas Li-Cor (*fig. 2*).

Una tendenziale miglior attività fotosintetica rispetto al testimone è stata rilevata anche su viti trattate con gli altri biostimolanti.

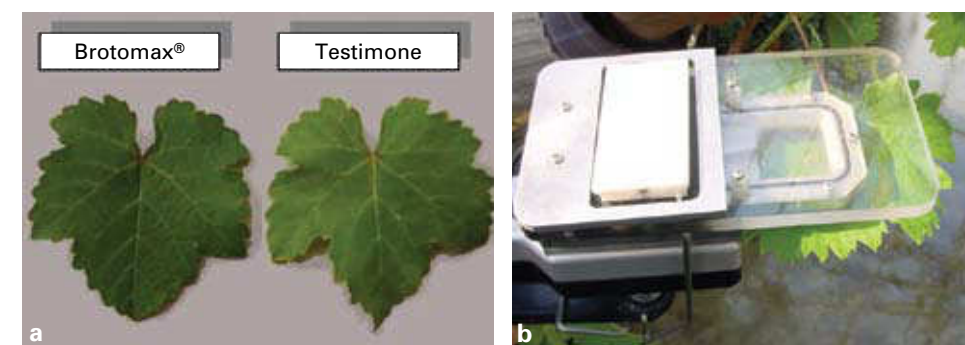


Fig. 2 - Viti allevate in vaso, inoculate con *Pch* e trattate con biostimolanti. Le foglie delle piante trattate con Brotomax® apparivano più verdi di quelle non trattate (a). Misurazione dell'attività fotosintetica sulle foglie delle piante in vaso (b)

#### VII.5.4 Considerazioni conclusive

Le ricerche poliennali su un possibile utilizzo di biostimolanti nella lotta al mal dell'esca ci hanno permesso di evidenziare quanto segue.

I trattamenti realizzati in campo su impianti di oltre 13-14 anni interessati da esca non hanno evidenziato riduzioni della manifestazione della malattia in termini sia d'incidenza annuale o cumulata, sia di gravità dell'espressione della malattia sulla pianta. In diversi casi si è registrato un incremento di sintomi di esca. Questo comportamento è stato rilevato per Brotomax® anche in Francia, in prove condotte nella regione dello Champagne (Michel Boulay, comunicazione personale).

In controtendenza rispetto a tutti i biostimolanti saggati, i trattamenti con il formulato a base di alghe (Marvita®) hanno mostrato una propensione al contenimento dei sintomi. La ricerca è stata però condotta in un solo vigneto, rendendo in tal modo necessarie ulteriori sperimentazioni.

I risultati conseguiti non consentono perciò di valutare positivamente un inserimento dei prodotti biostimolanti saggati in strategie di contenimento della malattia nei vigneti che ne manifestano i sintomi. Questi risultati sono in linea con ricerche parallelamente condotte in Australia (Edwards e Pascoe, 2005).

Tuttavia, la riduzione di sviluppo della necrosi da *Pcb* rilevata in buona parte delle viti in vaso trattate con i biostimolanti, potrebbe far ipotizzare una minor sensibilità della pianta all'aggressione del tessuto legnoso, in linea con quanto riportato riguardo la capacità dei biostimolanti di favorire la produzione di sostanze di difesa dai patogeni (Vercesi *et al.*, 2005). Tale ipotesi potrebbe essere suffragata dalla riduzione d'inositolo registrata sugli acini dei grappoli provenienti dalle piante con sintomi di esca trattate con i biostimolanti, condizione verosimilmente associata a una riduzione delle condizioni di stress, proprietà attribuita ai biostimolanti (Filippini e Bonfiglioli, 2005). Sembra dunque intervenire un miglioramento della pianta a seguito del trattamento sullo stato di stress da infezione.

In conclusione, se l'utilizzo di biostimolanti in vigneti con piante affette da esca con sintomo evidente non ha fornito risultati incoraggianti, i dati ottenuti non escludono una possibile evoluzione delle ricerche limitatamente a impianti giovani, possibilmente esenti dalla malattia o almeno non ancora interessati da manifestazioni sintomatologiche, allo scopo di approfondire eventuali effetti associati a una maggiore resistenza della pianta alle infezioni (Di Marco e Osti, 2009).

## VII.6 Effetto di trattamenti nutrizionali sulla comparsa dei sintomi fogliari e su caratteristiche compositive della produzione in vigneti affetti da esca propria

*F. Calzarano\*, C. Amalfitano, L. Seghetti, V. D'Agostino*

### VII.6.1 Introduzione

In considerazione della carenza di interventi di difesa attuabili nei vigneti colpiti dalla malattia e della conseguente necessità per i viticoltori di convivere con la malattia in atto, e dopo aver attestato la sostanziale assenza di decrementi quanti-qualitativi nella produzione delle viti malate ma asintomatiche (Calzarano *et al.*, 2001; 2004b), si è proceduto alla verifica degli effetti di trattamenti con bioattivatori e concimi, somministrati per asperzione fogliare, sulla manifestazione dei sintomi fogliari in vigneti affetti da esca propria. Un ulteriore obiettivo è stato quello di valutare eventuali effetti di miglioramento qualitativo e variazioni nella composizione degli acini privi di lesioni delle viti malate sintomatiche trattate, rispetto ai medesimi acini di viti malate non trattate e di viti sane, tramite valutazione dei livelli presenti nelle uve dei principali parametri che determinano la qualità del prodotto e di alcuni macro- e microelementi.

### VII.6.2 Materiali e metodi

Lo studio ha riguardato due vigneti, entrambi allevati da 32 anni e situati in Abruzzo, nella provincia di Teramo, nelle zone vitate di Controguerra e Giulianova. I due vigneti, allevati con la cv. Trebbiano d'Abruzzo, sono condotti con due diverse forme di allevamento: il vigneto di Controguerra secondo il sistema "Geneva Double Curtain" (GDC), e quello di Giulianova con la forma a "Tendone". Le indagini sono state condotte per un quadriennio, dal 2004 al 2007, e i risultati relativi ai primi due anni sono stati pubblicati in un lavoro (Calzarano *et al.*, 2007) nell'ambito del quale sono state distinte le piante effettivamente sane dalle malate asintomatiche dopo aver effettuato rilievi dei sintomi fogliari per 12 anni consecutivi, dal 1994 al 2005 (la distinzione dei due gruppi di piante citati può essere conseguita solo dopo un lungo periodo di rilievi consecutivi dei sintomi fogliari in ragione del fenomeno di "mascheramento" che permette a viti malate di apparire completamente sane esternamente anche per diversi anni consecutivi). In tale arco di tempo sono state registrate anche le viti morte in conseguenza della malattia. Tali valutazioni, proseguite anche nel 2006 e nel 2007, hanno permesso di calcolare l'incidenza e la gravità dei sintomi fogliari solo sulle viti effettivamente passibili di esprimere il sintomo fogliare, escludendo dal computo le frazioni di piante sane e di piante morte.

Il monitoraggio dei sintomi fogliari, effettuato ogni anno dal 2004 al 2007, a maturità di raccolta, dopo aver effettuato i trattamenti nel corso della stagione vegetativa, ha permesso

\* Università di Teramo email: fcalzarano@unite.it

di calcolare l'incidenza percentuale della manifestazione, nelle parcelle a confronto dei due vigneti, rapportando il numero di piante con sintomi visibili al totale delle piante malate presenti nelle parcelle.

La gravità di espressione in percento è stata calcolata, nelle parcelle a confronto dei due vigneti, ricorrendo all'indice  $\Sigma N \times 100 / (Y \times Z)$  dove  $\Sigma N$  = sommatoria dei valori di intensità di sintomo per pianta;  $Y$  = numero piante osservate (piante malate sintomatiche e asintomatiche);  $Z$  = valore massimo della scala di espressione dei sintomi (McKinney, 1923). Le piante manifestanti i sintomi fogliari sono state classificate secondo uno schema riportato in Calzarano *et al.* (2007) che tiene conto di una scala relativa suddivisa in classi che esprimono l'estensione dei sintomi sull'apparato epigeo.

I trattamenti, a base di concimi fogliari e bioattivatori, sono stati effettuati nelle stagioni 2004 e 2005, in ognuno dei due vigneti oggetto di studio, utilizzando due parcelle (trattato e testimone) ognuna composta da uno stesso numero di piante, 309 nel vigneto di Controguerra e 584 nel vigneto di Giulianova, disposte su 8 filari in entrambi gli impianti.

I trattamenti sono stati eseguiti con irroratrice ad aeroconvezione tarata per l'erogazione di un volume di 500 l/ha. Il calendario degli interventi effettuati nel 2004 e nel 2005, articolato per buona parte della stagione vegetativa nel corso di diverse fasi fenologiche, i diversi formulati di micro e macroelementi e di bioattivatori e le formulazioni dei prodotti utilizzati sono stati descritti in Calzarano *et al.* (2007). Nel 2006 i trattamenti sono stati ripetuti secondo lo schema sperimentale utilizzato nei primi due anni e con i medesimi prodotti; nel 2007, le applicazioni fertilizzanti sono state effettuate solo nel mese di luglio e in numero inferiore. Nel vigneto di Giulianova la suddivisione delle parcelle era la medesima degli anni precedenti (2 parcelle da 584 piante sia nel trattato che nel testimone) mentre in quello di Controguerra i trattamenti fertilizzanti sono stati diversificati in due diverse parcelle, ognuna da 215 piante e 5 filari, a confronto con una parcella di controllo identica come numero di viti e filari (*tab. 1*).

Le valutazioni sulle caratteristiche della produzione sono state realizzate nel vigneto di Controguerra nelle stagioni 2004, 2005 e 2006 dove è stato effettuato un campionamento di acini nelle parcelle trattate e in quella non trattata; in ogni parcella sono state prelevate uve prive di lesioni dalle parti di viti malate sintomatiche prive anche di sintomi fogliari. Inoltre, nella parcella non trattata il prelievo degli acini è stato esteso anche a viti sane. Per ogni tipologia di vite (sintomatiche trattate, sintomatiche non trattate e sane) le uve sono state prelevate da 3 gruppi di 6 viti. Da ognuna delle 6 viti di ogni gruppo sono stati prelevati 1 kg di acini, alla ma-

turità di raccolta, dalle ali, punte e porzione centrale dei grappoli privi di sintomi. Complessivamente sono stati generati 3 campioni per ogni tipologia di vite e ogni campione era costituito da 6 kg di prodotto. Ogni campione è stato prima pestato in mortaio e una frazione omogenea, pari a 1 kg, prelevata dal campione fluido ottenuto, tenuto in agitazione, è stata destinata alla determinazione dei macro- e microelementi. La frazione rimanente, sulla quale sono state eseguite le altre analisi chimiche, è stata sottoposta a torchiatura manuale ottenendo la separazione del mosto da bucce e vinaccioli. La metodologia utilizzata per la determinazione degli zuccheri riduttori, acidità totale, frazioni acidiche e pH nonché quella relativa alla quantificazione dei macro- e microelementi sono le medesime descritte nel capitolo *Effetti dell'esca propria sulla qualità di mosti e vini* (<sup>es</sup> capitolo VI.1) e *Stato nutrizionale di viti affette da esca propria* (<sup>es</sup> capitolo VI.2), riportate anche in Calzarano *et al.* (2007).

I risultati delle analisi chimiche dei diversi parametri valutati negli acini privi di lesioni delle viti sintomatiche trattate e non trattate e delle viti sane del vigneto di Controguerra sono stati verificati statisticamente tramite analisi della varianza e test di Duncan ( $P = 0,05$ ).

### VII.6.3 Risultati e discussione

L'incidenza e l'intensità di espressione dei sintomi fogliari sono risultate quasi sempre superiori, nei due vigneti e nei diversi anni di osservazione, nelle parcelle trattate con bioattivatori e nutrienti (*figg. 1a-1b*). L'unica eccezione ha riguardato il valore dell'incidenza nel vigneto di Controguerra nel 2005, risultato simile nelle due parcelle a confronto; tuttavia, in tale caso l'effettuazione dei trattamenti ha influenzato l'intensità di espressione, superiore nella parcella trattata, 19,29%, in confronto con quella della parcella di controllo, 15,42%. Anche nel 2007, quando i trattamenti sono stati limitati al mese di luglio e diversificati in due distinte parcelle con due singoli formulati l'effetto di incremento dei sintomi delle aspersioni fogliari è apparso evidente, in particolare quando queste venivano effettuate con il prodotto a base di microelementi (*fig. 1b*).

I risultati ottenuti potrebbero essere correlati alla capacità dei prodotti somministrati di stimolare i processi fisiologici delle piante, come fotosintesi, respirazione, conduttanza stomatica, con conseguente maggiore veicolazione di tossine (Abou-Mansour *et al.*, 2004), ipotizzate come responsabili delle manifestazioni fogliari (Evidente *et al.*, 2000; Tabacchi *et al.*, 2000), dai siti di produzione, nel legno infetto, all'apparato fogliare. Inoltre, la somministrazione dei concimi fogliari potrebbe aver determinato nelle piante trattate un regime di sovranutrizione cui è conseguita la superiore presenza delle manifestazioni fogliari rispetto alle piante malate non trattate, dato lo stato nutrizionale generalmente buono, accertato tramite diagnostica fogliare, nelle piante, sia sane che affette da esca, di entrambi i vigneti in esame (Calzarano *et al.*, 2009). Gli eccessi nutrizionali provocati dalle concimazioni fogliari, alterando nelle piante malate le condizioni di equilibrio tra le concentrazioni dei diversi elementi, potrebbero aver influenzato i meccanismi, tuttora sconosciuti, che rendono le viti affette da esca in grado di attenuare o mascherare l'espressione dei sintomi fogliari, meccanismi che potrebbero essere correlati con la capacità di espressione della risposta agli stress.

Una risposta di difesa in atto nelle viti sintomatiche sembra segnalata dai superiori e significativi livelli di azoto riscontrati negli acini esaminati di tali piante, rispetto agli acini di piante sane (*fig. 2*), dato l'accumulo di proteine di risposta, come la prolina, che si verifica

**Tab. 1 - Trattamenti fogliari nel 2007**

Fase fenologica	Data del trattamento	Fertilizzanti			Dose
		Controguerra (parc. 1)	Controguerra (parc. 2)	Giulianova	
Acini "chicco di pepe"	3 luglio	23-11-11	Umati di microelementi	23-11-11	1,5 kg/ha
Acini "pisello"	17 luglio	23-11-11	Umati di microelementi	23-11-11	1,5 kg/ha
Pre-chiusura grappolo	31 luglio	23-11-11	Umati di microelementi	23-11-11	1,5 kg/ha

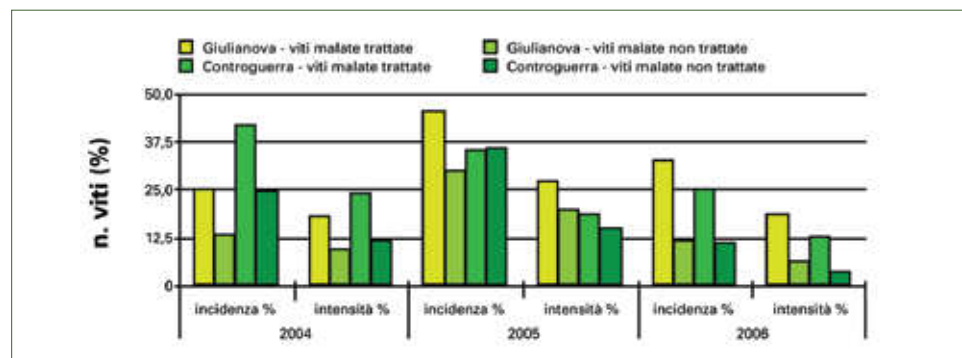


Fig. 1a - Incidenza e intensità di sintomi fogliari in parcelle di viti affette da esca propria trattate e non trattate con nutrienti fogliari

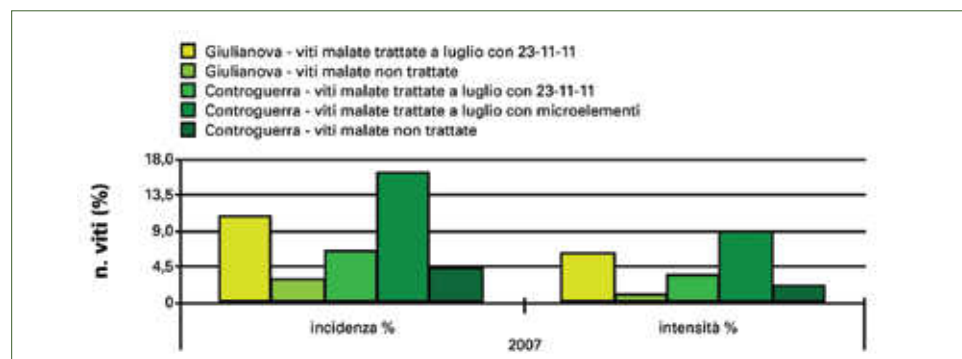


Fig. 1b - Incidenza e intensità di sintomi fogliari in parcelle di viti affette da esca propria trattate e non trattate con nutrienti fogliari

in presenza di stress di varia origine (Xioung e Zhu, 2002). Infatti, i maggiori contenuti dell'elemento nelle bacche di viti malate non sembrano dovuti alla presenza delle clorosi fogliari e alla eventuale traslocazione di azoto verso gli acini, dati i livelli inferiori dell'elemento rinvenuti negli acini delle viti sintomatiche trattate, rispetto a quelli delle sintomatiche non trattate, nonostante la maggiore presenza di lesioni fogliari determinate dai trattamenti e a dispetto anche della quota del nutriente somministrata con tali aspersioni fogliari. Tali risultati sembrano suggerire l'ipotesi che la concentrazione di azoto negli acini delle piante malate sia da mettere in relazione con un meccanismo di accumulo fisiologico, nell'ambito della risposta di difesa della pianta, che risulterebbe invece meno efficiente nelle viti sottoposte a sovranutrizione e/o a squilibri nutrizionali a causa dei trattamenti.

Similmente a quanto osservato per l'azoto anche i contenuti dei microelementi ferro e manganese sono risultati più elevati negli acini di viti malate non trattate, rispetto agli acini di viti sane (fig. 2), avallando l'ipotesi di una risposta di difesa in essere nelle viti colpite, dato il ruolo di tali elementi come cofattori di enzimi di risposta per la regolazione dello stress ossidativo e nella sintesi di fitoalessine fenoliche (Marschner, 1998). Tuttavia, la propensio-

ne a livelli maggiori è apparsa più evidente per il ferro, dati i valori superiori in maniera significativa nel 2005 e nel 2006 e tendenziale nel 2004, e meno per il manganese, considerati i contenuti superiori nel 2004 e nel 2006, ma con differenze significative rispetto alle viti sane solo nel 2004, e simili tra i due gruppi nel 2005.

I livelli di tali microelementi sono risultati inferiori negli acini delle viti sintomatiche trattate, rispetto agli acini delle sintomatiche non trattate, forse in dipendenza, come ipotizzato precedentemente nel caso dell'azoto, di una ridotta capacità di risposta determinata dall'effettuazione dei trattamenti nutrizionali. Anche in questo caso, la differenza tra i livelli delle viti malate trattate e non trattate era più delineata per il ferro, significativa in ognuno dei tre anni valutati, mentre il contenuto di manganese negli acini delle viti sintomatiche trattate era significativamente inferiore nei primi due anni e significativamente superiore nel 2006; evidentemente i contenuti di tale elemento risentono maggiormente dell'influenza di altri fattori, al momento non meglio identificati, rispetto a quelli determinati dall'innescamento della reazione di difesa o dalla effettuazione dei trattamenti.

I decrementi di microelementi nelle uve delle viti malate trattate rispetto alle malate non trattate, sono risultati comunque più evidenti nel 2005 rispetto a quanto rilevato nel 2004 e nel 2006; contemporaneamente non è stata osservata in tale anno una superiore incidenza dei sintomi fogliari nella parcella trattata, ma solo un incremento dell'intensità di espressione, meno evidente di quello riscontrato negli altri due anni. Questo suggerisce che la capacità di risposta delle viti malate non costituisce l'unico fattore coinvolto nell'espressione dei sintomi fogliari. La disponibilità di acqua e nutrienti in particolari fasi fenologiche della pianta potrebbero giocare un ruolo chiave nell'amplificare o ridurre lo stress biotico dato dalla presenza della malattia; quando tale tipo di stress risulta elevato per la concomitanza di diversi fattori, la risposta di difesa della pianta malata, pur presente, potrebbe rivelarsi insufficiente per innescare i meccanismi di contenimento dei sintomi fogliari.

I contenuti degli zuccheri riducenti negli acini privi di lesioni delle viti sintomatiche trattate non sono mai apparsi differenti rispetto a quelli rilevati nelle sintomatiche non trattate

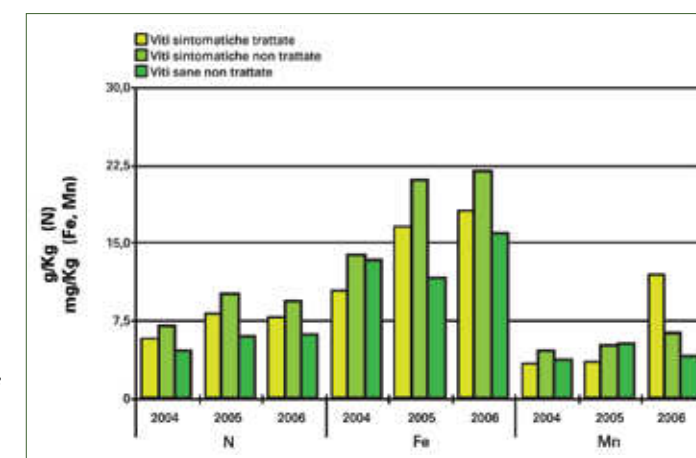


Fig. 2 - Livelli di azoto, ferro e manganese in acini privi di lesioni di viti sintomatiche trattate, di viti sintomatiche non trattate e di viti sane non trattate

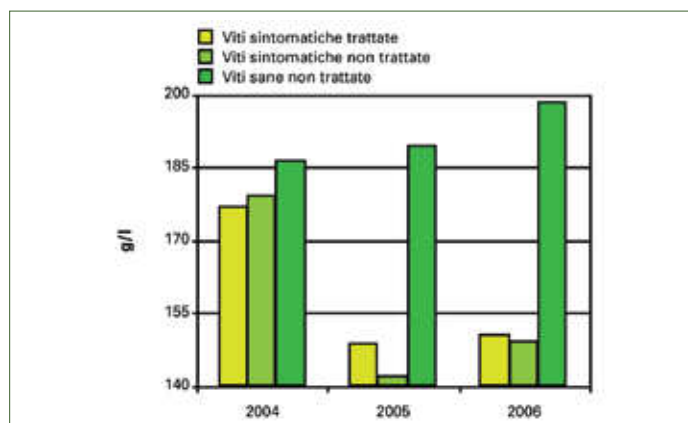


Fig. 3 - Contenuto di zuccheri riducenti nei mosti ottenuti da acini privi di lesioni di viti sintomatiche trattate, di viti sintomatiche non trattate e di viti sane non trattate

(fig. 3), mentre è stato registrato un livello inferiore di acidità totale, dovuto in particolare a decrementi di acido malico, negli acini delle viti del primo gruppo (fig. 4). Tale fenomeno che ha riguardato le stagioni con decorso climatico caratterizzato da minore piovosità, il 2005 e in particolare il 2006, potrebbe essere dovuto a un'efficacia dei prodotti somministrati, nell'accelerare i processi di lignificazione compresi quelli riguardanti i vinaccioli; quest'ultimi infatti se ancora allo stato erbaceo continuano a respirare zuccheri producendo acido malico. Nelle parcelle trattate e nella fase finale della stagione la difesa antiperonosporica è stata effettuata con trattamenti a base di umati di rame, caratterizzati da una presunta capacità di veicolazione dell'elemento all'interno della pianta contrariamente ai rameici tradizionali impiegati dall'azienda nelle parcelle non trattate, ed è nota l'azione del rame nel migliorare i processi di lignificazione.

I risultati ottenuti permetteranno l'avvio di studi più mirati per la comprensione dei meccanismi che permettono alla vite colpita da esca di contenere l'espressione dei sintomi fogliari e per eventuali miglioramenti della qualità della produzione nelle piante malate.

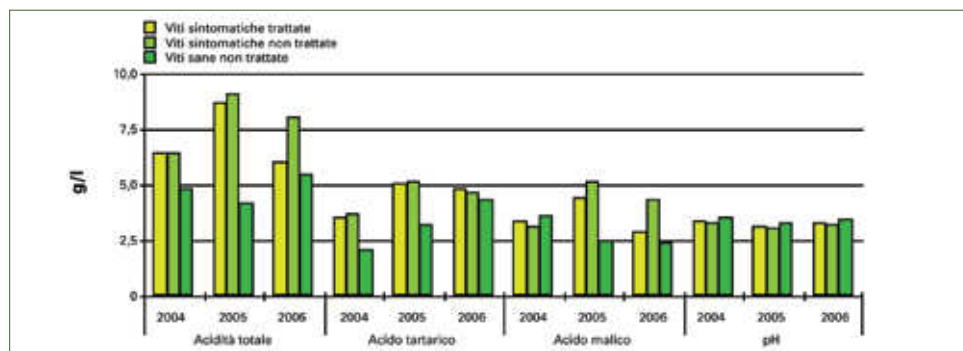


Fig. 4 - Acidità totale, frazioni acidiche e pH nei mosti ottenuti da acini privi di lesioni di viti sintomatiche trattate, di viti sintomatiche non trattate e di viti sane non trattate

## VII.7 Considerazioni generali e finali sulla lotta: indicazioni per vivaisti e viticoltori

S. Di Marco\*, L. Mugnai, G. Surico

### VII.7.1 Introduzione

I progressi compiuti negli ultimi anni sull'eziologia e sull'epidemiologia del complesso esca, pur se importanti, non hanno consentito di elaborare misure efficaci per la cura della malattia. D'altro canto, la natura stessa del complesso, una tracheomicosi e una carie del legno, è tale da fare apparire del tutto velleitario sperare di individuare un qualsiasi mezzo di lotta capace di risanare completamente una pianta ammalata. Potrebbe tutt'al più ritenersi possibile, nel caso di malattia in atto e con gli scopi di ridurre i danni nell'anno e di allungare l'aspettativa di vita commerciale del vigneto, escogitare una procedura di lotta capace di:

1. aumentare il numero di anni in cui la pianta rimane asintomatica (in questi anni la pianta vegeta e produce come se fosse sana);
2. ridurre la frequenza dei colpi apoplettici.

Il quadro degli interventi potrebbe completarsi con due altri obiettivi da raggiungere:

- a) avviare il vigneto con materiale sano;
- b) mantenere sana il più a lungo possibile la pianta in vigneto.

Per alcuni di questi punti è possibile oggi suggerire quanto meno delle norme comportamentali e anche talune indicazioni di lotta, di seguito elencate (si veda anche Surico *et al.*, 2008).

### VII.7.2 Interventi finalizzati alla riduzione dei patogeni associati al complesso esca

In termini strettamente epidemiologici, il complesso esca è difficilmente definibile: è da ritenersi una malattia monociclica (un solo ciclo della malattia nell'anno) allorquando si considera che la quantità di malattia in campo potrebbe dipendere, almeno inizialmente, dal numero di barbatelle già infette che si mettono in campo (è quindi importante la quantità di inoculo iniziale, cioè il numero di piante infette all'origine); è poi da considerarsi anche una malattia policiclica poiché c'è produzione di inoculo durante la stagione vegetativa e, quindi, possibilità di infezioni ripetute sulla pianta e fra piante. In questo contesto gli interventi di lotta dovrebbero mirare a:

\* CNR - IBIMET, Bologna email: s.dimarco@ibimet.cnr.it

1. ridurre la quantità di inoculo iniziale;
2. ridurre il tasso di infezione (cioè abbassare il numero di nuove piante che si ammalano);
3. ridurre la durata nel tempo della malattia.

#### *Riduzione della quantità di inoculo iniziale e nel vigneto*

In base all'esperienza maturata in ricerche condotte in diversi areali di coltura e finalizzate alla riduzione dell'inoculo presente in vigneto, si suggerisce quanto segue:

- asportare le piante morte e i residui di legno concresciuto con i fili, spesso presenti a seguito di importanti operazioni di risanamento o di rinnovo colturale. Il materiale rimosso dovrebbe essere bruciato;
- asportare tempestivamente le piante danneggiate dalla malattia e/o interessate da sintomi conclamati di esca tali da comprometterne la produzione in maniera significativa;
- asportare i residui della potatura. L'operazione, di per sé onerosa, assume rilievo in ragione della presenza di agenti di tracheomicosi nei o sui rami dell'anno, ma la convenienza di tale pratica sarà da valutare in funzione del contesto viticolo nel quale si opera;
- nei piani di difesa considerare fungicidi che abbiano effetto sui patogeni del complesso esca potenzialmente presenti nel vigneto;
- effettuare trattamenti invernali con prodotti a largo spettro (rameici) soprattutto se le operazioni di potatura si protraggono durante la stagione fredda;
- impiantare il vigneto con barbatelle sane o risanate.

#### *Pratiche per ridurre il rischio di infezioni*

I funghi associati al complesso esca sono in grado di infettare le piante in diversi momenti durante la stagione vegetativa, lungo l'intera vita della pianta: dal vivaio all'impianto del vigneto sino alla piena maturità e senescenza. Si rendono perciò necessarie una serie di misure che riducano i rischi d'infezione in vivaio e in campo.

#### *Vigneto*

- Collocare le operazioni di potatura nel giusto periodo. Un eventuale posticipo della potatura appare consigliabile in funzione della possibilità di avere un rapido processo di cicatrizzazione e, soprattutto, di ridurre percentualmente il tempo di esposizione delle ferite originate dall'intervento. D'altro canto, una potatura collocata durante "l'inverno secco" (periodo freddo e asciutto), da ritenersi poco favorevole alla cicatrizzazione delle ferite, porta con sé il vantaggio del fatto che in questo periodo la quantità di inoculo disponibile per le infezioni è molto scarsa (più basso rischio di infezione delle ferite). Le ferite comunque possono rimanere suscettibili alle infezioni anche per lungo tempo e quindi vanno adottate anche altre precauzioni;
- evitare, in qualunque periodo, di potare nei giorni immediatamente successivi a un evento piovoso, quando tutti i funghi dell'esca, inclusi gli agenti di carie, aumentano notevolmente la quantità di inoculo prodotto, e quindi il pericolo di nuove infezioni;
- individuare e contrassegnare le piante con sintomi di esca. L'operazione permette di conoscere più esattamente la situazione del vigneto in termini di incidenza della malattia e di potare separatamente piante certamente infette rispetto a piante apparentemente sane.

- Tale operazione va intesa come norma cautelativa di igiene generale, anche se è stato accertato che la malattia non si propaga lungo i filari attraverso gli attrezzi di potatura;
- adottare sistemi di allevamento che non richiedano la formazione di grossi tagli che favoriscono la penetrazione dei patogeni;
  - proteggere tempestivamente, entro poche ore dal taglio, le ferite di potatura o derivanti da spollonatura con mastici anche addizionati con fungicidi o applicando prodotti a base di sali di rame. La pratica è davvero efficace se applicata su piante giovani e sane che vengono così mantenute più 'pulite', e deve essere condotta con la massima cura al fine di evitare la formazione, al di sotto dell'eventuale mastice applicato, di un microambiente favorevole (per l'elevata umidità relativa che si creerebbe) allo sviluppo dei patogeni. Ove necessario ricorrere a un trattamento con atomizzatore preferibilmente con formulati a largo spettro d'azione;
  - trattare le piante, ad esempio con prodotti rameici, dopo eventi meteorici che possano indurre la formazione di ferite (gelate o grandinate);
  - evitare il ricorso alla raccolta meccanica;
  - effettuare la spollonatura in situazioni di sicurezza.

#### *Vivaio*

- Prelevare il materiale di propagazione da piante madri sane, nei confronti delle quali saranno state adottate tutte le misure previste per evitare il rischio d'infezione del complesso esca;
- disinfettare contenitori e vasche di idratazione dopo ogni periodo di idratazione con soluzioni sterilizzanti (es. ipoclorito di sodio) e risciacquare abbondantemente;
- provvedere a un ricambio frequente dell'acqua di idratazione;
- aggiungere all'acqua utilizzata per l'idratazione delle talee, prima della frigo-conservazione o dell'innesto, prodotti a base di fungicidi o biologici che abbiano effetto contro i patogeni del complesso esca;
- provvedere all'eradicazione dei patogeni dal materiale di propagazione. I migliori risultati sono stati ottenuti attraverso l'immersione delle barbatelle in riposo in acqua calda (50°C per 30 minuti). La tecnica è in via di perfezionamento, soprattutto per limitare i rischi di danneggiamento del materiale vegetale;
- l'utilizzo di un formulato biologico a base di *Trichoderma* prima del trapianto in campo di vivaio e dopo circa 2 mesi dal trapianto stesso, ha prodotto condizioni favorevoli nella pianta associate a una migliore capacità di contrastare la presenza e gli effetti dei patogeni.

### **VII.7.3 Interventi nel vigneto in presenza della malattia**

L'abbandono dei prodotti a base di arsenico attraverso i quali l'esca era contenuta in campo, non ha potuto essere seguito dall'adozione di interventi di lotta altrettanto efficaci.

Il complesso esca è caratterizzato dalla mancanza di correlazione tra estensione della necrosi del tessuto legnoso e sintomatologia, quest'ultima invece correlata con perdite di produzione in termini di quantità e di qualità. Pertanto, il tentativo di ridurre l'espressione

sintomatica risulta una via obbligata per una malattia che non è possibile eliminare. In tal senso l'unica esperienza positiva osservata è relativa all'effetto collaterale di applicazioni fogliari di fosetyl Al in funzione antiperonosporica, con contenimento dell'incidenza della manifestazione sintomatica in impianti caratterizzati da corretta gestione e favorevoli condizioni agro-ambientali (ad esempio, assenza di ristagni idrici).

Evitando di soffermarci sull'antica e nota pratica della slupatura (asportazione chirurgica del legno cariato) o sull'apertura del tronco e inserimento di una pietra così da lasciare esposti all'aria i tessuti cariati, l'unico intervento praticabile consiste nella capitozzatura del tronco e all'allevamento dal basso di un tralcio che andrà a costituire il tronco della nuova pianta. Questa pratica deve essere effettuata in tardo autunno o in inverno e la superficie di taglio deve essere immediatamente e accuratamente protetta con mastici anche addizionati con fungicidi. L'esito dell'intervento è legato alla possibilità che la porzione di tronco lasciato in sito sia completamente sano (per questo è consigliabile effettuare il taglio trasversale il più in basso possibile, confidando nel fatto che innesto e portinnesto siano liberi da infezioni). Nondimeno, l'operazione di risanamento per capitozzatura comporta un significativo impegno di mano d'opera e una temporanea perdita di produzione, che può essere ovviata scegliendo un pollone di sostituzione fin dal primo anno in cui la pianta manifesta sintomi ed eliminando il tronco infetto solo dopo 2 o 3 anni. Non vi è comunque la garanzia di evitare la ricomparsa dell'esca. La decisione di eseguire i tagli dovrà dunque tener conto degli obiettivi che si vogliono raggiungere (ad esempio, allungare la vita produttiva della pianta) e del contesto nel quale ci si trovi a operare, con particolare riferimento all'età dell'impianto e alla percentuale di diffusione dell'esca nel vigneto.

#### VII.7.4 Conclusioni

Molti progressi sono stati compiuti per meglio comprendere una malattia che, un tempo, era assimilata esclusivamente alla carie del legno e a fenomeni di apoplezia di piante mature. Tali studi hanno consentito di delineare uno scenario articolato in cui i patogeni associati al complesso esca possono infettare le piante dal vivaio alla piena maturità del vigneto. La maggior difficoltà è comprendere che questa presenza costante della malattia e le sue peculiarità comportano l'adozione di una serie di misure, prevalentemente a carattere preventivo, nessuna delle quali risolutiva e i cui effetti non sono spesso così evidenti, soprattutto perché la malattia stessa non è riconducibile a semplici relazioni di causa-effetto.

Tuttavia, l'adozione puntuale e paziente delle misure indicate e i continui progressi sullo sviluppo delle strategie di lotta che accompagnano l'evoluzione delle conoscenze sulla malattia, possono contribuire a ridurre le occasioni d'infezione e, più in generale, l'impatto del complesso esca sulla longevità e sanità dei vigneti e sulle produzioni. Gli studi sul mal dell'esca non si sono interrotti, almeno per il momento, e non si esclude che in tempi più o meno brevi potranno esserci nuove e interessanti novità per vivaisti e viticoltori.

## Considerazioni conclusive

Giuseppe Surico

In questo volume sono riportati, in un insieme organico, i risultati salienti del Progetto MESVIT - *Mal dell'Esca della Vite. Interventi di ricerca e sperimentazione per il contenimento della malattia* e alcune altre informazioni ricavate da articoli pubblicati nel recente passato in Italia e all'estero. Si è scritto che, dopo un silenzio della ricerca sul mal dell'esca durato circa cinquant'anni, si è ricominciato a studiare questa malattia verso la fine degli anni ottanta del XX secolo. In oltre 15 anni di studi e sperimentazione il concetto che si aveva della malattia è stato completamente rivoluzionato ed è stata acquisita la sua dimensione estremamente complessa in materia di eziologia, di epidemiologia, di meccanismi di formazione dei sintomi fogliari e fenomeni connessi (fluttuazione da un anno all'altro; variabilità del sintomo; epoca di comparsa), di diagnosi, di protezione. Per ciascuno di questi argomenti/obiettivi sono stati ottenuti risultati significativi che, da un lato, possono considerarsi acquisizioni definitive e, dall'altro, costituiscono utile premessa per ulteriori avanzamenti. Ad esempio, sono stati ottenuti dati che confermano, ancora oggi, l'elevata incidenza dell'esca e dell'apoplessia in molte regioni italiane; è stata accertata, con buona approssimazione, l'andamento nel tempo della diffusione delle spore di *Phaeomoniella chlamydospora* (*Pch*) e di *Phaeoacremonium aleophilum* (*Pal*) e, da altra fonte (Fischer, 2008), di *Fomitiporia mediterranea* (*Fmed*). Nuove procedure di indagine statistica hanno confermato la distribuzione casuale nel vigneto delle piante ammalate, ma hanno anche dimostrato l'esistenza, nell'ambito della distribuzione casuale, di isole di aggregazione variabili di anno in anno, quanto a posizione nel vigneto. Ciò significa, evidentemente, che l'ambiente gioca un ruolo importante, ancora del tutto ignoto, nella comparsa dei sintomi fogliari dell'esca.

È stato confermato, per via sperimentale, che una maggiore disponibilità di acqua nel terreno favorisce la comparsa della malattia, riducendo la percentuale di esca nascosta a favore di quella apparente. Quanto alle vie di infezione c'è stata una chiara conferma della possibilità di infezioni in vivaio e, quindi, del pericolo di mettere in commercio materiale di propagazione infetto. Non si è riusciti, però, a dimostrare la relazione, diretta o indiretta, fra materiale infetto e prestazione della pianta in campo: se è vero che una barbatella colonizzata da *Pch* e *Pal* (in qualche raro caso anche da *Fmed*) deve certamente considerarsi infetta/ammalata è anche vero che questa barbatella, una volta in campo, potrà oppure no manifestare la malattia, in tempi più o meno brevi (o lunghi), in dipendenza di fattori che non sono stati ancora identificati.

Lo studio della microflora endofita, batteri e funghi, ha consentito di individuare un ceppo fungino antagonista che potrebbe trovare applicazione pratica.



I tentativi per giungere a una migliore conoscenza dei meccanismi di formazione dei sintomi fogliari hanno dato risultati di interesse, anche se non definitivi. È stato accertato che nella fase di comparsa dei sintomi il sistema fisiologico della pianta, esemplificato dall'andamento della fotosintesi clorofilliana e da altri indici degli scambi gassosi nella pianta o dal contenuto in amminoacidi (inclusa la prolina), elementi minerali e acido abscissico nelle foglie, è fortemente compromesso. Responsabili dell'alterazione sono verosimilmente metaboliti fitotossici che si vanno ad accumulare nelle foglie. Ed effettivamente, si è riusciti, per via immunoenzimatica, a dimostrare la presenza nelle foglie di esopolisaccaridi (EPSs) fitotossici (che sono risultati essere diversi, per la struttura, da quanto precedentemente indicato), ma non di scitalone e isosclerone (le altre presunte tossine di *Pch* e *Pal*). Riguardo a queste ultime due tossine (prodotti intermedi della biosintesi della melanina), è stata avanzata l'ipotesi che possano esplicare la loro azione, consistente nella comparsa di imbrunimenti, nello stesso sito di formazione (il legno). Riguardo alla diagnosi sono stati messi a punto protocolli molecolari, applicabili a tutti i funghi dell'esca, incluse specie di Botryosphaeriaceae.

È stata confermata l'uniformità genetica di *Pch*, finora unica specie del genere su vite; al contrario, sono state individuate quattro nuove specie di *Phaeoacremonium* (sono ora 28 quelle segnalate su vite) e a una di esse è stato dato il nome di *Phaeoacremonium tuscanum*. Il genere si conferma dunque come estremamente variabile e ubiquitario, avendo come ospiti anche piante diverse dalla vite.

Indagini condotte direttamente sul legno di vite nelle prime fasi di evoluzione dei sintomi interni dell'esca (il cosiddetto legno bruno-rosso) hanno permesso di identificare, oltre al resveratrolo, diversi altri derivati stilbenici (in particolare viniferine) che si accumulano nel legno in risposta all'infezione. Livelli alterati di resveratrolo sono stati riscontrati anche nelle foglie e negli acini. Questi risultati suggeriscono che la vite reagisce energicamente e prontamente alla presenza di patogeni nel legno e ciò potrebbe spiegare l'evoluzione piuttosto lenta di *Pch* e *Pal* nelle piante e, forse, anche l'incerto passaggio della malattia dalle barbatelle alle piante in campo e forse pure la fluttuazione dei sintomi da un anno all'altro.

Le piante ammalate, ma asintomatiche, vegetano e producono regolarmente. Ciò significa che se si riuscisse ad allungare il periodo di tempo che intercorre fra un episodio sintomatico e l'altro (fluttuazione della malattia) si riuscirebbe a convivere meglio con l'esca.

Per quanto attiene alla lotta non sono stati individuati, fra quelli in commercio, principi attivi in grado di arrestare la malattia. È tuttavia possibile migliorare lo stato sanitario del vigneto con una serie di misure preventive da applicare con regolarità in vivaio e in campo.

Tutte queste risposte e altre ancora sono dunque scaturite dalla ricerca sul mal dell'esca svolta nell'ambito del Progetto MESVIT, ma ancora numerosi sono gli interrogativi che attendono una soluzione. Ad esempio, con riferimento alle tossine prodotte dai funghi dell'esca e, dunque, al meccanismo di formazione dei sintomi fogliari, c'è ancora da caratterizzare, a livello chimico, biochimico e fisiologico, gli EPSs di *Pch* e *Pal*; da indagare sulla presenza di eventuali altre tossine nella frazione idrosolubile (in particolare la frazione proteica coinvolta nell'arrossamento delle foglie); dimostrare il ruolo nella genesi dei sintomi fogliari degli EPSs e delle altre due tossine note di *Pch* e *Pal*, scitalone e isosclerone. Riguardo invece agli agenti patogeni dell'esca, *Pch* e *Pal*, ci si chiede se i due funghi agiscono

di concerto, in successione, o in maniera indipendente; se, come, quando e con quale meccanismo la loro presenza nelle barbatelle si traduce nella malattia in campo (passaggio da uno stato endofitico a uno patologico); se esiste in *Phacomoniella* una variabilità paragonabile a quella esistente in *Phaeoacremonium*; se sarà possibile mettere a punto un saggio di patogenicità capace di riprodurre con certezza e regolarmente i sintomi della malattia; quali sono le cause della fluttuazione dei sintomi fogliari dell'esca.

Ad oggi, con finanziamenti diversi, si stanno proseguendo alcune indagini che riguardano, ad esempio, la possibilità di intervenire in vivaio con trattamenti chimici per eliminare le infezioni da *Pch* e *Pal*; l'adozione di forme di potatura adatte che riducano il rischio di infezioni; la definizione del ruolo fitopatogeno delle Botryosphaeriaceae ecc.

Pur fra le mille difficoltà che l'Università italiana e la ricerca attraversano in questi anni, speriamo di poter disporre dei mezzi necessari per aggiungere altri capitoli alle conoscenze sul mal dell'esca.

## Bibliografia



## Bibliografia specifica sul mal dell'esca della vite\*

- ABBATECOLA A. (2000) – *Mal dell'esca della vite: caratterizzazione della micoflora associata, della distribuzione spaziale della malattia in campo e della struttura genetica di popolazioni di Fomitiporia punctata (P. Karst.) Murril*. Tesi di Dottorato, Università degli Studi di Bari, Bari.
- ABBATECOLA A., DONGIOVANNI C., FARETRA F., POLLASTRO S. (2000) – *Observations on the fungi associated with esca and on spatial distribution of esca-symptomatic plants in apulian (Italy) vineyards*. *Phytopathologia Mediterranea*, 39: 206-210.
- ABBATECOLA A., POLLASTRO S., PICHIERRI A., FARETRA F. (2006) – *Survey on the presence of Phaeoconiella chlamydospora in grapevine rootstocks*. *Journal of Plant Pathology*, 88: 31.
- ABOU-MANSOUR E., COUCHÉ E., TABACCHI R. (2004) – *Do fungal naphthalenones have a role in the development of esca symptoms?* *Phytopathologia Mediterranea*, 43: 75-82.
- ADALAT K., WHITING C., ROONEY-LATHAM S., GUBLER W.D. (2000) – *Pathogenicity of three species of Phaeoacremonium spp. on grapevine in California*. *Phytopathologia Mediterranea*, 39: 92-99.
- AGRELLI D., AMALFITANO C., CONTE P., MUGNAI L. (2009) – *Chemical and spectroscopic characteristics of the wood of Vitis vinifera cv. Sangiovese affected by esca disease*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 24: 11469-11475.
- ALVES A., HENRIQUES S., FRAGOEIRO S., SANTOS C., PHILLIPS A.J.L., CORREIA A. (2004b) – *Applicability of rep-PCR genomic fingerprinting to molecular discrimination of members of the genera Phaeoacremonium and Phaeoconiella*. *Plant Pathology*, 53: 629-634.
- AMALFITANO C., AGRELLI D., EVIDENTE A., MUGNAI L., SURICO G. (2009) – *Accumulation of viniferins and their reactivity to ROS in the reddish-brown wood of esca diseased grapevine (cv. Sangiovese)*. *Phytopathologia Mediterranea*, 48: 171 (abstract).
- AMALFITANO C., EVIDENTE A., SURICO G., TEGLI S., BERTELLI E., MUGNAI L. (2000) – *Phenols and stilbene polyphenols in the wood of esca-diseased grapevines*. *Phytopathologia Mediterranea*, 39: 178-183.
- AMALFITANO C., PEDUTO F., MUGNAI L., EVIDENTE A., SURICO G. (2004) – *Metaboliti stilbenici da stress prodotti da Vitis vinifera cv. Sangiovese contro i funghi responsabili del mal dell'esca*. XXII Convegno SICA [Perugia (Italia), 21-24 settembre 2004].
- ANDOLFI A., CIMMINO A., EVIDENTE A., IANNACONE M., CAPPARELLI R., MUGNAI L., SURICO G. (2009) – *Production of polyclonal antibodies for the identification by flow cytometry of Phaeoconiella chlamydospora toxins for the study of the origin and mechanisms of esca grapevine foliar symptoms*. *Plant Disease*, 93: 680-684.
- ANDREINI L., VITI R., BARTOLINI S., SCALABRELLI G. (2009) – *Esca infection influenced bud breaking of Cabernet Sauvignon grapevines*. *Phytopathologia Mediterranea*, 48 (1): 179 (abstract).

\* Sono qui elencati tutti i lavori citati che riguardano direttamente il mal dell'esca della vite e i suoi agenti causali. Alla fine del capitolo I.1.3, *Notizie storiche sul mal dell'esca* sono invece riportati, in ordine cronologico, i lavori pubblicati sull'argomento dal 1873 al 1985 (pp. 55-58).

- ANDREINI L., VITI R., SCALABRELLI G. (2008) – *Modificazioni anatomiche indotte da mal dell'Esca su "Sangiovese"*. Abstracts, Terzo Simposio Internazionale sul Sangiovese. Modelli di terroir per vini d'eccellenza [Firenze (Italy), 3-5 dicembre 2008], p. 78 (abstract).
- ANDREINI L., VITI R., SCALABRELLI G. (2009) – *Histological observations on the petioles of esca symptomatic leaves*. *Phytopathologia Mediterranea*, 48 (1): 169 (abstract).
- ANDREINI L., VITI R., SCALABRELLI G. (2009) – *Modificazioni anatomiche indotte da mal dell'Esca sulla vite*. (Rivista online di viticoltura ed enologia, 8/1: 7), [www.infowine.com](http://www.infowine.com).
- ANDREINI L., GUCCI R., CARUSO G., BERTOLLA C., SCALABRELLI G., VITI R. (2009) – *Gas exchange, stem water potential and xylem flux on some grapevine cultivars affected by esca disease*. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, Vol. 30, 2: 142-147.
- ARI M.E. (2000) – *A general approach for esca disease in the vineyards of Turkey*. *Phytopathologia Mediterranea*, 39: 35-37.
- ARMENGOL J., VICENT A., TORNÉ L., GARCÍA-FIGUERES F., GARCÍA-JIMENEZ J. (2001) – *Fungi associated with esca and grapevine declines in Spain: a three-year survey*. *Phytopathologia Mediterranea*, 40: S325-S329.
- AROCA A., GARCÍA-FIGUERES F., BRACAMONTE L., LUQUE J., RAPOSO R. (2006) – *A survey of trunk disease pathogens within rootstocks of grapevines in Spain*. *European Journal of Plant Pathology*, 115: 195-202.
- AROCA A., RAPOSO R. (2007) – *PCR-based strategy to detect and identify species of Phaeoacremonium causing grapevine diseases*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 2911-2918.
- AROCA A., RAPOSO R., LUNELLO P. (2008) – *A biomarker for the identification of four Phaeoacremonium species using the  $\beta$ -tubulin gene as the target sequence*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80: 1131-1140.
- AUGER J., PÉREZ I., ESTERIO M., NAVIA V., GUBLER W.D., ESKALEN A. (2005) – *Fungi associated with grapevine wood decay and young vine decline in Chile*. *Phytopathologia Mediterranea*, 44: 89-90 (abstract).
- AUGER J., ESTERIO M., PÉREZ I., ESKALEN A., GUBLER W.D. (2004) – *First report of Phaeoacremonium chlamydospora on Vitis vinifera and French American hybrids in Chile*. *Plant Disease*, 88: 1285.
- BENSADOK D.F. (2004) – *Le brunissement du bois de la vigne: mise au point des méthodes de diagnostic moléculaires pour Phaeoacremonium chlamydospora*. MSc thesis, Mediterranean Agronomic Institute of Bari, Italy.
- BERTELLI E., MUGNAI L., SURICO G. (1998) – *Presence of Phaeoacremonium chlamydosporum in apparently healthy rooted grapevine cuttings*. *Phytopathologia Mediterranea*, 37: 79-82.
- BERTONA A., CAMPAGNA C., GIAMBELLI A., PASQUALI F. (1996) – *Attività di Ciproconazolo (Atemi) sul complesso del "mal dell'esca"*. Atti Convegno nazionale "Arsenico, sì-no" [Villa Manin di Passariano, Codroipo (UD), 14 dicembre 1995], pp. 147-150.
- BISIACH M., MINERVINI G., DI MARCO S. (1996) – *Attualità nella difesa contro il "mal dell'esca" della vite*. Atti Convegno nazionale "Arsenico, sì-no" [Villa Manin di Passariano, Codroipo (UD), 14 dicembre 1995], pp. 123-135.
- BORGIO M. (1995) – *Mal dell'Esca ed eutipiosi: due gravi malattie da deperimento della vite*. *L'Eno-tecnico*, 31: 61-69.
- BORGIO M. (1996) – *Posizione in seno all'O.I.V. sull'impiego degli arseniti in vitivinicoltura*. Atti Convegno nazionale "Arsenico, sì-no" [Villa Manin di Passariano, Codroipo (UD), 14 dic.1995], pp. 11-13.
- BORGIO M. (1999) – *Malattie responsabili di deperimenti sulla vite: mal dell'Esca e fitoplasmosi*. Convegno "Realtà e prospettive della viticoltura ascolana" [Consorzio Agrario Provinciale, Ascoli Piceno, 7 dicembre 1999], pp. 47-72.
- BORGIO M. (2001) – *Anciennes et nouvelles maladies de la vigne en Italie: importance de la protection intégrée*. *Bulletin OIV*, 74, (847-848): 579-586.
- BORGIO M., BELLOTTO D., DAL CORTIVO G.L., ZANZOTTO A., TOSI E., MARCHESINI E. (2008) – *Sensibilità varietale al mal dell'esca della vite nel Veneto*. Atti Giornate Fitopatologiche, 2: 223-230.
- BORIE B., JACQUIOT L., JAMAUX-DESPREAUX I., LARIGNON P., PÉROS J.P. (2002) – *Genetic diversity in populations of the fungi Phaeoacremonium chlamydospora and Phaeoacremonium aleophilum on grapevines in France*. *Plant Pathology*, 51: 85-96.
- BOTTURA M., ALDRIGHETTI C. (2003) – *Mal dell'esca della vite: malattia da non sottovalutare*. *Terra Trentina*, 4: 35-37.
- BOUBALS D. (1996) – *L'emploi de l'arsénite de soude en viticulture? Oui*. Atti Convegno nazionale "Arsenico, sì-no" [Villa Manin di Passariano, Codroipo (UD), 14 dicembre 1995], pp. 15-17.
- BRADSHAW R.E., DUAN G., LONG P.G. (2005) – *Transformation of fungal grapevine trunk disease pathogens with the green fluorescent protein gene*. *Phytopathologia Mediterranea*, 44: 162-168.
- BRUNO G., SPARAPANO L. (2004) – *Degradazione di resveratrolo e acido tannico da parte di Phaeoacremonium chlamydospora, Phaeoacremonium aleophilum e Fomitiporia mediterranea, funghi associati al mal dell'esca della vite*. *Micologia Italiana*, 34: 34-52.
- BRUNO G., SPARAPANO L. (2006a) – *Effect of esca-associated fungi on Vitis vinifera L. I. Characterization of secondary metabolites in culture media and host responses to the pathogens in calli*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 69: 209-223.
- BRUNO G., SPARAPANO L. (2006b) – *Effect of esca-associated fungi on Vitis vinifera L. II. Characterization of biomolecules in xylem sap and leaves of healthy and diseased vines*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 69: 195-208.
- BRUNO G., SPARAPANO L. (2006c) – *Effect of esca-associated fungi on Vitis vinifera L. III. Enzymes produced by the pathogens and their role in fungus-to-plant or in fungus-to-fungus interactions*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 69: 182-194.
- BRUNO G., SPARAPANO L. (2007a) – *Effects of three esca-associated fungi on Vitis vinifera L. IV. Diffusion through the xylem of metabolites produced by two tracheiphilous fungi in the woody tissue of grapevine leads to esca-like symptom on leaves and berries*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 71: 106-124.
- BRUNO G., SPARAPANO L. (2007b) – *Effects of three esca-associated fungi on Vitis vinifera L. V. Changes in the chemical and biological profile of xylem sap from disease cv. Sangiovese vines*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 71: 210-229.
- BRUNO G., SPARAPANO L., AMALFITANO C., EVIDENTE A., GRANITI A. (2000) – *Detection of phytotoxic fungal metabolites in xylem sap of esca-affected grapevines*. *Biodiversity in Plant Pathology*. Proceedings 5<sup>th</sup> Congress of the European Foundation for Plant Pathology [Taormina (CT), 18-22 settembre 2000], Abstract n. 204 P.
- CALZARANO F., AMALFITANO C., SEGHELLI L., D'AGOSTINO V. (2007) – *Foliar treatment of esca-proper affected vines with nutrients and bioactivators*. *Phytopathologia Mediterranea*, 44: 207-217.
- CALZARANO F., AMALFITANO C., SEGHELLI L., COZZOLINO V. (2009) – *Nutritional status of vines affected with esca proper*. *Phytopathologia Mediterranea*, 48: 20-31.
- CALZARANO F., CICHELLI A., ODOARDI M. (2001) – *Preliminary evaluation of variations in composition induced by esca on cv. Trebbiano d'Abruzzo grapes and wines*. *Phytopathologia Medit.*, 40: S443-S448.
- CALZARANO F., D'AGOSTINO V., DEL CARLO M. (2008) – *Trans-resveratrol extraction from grapevine: application to berries and leaves from vines affected by esca proper*. *Analytical Letters*, 41: 1-13.
- CALZARANO F., DI MARCO S. (1997) – *Stato della ricerca sul "mal dell'esca" della vite*. *Informatore Fitopatologico*, 9: 9-20.
- CALZARANO F., DI MARCO S. (2001) – *Verifiche di strategie a basso impatto ambientale basate sull'utilizzo di tecniche di micro-iniezione al tronco su viti affette da mal dell'esca nel comprensorio viticolo della provincia di Teramo*. Atti del Convegno nazionale "Metodologie avanzate di ricerca e

- tematiche strategiche per lo sviluppo del settore agro-alimentare" [Mosciano Stazione (TE), 6-7 dicembre 2000], pp. 207-211.
- CALZARANO F., DI MARCO S. (2007) – *Wood discoloration and decay in grapevines with esca proper and their relationship with foliar symptoms*. *Phytopathologia Mediterranea*, 46: 96-101.
- CALZARANO F., DI MARCO S., CESARI A. (2004a) – *Benefit of fungicide treatment after trunk renewal of vines with different types of esca necrosis*. *Phytopathologia Mediterranea*, 43: 116-124.
- CALZARANO F., DI MARCO S., SEGHELLI L., D'AGOSTINO V., OSTI F., BERTAZZA G. (2006) – *Decrementi qualitativi della produzione indotti dall'esca propria nei vigneti*. Atti IV Convegno AISSA "Qualità e sostenibilità delle produzioni agrarie, alimentari e forestali" [Mosciano Sant'Angelo (TE), 5-6 dicembre 2006], pp. 79-80.
- CALZARANO F., SEGHELLI L., DEL CARLO M., CICHELLI A. (2004b) – *Effect of esca on the quality of berries, musts and wines*. *Phytopathologia Mediterranea*, 43: 125-135.
- CASTAING L.R.M. (1987) – *Lutte contre l'esca et la pollution par l'arsenic*. *Progrès agricoles et viticole*, 104, 4: 97-102.
- CASTALDI R. (2000) – *Mal dell'Esca: individuarlo per combatterlo*. *Informatore Fitopatologico*, 42: 135-137.
- CAVANNI P., FANTUZ F., PONTI I. (1987) – *Le malattie crittogamiche del legno della vite*. *Informatore Fitopatologico*, 37: 27-34.
- CESARI A., DI MARCO S., CALZARANO F. (2005) – *Presenza del mal dell'esca nell'area viticola della provincia di Teramo: strategie sperimentali di difesa a basso impatto ambientale*. Media Ed., Mosciano Sant'Angelo (TE), p. 59.
- CHIARAPPA L. (1997) – *Phellinus ignarius: the cause of spongy decay of black measles (esca) disease of grapevine*. *Phytopathologia Mediterranea*, 36: 109-111.
- CHIARAPPA L. (2000a) – *Esca (black measles) of grapevine. An overview*. *Phytopat. Medit.*, 39: 11-15.
- CHIARAPPA L. (2000b) – *Summary report from the First International Workshop on Grapevine Trunk Diseases*. *Phytopathologia Mediterranea*, 39: 241-242.
- CHICAU G., ABOIM-INGLEZ M., CABRAL S., CABRAL J.P.S. (2000) – *Phaeoacremonium chlamydosporum and Phaeoacremonium angustius associated with esca and grapevine decline in Vinho Verde grapevines in northwest Portugal*. *Phytopathologia Mediterranea*, 39: 80-86.
- CHIUSA B., COLLA R., TESTI V., ZAMBINI R. (2008) – *Mal dell'esca in Provincia di Piacenza e Parma*. In: CONSORZIO FITOSANITARIO DI PARMA (ed.), *Vite: emergenze fitosanitarie nelle province di Piacenza e Parma*, pp. 70-74.
- CHRISTEN D., SCHÖNMANN S., JERMINI M., STRASSER R.J., DÉFAGO G. (2007) – *Characterization and early detection of grapevine (Vitis vinifera) stress responses to esca disease by in situ chlorophyll fluorescence and comparison with drought stress*. *Environmental and Experimental Botany*, 60: 504-514.
- CHRISTEN D., THARIN M., PERRIN-CHERIOUX S., ABOU-MANSOUR E., TABACCHI R., DÉFAGO G. (2005) – *Transformation of Eutypa dieback and esca disease pathogen toxins by antagonistic fungal strains reveals a second detoxification pathway not present in Vitis vinifera*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 7043-7051.
- CICCARONE C., GRANITI A., SCHIAFFINO A., MARRAS F. (2004) – *Molecular analysis of Fomitiporia mediterranea isolates from esca affected grapevines in southern Italy*. *Phytopat. Medit.*, 43: 268-272.
- CIFERRI R. (1955) – *Il mal dell'esca e l'apoplezia della vite*. In: *Manuale di Patologia Vegetale. Tomo II*. Società Editrice Dante Alighieri, Firenze, pp. 982-988.
- COBOS R., MARTIN M.T. (2008) – *Molecular characterization of Phaeoconiella chlamydospora isolated from grapevines in Castilla y León (Spain)*. *Phytopathologia Mediterranea*, 47: 20-27.
- CONCEIÇÃO S., FRAGOEIRO S., PHILLIPS A. (2005) – *Physiological response of grapevine cultivars and rootstock to infection with Phaeoacremonium and Phaeoconiella isolates: an in vitro approach using plants and calluses*. *Scientia Horticulturae*, 103: 187-198.
- CONTESINI A. (1991) – *Contributi alla conoscenza del mal dell'esca della vite e del suo agente patogeno*. Tesi di Dottorato. Università degli Studi di Bari, Bari.
- CONTESINI A. (1996) – *Il Mal dell'esca della vite in Puglia: microflora associata al legno infetto*. Petria, 6: 77-82.
- CONTESINI A.M., FARETRA F. (1995) – *Si diffonde il mal dell'esca*. *Terra e Vita*, 36: 81-85.
- CORTESI P., FISCHER M., MILGROOM M.G. (2000a) – *Identification and spread of Fomitiporia punctata associated with wood decay of grapevine showing symptoms of esca*. *Phytopathology*, 90: 967-972.
- CORTESI P., FISCHER M., MILGROOM M.G. (2000b) – *Population diversity of Fomitiporia punctata from grapevine and spread of esca disease*. *Integrated Control in Viticulture, IOBC/wprs Bulletin*, 23 (4): 71-73.
- CORTI G., AGNELLI A., CUNIGLIO R., RICCI F., PANICHI M. (2004) – *Suolo e mal dell'Esca della vite: il punto dall'inizio delle indagini*. *L'Informatore Agrario*, 12: 79-83.
- CORTI G., CUNIGLIO R., AGNELLI A., RICCI F. (2007) – *Influence of soil factors on esca infection in a vineyard soil on Pliocene deposits*. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 38: 661-678.
- CRAVERO S., SCAPIN I., ROMANA G. (2000) – *Effetti di misure di profilassi e di tentativi di risanamento contro il mal dell'esca della vite [Vitis vinifera L. - Piemonte]*. *Atti Giornate Fitopatologiche*, 2: 235-240.
- CROUS P.W., GAMS W. (2000) – *Phaeoconiella chlamydospora gen. et comb. nov., a causal organism of Petri grapevine decline and esca*. *Phytopathologia Mediterranea*, 39: 112-118.
- CROUS P.W., GAMS W., WINGFIELD M.J., VAN WYK P.S. (1996) – *Phaeoacremonium gen. nov. associated with wilt and decline diseases of woody hosts and human infections*. *Mycologia*, 88: 786-796.
- CROUS P.W., SWART L., COERTZE S. (2001) – *The effect of hot-water treatment on fungi occurring in apparently healthy grapevine cuttings*. *Phytopathologia Mediterranea*, 40: S464-S466.
- CENTRO RICERCHE PRODUZIONI VEGETALI (1999) – *Il mal dell'esca della vite: ricerche sulle metodologie di lotta*. In: *Relazione tecnica anno 1999*.
- DAL RÌ M. (1996) – *Come si previene il "mal dell'esca"*. *Terra Trentina*, 4: 30-32.
- DAMM U., MOSTERT L., CROUS P.W., FOURIE P.H. (2008) – *Novel Phaeoacremonium species associated with necrotic wood of Prunus trees*. *Persoonia*, 20: 87-102.
- DARRIEUTORT G., LECOMTE P. (2007) – *Evaluation of a trunk injection technique to control grapevine wood diseases*. *Phytopathologia Mediterranea*, 46: 50-57.
- DEL RÍO J.A., GÓMEZ P., BAÍDEZ A., FUSTER M.D., ORTUÑO A., FRIAS V. (2004) – *Phenolic compounds have a role in the defence mechanism protecting grapevine against the fungi involved in Petri disease*. *Phytopathologia Mediterranea*, 43: 87-94.
- DEL RÍO J.A., GONZALEZ A., FUSTER M.D., BOTIA J.M., GÓMEZ P., FRIAS V., ORTUÑO A. (2001) – *Tylose formation and changes in phenolic compounds of grape roots infected with Phaeoconiella chlamydospora and Phaeoacremonium species*. *Phytopathologia Mediterranea*, 40: S394-S399.
- DESACHE F., COURLIT Y., MÈNARD E. (1995) – *Optimiser la lutte chimique contre l'Esca*. *Phytoma. La Défense des Végétaux*, 470: 29-31.
- DESACHE F., COURLIT Y., MÈNARD E., LURTON L., LEPPERT B. (1992) – *Protection du Vignoble: lutte chimique contre l'esca de la vigne*. *Progrès agricoles et viticole*, 109, 9: 205-206.
- DI MARCO S. (1990a) – *Attività in vitro di fungicidi triazolici contro i funghi lignicoli della vite e dei fruttiferi*. *Atti Giornate Fitopatologiche*, 2: 317-324.
- DI MARCO S. (1990b) – *Possibili forme di intervento nei confronti di Phellinus igniarius (L.: Fr.) Quel., agente del "mal dell'esca" della vite*. *Atti Giornate Fitopatologiche*, 2: 151-160.
- DI MARCO S. (1990c) – *Possible new control strategies against grapevine wood decay fungi*. *Proceedings 8<sup>th</sup> Congress of the Mediterranean Phytopathological Union [Agadir (Marocco), october 28-november 3], pp. 465.*

- DI MARCO S. (1995) – *Il mal dell'esca della vite: sintomi cause e difesa*. Atti dell'incontro "Vite & Ambiente" [Bazzano (BO), 24 marzo 1995], pp. 1-20.
- DI MARCO S. (1996a) – *Aspetti legati alla difesa dal "Mal dell'esca della vite"*. In: *Difesa e valorizzazione del patrimonio viticolo astigiano*. Atti dei seminari tecnici, pp. 75-82.
- DI MARCO S. (1996b) – *Il mal dell'esca: una vecchia malattia della vite sempre di attualità*. L'Informatore Agrario, 52: 69-72.
- DI MARCO S. (2002) – *Recenti acquisizioni, stato attuale e prospettive nella lotta al mal dell'esca della vite*. Notiziario tecnico CRPV, 63: 85-90.
- DI MARCO S. (2005) – *Mal dell'esca, una malattia multifforme*. Terra e Vita, 15: 58-61.
- DI MARCO S., DRAGHETTI L. (1992a) – *Greenhouse and open field triazole activity against black measles "Esca" disease*. IOBC WPRS Bulletin, XV, 2: 77.
- DI MARCO S., DRAGHETTI L. (1992b) – *Ulteriori acquisizioni sull'attività di fungicidi triazolici contro il mal dell'esca della vite*. Atti Giornate Fitopatologiche, 2: 221-228.
- DI MARCO S., DRAGHETTI L. (1993) – *Tecniche di lotta contro Sphaeroopsis malorum su vite in ambiente controllato e attività collaterale nei confronti dell'oidio*. La difesa delle piante, 16, 3: 25-34.
- DI MARCO S., DRAGHETTI L., LARIGNON P., BRUNELLI A. (1993) – *Control of grapevine wood decay fungi by a "syringe" injection application technique*. Proceedings II International Symposium on Pesticides Application [Strasbourg (France), 22-24 settembre 1993], ANPP Annales, 2: 595-602.
- DI MARCO S., MAZZULLO A., CALZARANO F. (1998) – *Further evidence for the activity of phosetyl Al (Aliette Ca) and phosphorous acid on fungi involved in esca disease*. Integrated Control in Viticulture, IOBC/wprs Bulletin, 21, 2: 87-89.
- DI MARCO S., MAZZULLO A., CALZARANO F., CESARI A. (1997) – *First results on the activity of phosetyl Al and phosphorous acid on black measles "Esca" disease*. Proceedings 10<sup>th</sup> Congress of the Mediterranean Phytopathological Union [Montpellier (France), 1-5 june 1997], pp. 419-423.
- DI MARCO S., MAZZULLO A., CALZARANO F., CESARI A. (1999) – *In vitro studies on the phosphorous acid and vitis stilbenes interaction and in vivo phosetyl Al activity towards Phaeoacremonium spp. grapevine wood decay agents*. In: LYR H., RUSSEL P.E., DEHENE H.W., SISLER H.D. (eds.), *Modern Fungicides and Antifungal Compounds II*, pp. 171-178. Intercept, Andover (UK).
- DI MARCO S., MAZZULLO A., CALZARANO F., CESARI A. (2000) – *The control of esca: status and perspectives*. Phytopathologia Mediterranea, 39: 232-240.
- DI MARCO S., OSTI F. (2005a) – *Evoluzione delle conoscenze sul mal dell'esca della vite e prime esperienze di lotta con nutrienti e biostimolanti*. Il Divulgatore, 28: 26-34.
- DI MARCO S., OSTI F. (2005b) – *Effect of fosetyl Al foliar application towards esca fungi in grapevine*. Phytopathologia Mediterranea, 44, 1: 114-115.
- DI MARCO S., OSTI F. (2005c) – *Esperienze di lotta al mal dell'esca*. Il Divulgatore, XXVIII, 5: 26-34.
- DI MARCO S., OSTI F. (2007) – *Applications of Trichoderma to prevent Phaeomoniella chlamydospora infections in organic nurseries*. Phytopathologia Mediterranea, 46: 73-83.
- DI MARCO S., OSTI F. (2008b) – *Effects of Trichoderma applications on vines grown in organic nursery*. Proceedings 16<sup>th</sup> IFOAM Organic World Congress [Modena, 16-20 giugno 2008].
- DI MARCO S., OSTI F., CESARI A. (2004) – *Experiments on the control of esca by Trichoderma*. Phytopathologia Mediterranea, 43: 108-115.
- DI MARCO S., OSTI F., MAZZULLO A., CESARI A. (2001) – *How iron could be involved in esca fungi development*. Phytopathologia Mediterranea, 40: S449-S452.
- DI MARCO S., OSTI F., ROBERTI R., CALZARANO F., CESARI A. (2002) – *Attività di specie di Trichoderma nei confronti di Phaeomoniella chlamydospora, patogeno associato al mal dell'esca della vite*. Atti Giornate Fitopatologiche, 2: 419-424.
- DI MARCO S., SCANNAVINI M. (1999) – *Vite, ecco come difenderla contro il mal dell'Esca*. Agricoltura, 27: 29-30.
- DI MARCO S., SERRA S. (2000) – *Malattie da deperimento causate da funghi*. In: *Contributo della scuola italiana al progresso delle Scienze Vitivinicole*. Accademia italiana della Vite e del Vino, 1: 379-397.
- DONGIOVANNI C. (2001) – *Micoflora associata ad alterazioni del legno della vite in materiale di propagazione e giovani piante e sviluppo di diagnostici molecolari*. Tesi di Dottorato. Università degli Studi di Bari, Bari.
- DUBOS B. (1996) – *Le sindrome de l'Esca*. Atti Convegno nazionale "Arsenico, sì-no" [Villa Manin di Passariano, Codroipo (UD), 14 settembre 1995], pp. 83-94.
- DUBOS B., LARIGNON P. (1988) – *Esca and black measles*. In: PEARSON R.C., GOHEEN A.C. (eds.), *Compendium of Grape Diseases*, American Phytopathological Society, St. Paul, MN-USA, pp. 34-36.
- DULA T., KAPPES E.M., HORVATH A., RABAI A. (2007) – *Preliminary trials on treatment of esca infected grapevines with trunk injection of fungicides*. Phytopathologia Mediterranea, 46: 91-97.
- DUPONT J., LALOUI W., MAGNIN S., LARIGNON P., ROQUEBERT M.F. (2000a) – *Phaeoacremonium viticola, a new species associated with Esca disease of grapevine in France*. Mycologia, 92: 499-504.
- DUPONT J., LALOUI W., ROQUEBERT M.F. (1998) – *Partial ribosomal DNA sequences show an important divergence between Phaeoacremonium species isolated from Vitis vinifera*. Mycological Research, 102: 631-637.
- DUPONT J., MAGNIN S., CESARI C., GATICA M. (2002) – *ITS and  $\beta$ tubulin markers help delineate Phaeoacremonium species, and the occurrence of P. parasiticum in grapevine disease in Argentina*. Mycological Research, 106: 1143-1150.
- DUPONT J., MAGNIN S., PARONNAUD J., ROQUEBERT M.F. (2000b) – *The genus Phaeoacremonium from a molecular point of view*. Phytopathologia Mediterranea, 39: 119-124.
- EDWARDS J., CONSTABLE F., WIECHEL T., SALIB S. (2007a) – *Comparison of the molecular tests – single PCR, nested PCR and quantitative PCR (SYBR<sup>®</sup>Green and TaqMan<sup>®</sup>) for detection of Phaeomoniella chlamydospora during grapevine nursery propagation*. Phytopathologia Mediterranea, 46: 58-72.
- EDWARDS J., LAUKART N., PASCOE I.G. (2001a) – *In situ sporulation of Phaeomoniella chlamydospora in the vineyard*. Phytopathologia Mediterranea, 40: 61-66.
- EDWARDS J., MARCHI G., PASCOE I.G. (2001b) – *Young Esca in Australia*. Phytopathologia Mediterranea, 40: S303-S310.
- EDWARDS J., PASCOE I.G. (2004) – *Occurrence of Phaeomoniella chlamydospora and Phaeoacremonium aleophilum associated with Petri disease and esca in Australian grapevines*. Australasian Plant Pathology, 33: 273-279.
- EDWARDS J., PASCOE I. (2005) – *Experiences with amelioration treatments trialed on Petri disease in Australian vineyards*. Phytopathologia Mediterranea, 44: 112.
- EDWARDS J., PASCOE I.G., SALIB S. (2007b) – *Impairment of grapevine xylem function by Phaeomoniella chlamydospora infection is due to more than physical blockage of vessels with "goo"*. Phytopathologia Mediterranea, 46: 87-90.
- EDWARDS J., PASCOE I.G., SALIB S., LAUKART N. (2003) – *Phaeomoniella chlamydospora and Phaeoacremonium aleophilum can spread into grapevine cane from infected mother vines*. 3<sup>rd</sup> International Workshop on Grapevine Trunk Disease [Christchurch (Nuova Zelanda), 1-2 febbraio 2003], p. 49.
- EDWARDS J., PASCOE I.G., SALIB S., LAUKART N. (2004a) – *Phaeomoniella chlamydospora and Phaeoacremonium aleophilum can spread into grapevine canes from trunks of infected mother vines*. Phytopathologia Mediterranea, 43: 154-155.
- EDWARDS J., PASCOE I.G., SALIB S., LAUKART N. (2004b) – *Hot water treatment of grapevine cuttings reduces incidence of Phaeomoniella chlamydospora in young vines*. Phytopathologia Mediterranea, 43: 158-159.

- EDWARDS J., SALIB S., THOMSON F., PASCOE I.G. (2007c) – *The impact of Phaeoconiella chlamydospora infection on the grapevine's physiological response to water stress - Part 1: Zinfandel*. *Phytopathologia Mediterranea*, 46: 26-37.
- EDWARDS J., SALIB S., THOMSON F., PASCOE I.G. (2007d) – *The impact of Phaeoconiella chlamydospora infection on the grapevine's physiological response to water stress - Part 2: Cabernet Sauvignon and Chardonnay*. *Phytopathologia Mediterranea*, 46: 38-49.
- EGGER E. (1983) – *Lotta contro il mal dell'esca*. *L'Informatore Agrario*, 39, 16: 25516-25517.
- EGGER E. (1987) – *Note sulla comparsa del mal dell'esca*. *L'Informatore Agrario*, 43, 16: 83-85.
- EGGER E. (1988) – *Mal dell'esca*. *L'Informatore agrario*, XLIV(16): 91-95.
- EGON E., GRASSELLI A. (1993) – *Reazioni delle cv. Sangiovese e Trebbiano toscano franche di piede ed innestate su cinque portinnesti diversi della vite*. *Agricoltura ricerca*, 150: 59-76.
- ERKAN ARI M. (2000) – *A general approach for esca disease in the vineyards of Turkey*. *Phytopathologia Mediterranea*, 39: 35-37.
- ESKALEN A., FELICIANO A.J., GUBLER W.D. (2007) – *Susceptibility of grapevine pruning wounds and symptom development in response to infection by Phaeoacremonium aleophilum and Phaeoconiella chlamydospora*. *Plant Disease*, 91: 1100-1104.
- ESKALEN A., GUBLER W.D. (2001) – *Association of spores of Phaeoconiella chlamydospora, Phaeoacremonium inflatipes and Pm. aleophilum with grapevine cordons in California*. *Phytopathologia Mediterranea*, 40: S429-S432.
- ESKALEN A., GUBLER W.D., KHAN A. (2001a) – *Rootstock susceptibility to Phaeoconiella chlamydospora and Phaeoacremonium spp.* *Phytopathologia Mediterranea*, 40: S433-S438.
- ESKALEN A., GUBLER W.D., ROONEY-LATHAM S. (2005a) – *Ascospore release of Togninia minima, cause of esca and grapevine decline in California*. *Plant Health Progress* [www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/research/2005/grape/](http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/research/2005/grape/).
- ESKALEN A., GUBLER W.D., ROONEY-LATHAM S. (2005b) – *Occurrence of Togninia minima perithecia in esca-affected vineyards in California*. *Plant Disease*, 89: 867-871.
- ESKALEN A., GUBLER W.D., ROONEY-LATHAM S. (2005c) – *Teleomorph formation of Phaeoacremonium aleophilum, cause of esca and grapevine decline in California*. *Plant Disease*, 89: 177-184.
- ESKALEN A., GUBLER W.D., ROONEY-LATHAM S. (2005d) – *First report of perithecia of Phaeoacremonium viticola on grapevine (Vitis vinifera) and ash tree (Fraxinus latifolia) in California*. *Plant Disease*, 89: 686.
- ESKALEN A., GUBLER W.D., ROONEY-LATHAM S. (2005e) – *Occurrence of Togninia fraxinopennsylvanica on esca diseased grapevines (Vitis vinifera) and declining ash trees (Fraxinus latifolia) in California vineyards*. *Plant Disease*, 89: 528.
- ESKALEN A., ROONEY-LATHAM S., GUBLER W.D. (2001b) – *Recovery of Phaeoconiella chlamydospora and Phaeoacremonium inflatipes from soil and grapevine tissues*. *Phytopathologia Mediterranea*, 40: S351-S356.
- ESKALEN A., ROONEY-LATHAM S., FELICIANO A.J., GUBLER W.D. (2003) – *Epiphytic occurrence of esca and Petri disease pathogens on grapevine*. *Phytopathology*, 93: S24.
- ESKALEN S., ROONEY-LATHAM S.N., GUBLER W.D. (2004) – *Occurrence of the pycnidial state of Phaeoconiella chlamydospora in California vineyards*. *Phytopathologia Mediterranea*, 43: 153 (abstract).
- ESKALEN S., ROONEY-LATHAM S.N., GUBLER W.D. (2007b) – *Identifying effective management strategies for esca and Petri disease*. *Phytopathologia Mediterranea*, 46: 125-126.
- ESSAKHI S., MUGNAI L., CROUS P.W., GROENEWALD J.Z., SURICO G. (2008) – *Molecular and phenotypic characterization of novel Phaeoacremonium species isolated from esca diseased grapevines*. *Persoonia*, 21: 119-134.
- EVIDENTE A., SPARAPANO L., ANDOLFI A., BRUNO G. (2000) – *Two naphthalenone pentaketides from liquid cultures of Phaeoacremonium aleophilum, a fungus associated with esca of grapevine*. *Phytopathologia Mediterranea*, 39: 162-168.
- FELICIANO A.J., ESKALEN A., GUBLER W.D. (2004) – *Differential susceptibility of three grapevine cultivars to Phaeoacremonium aleophilum and Phaeoconiella chlamydospora on grape berries in California*. *Phytopathologia Mediterranea*, 43: 66-69.
- FELICIANO A.J., GUBLER W.D. (2001) – *Histological investigations on infection of grape roots and shoots by Phaeoacremonium spp.* *Phytopathologia Mediterranea*, 40: S387-S393.
- FERREIRA J.H.S., VAN WYK P.S., CALITZ F.J. (1999) – *Slow dieback of grapevine in South Africa: stress-related predisposition of young vines for infection by Phaeoacremonium chlamydosporum*. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 20: 43-46.
- FISCHER M. (2000) – *Grapevine wood decay, lignicolous basidiomycetes*. *Phytopathologia Mediterranea*, 39: 100-106.
- FISCHER M. (2001) – *Diversity of basidiomycetous fungi associated with esca diseased vines*. *Phytopathologia Mediterranea*, 40: S480.
- FISCHER M. (2002) – *A new wood-decaying basidiomycete species associated with esca of grapevine: Fomitiporia mediterranea (Hymenochaetales)*. *Mycological Progress*, 1: 315-324.
- FISCHER M. (2006) – *Biodiversity and geographic distribution of basidiomycetes causing esca-associated white rots in grapevine: a world wide perspective*. *Phytopathologia Mediterranea*, 45: S30-S42.
- FISCHER M. (2007) – *Fomitiporia polymorpha is a recently detected white rot basidiomycete on North American grapevine*. *Phytopathologia Mediterranea*, 46: 104.
- FISCHER M., EDWARDS J., CUNNINGTON J.H., PASCOE I.G. (2005) – *Basidiomycetous pathogens on grapevine: a new species from Australia - Fomitiporia australiensis*. *Mycotaxon*, 92: 85-96.
- FISCHER M., KASSEMAYER H.H. (2003) – *Fungi associated with Esca disease of grapevine in Germany*. *Vitis*, 42: 109-116.
- FOURIE P.H., HALLEEN F. (2002) – *Investigation on the occurrence of Phaeoconiella chlamydospora in canes of rootstocks mother vines*. *Australasian Plant Pathology*, 31: 425-426.
- FOURIE P.H., HALLEEN F. (2004a) – *Occurrence of grapevine trunk disease causing pathogens in rootstock mother plants in South Africa*. *Australasian Plant Pathology*, 33: 313-315.
- FOURIE P.H., HALLEEN F. (2004b) – *Proactive control of Petri disease of grapevine through treatment of propagation material*. *Plant Disease*, 88: 1241-1245.
- FOURIE P.H., HALLEEN F. (2006) – *Chemical and biological protection of grapevine propagation material from trunk disease pathogens*. *European Journal of Plant Pathology*, 16: 255-265.
- FOURIE P.H., HALLEEN F., VAN DER VYVER J., SCHREUDER W. (2001) – *Effect of Trichoderma treatments on the occurrence of decline pathogens in the roots and rootstocks of nursery grapevines*. *Phytopathologia Mediterranea*, 40: S473-S478.
- FOURIE P.H., HALLEEN F., VOLKMAN A.S. (2000) – *Fungi associated with grape wood, root and trunk diseases: a summary of the 1999-2000 results from the diagnostic service at Nietvoorbij*. *Proceedings 2<sup>nd</sup> International Viticulture and Enology Congress [Cape Town (South Africa), 2000 November 8-10]*, p. 11.
- FRAUSIN C., SPESSOTTO C. (1996) – *Verifica dell'efficacia di trattamenti chimici associati alla capitozzatura nel contenimento del mal dell'esca*. *Atti Giornate Fitopatologiche*, 2: 389-396.
- FUSSLER L., KOBES N., BERTRAND F., MAUMY M., GROSMAN J., SAVARY S. (2008) – *A characterization of grapevine trunk diseases in France from data generated by the National Grapevine Wood Diseases Survey*. *Phytopathology*, 98: 571-579.
- GAFORIO L., PASTOR S., RIDONDO C., TELLO M.L. (2005) – *Phaeoconiella chlamydospora: infection ability and survival in soil*. *Phytopathologia Mediterranea*, 44: 104.
- GAFORIO L., TELLO M.L. (2007) – *Semiselective media for isolation of Phaeoconiella chlamydospora from vine and soil samples*. *Phytopathologia Mediterranea*, 46: 108.
- GARCÍA-FIGUERES A.F., BRACAMONTE L., LUQUE J., RAPOSO R. (2006) – *A survey of trunk disease pathogens within rootstocks of grapevines in Spain*. *European Journal of Plant Pathology*, 115: 195-202.

- GATICA M., CÉSARI C., MAGNIN S., DUPONT J. (2001) – *Phaeoacremonium species and Phaeo-  
monielli chlamydospora in vines showing “hoja de malvón” and young vine decline symptoms in  
Argentina*. *Phytopathologia Mediterranea*, 40: S317-S324.
- GEOFFRION R. (1971) – *L'esca de la vigne dans les vignobles de l'Ouest*. *Phytoma-Défense des cultu-  
res*, 225, 2: 21-31.
- GEOFFRION R. (1979) – *L'esca de la vigne*. *Phytoma-Défense des cultures*, 304, 1: 9-10.
- GEOFFRION R. (1982) – *L'esca de la vigne*. *Phytoma-Défense des cultures*, 335, 2: 25-26.
- GIMÉNEZ-JAIME A., AROCA A., RAPOSO R., GARCÍA-JIMÉNEZ J., ARMENGOL J. (2006) – *Occurren-  
ce of fungal pathogens associated with grapevine nurseries and the decline of young vines in Spain*.  
*Journal of Phytopathology*, 154: 598-602.
- GRAMAJE D., ARMENGOL J., SALAZAR D., LÓPEZ-CORTÉS I., GARCÍA-JIMÉNEZ J. (2009) – *Effect of  
hot-water treatments above 50°C on grapevine viability and survival of Petri disease pathogens*. *Crop  
Protection*, 28: 280-285.
- GRAMAJE D., ALANIZ S., PÉREZ-SIERRA A., ABAD-CAMPOS P., GARCÍA-JIMÉNEZ J., ARMENGOL J.  
(2007) – *First report of Phaeoacremonium mortioniae causing Petri disease of grapevine in Spain*.  
*Plant Disease*, 91: 1206.
- GRAMAJE D., GARCÍA-JIMÉNEZ J., ARMENGOL J. (2008) – *Sensitivity of Petri disease pathogens to hot-  
water treatments in vitro*. *Annals of Applied Biology*, 153: 95-103.
- GRANATA G., RIVA M. (1980) – *Prove di lotta contro il mal dell'esca su viti cv. Italia*. In: *Atti Giornate  
Fitopatologiche* [Siusi (BZ), 22-24 gennaio 1980], vol. 2, pp. 595-601.
- GRANITI A. (1960) – *Il “mal dell'esca” della vite in Puglia*. *Italia Agricola*, 97: 543-550.
- GRANITI A. (2006) – *From ‘fire esca’ to ‘esca of grapevine’*. *Phytopathologia Mediterranea*, 45: S5-S11.
- GRANITI A., SPARAPANO L., BRUNO G. (2001) – *Alcuni progressi degli studi sulla patogenesi del “mal  
dell'esca” e delle “venature brune del legno” della vite*. *Informatore Fitopatologico*, 51: 13-21.
- GRANITI A., SURICO G., MUGNAI L. (1999) – *Considerazioni sul mal dell'Esca e sulle venature brune  
del legno della vite*. *Informatore Fitopatologico*, 46: 6-12.
- GRANITI A., SURICO G., MUGNAI L. (2000) – *Esca of grapevine: a disease complex or a complex of  
diseases?* *Phytopathologia Mediterranea*, 39: 16-20.
- GRASSO S. (1969) – *Il “mal dell'esca” della vite (Phellinus ignarius Patouillard) in Sicilia*. *Tecnica  
Agricola*, 21: 204-212.
- GROENEWALD M., BELLSTEDT D.U., CROUS P.W. (2000a) – *A PCR-based method for the detection of  
Phaeoacremonium chlamydospora in grapevines*. *South African Journal of Science*, 96: 43-46.
- GROENEWALD M., DENMAN M., CROUS P.W. (2000b) – *Fungicide sensitivity of Phaeoacremonium  
chlamydospora, the causal organism of Petri grapevine decline*. *South African Journal of Enology  
and Viticulture*, 21: 59-61.
- GROENEWALD M., KANG J.C., CROUS P.W., GAMS W. (2001) – *ITS and  $\beta$ -tubulin phylogeny of Pha-  
eoacremonium and Phaeoacremonium species*. *Mycological Research*, 105: 651-657.
- GUBLER W.D., ESKALEN A., ROONEY-LATHAM S. (2004b) – *Occurrence of esca in California vineyards and  
association with environmental conditions*. *Phytopathologia Mediterranea*, 43: 153-154.
- GUBLER W.D., ROLSHAUSEN P.E., TROUILLASE F.P., ÚRBEZ-TORRES J.R., VOEGEL T., LEAVITT  
G.M., WEBER E.A. (2005) – *Grapevine trunk diseases in California*. *Practical Winery & Wine-  
yards*. January/February 2005: 1-9.
- GUBLER W.D., SCHECK H., VASQUEZ S.J. (1998) – *Young grapevine decline caused by Phaeoacremonium  
spp. and Cylindrocarpus spp. in California*. 7<sup>th</sup> International Congress of Plant Pathology  
[Edinburgh (UK), 9-16 August 1998], vol. 3, Theme 3.7.61.
- GUBLER W.D., THIND T.S., FELICIANO A.J., ESKALEN A. (2004c) – *Pathogenicity of Phaeoacremonium  
aleophilum and Phaeoacremonium chlamydospora on grape berries in California*. *Phytopa-  
thologia Mediterranea*, 43: 70-74.
- GUCCI R., CARUSO G., BERTOLLA C., SCALABRELLI G., ANDREINI L., VITI R. (2008) – *Il com-  
portamento fisiologico di viti di “Sangiovese” affette dal mal dell'Esca*. Abstracts, Terzo Simposio  
Internazionale sul Sangiovese. Modelli di terroir per vini d'eccellenza [Firenze (Italy), 3-5  
dicembre 2008], p. 76 (abstract).
- GUCCI R., CARUSO G., BERTOLLA C., SCALABRELLI G., ANDREINI L., VITI R. (2009) – *Gas exchan-  
ge, stem water potential and xylem flux of grapevines affected by Esca disease*. *Phytopathologia  
Mediterranea*, Vol. 48, (1): 173-174.
- HALLEEN F., CROUS P.W., PETRINI O. (2003) – *Fungi associated with healthy grapevine cuttings in  
nurseries, with special reference to pathogens involved in the decline of young vines*. *Australasian Plant  
Pathology*, 32: 47-52.
- HALLEEN F., MOSTERT L., CROUS P.W. (2007b) – *Pathogenicity testing of lesser-known vascular fungi  
of grapevines*. *Australasian Plant Pathology*, 36: 277-285.
- HEWITT W.B. (1957) – *Some manifestations of black measles of grapevines*. *Phytopathology*, 47: 16.
- JAMAUX-DESPREAUX I., PÉROS J.P. (2003) – *Genetic structure in populations of the fungus Fomitiporia  
punctata associated with the esca syndrome in grapevine*. *Vitis*, 42: 43-51.
- JASPERS M.V. (2001) – *Effect of fungicides, in vitro, on germination and growth of Phaeoacremonium  
chlamydospora*. *Phytopathologia Mediterranea*, 40: S453-S458.
- KHAN A.C., WHITING C., ROONEY S., GUBLER W.D. (1999) – *Pathogenicity of three species of Pha-  
eoacremonium spp. on grapevine in California*. *Phytopathologia Mediterranea*, 39: 92-99.
- KÖKLÜ G. (2000) – *Notes on esca disease on some grapevine varieties grown in Turkish Thrace*. *Phytopa-  
thologia Mediterranea*, 39: 38-40.
- KRÓL E. (2006) – *Fungi inhabiting decaying grapevine (Vitis spp.) cuttings*. *Journal of Plant Protec-  
tion Research*, 46: 353-358.
- LANDI L., MUROLO S., ROMANAZZI G. (2009) – *Investigations on grapevine wood colonization using  
synthetic green fluorescent protein (sGFP) tagged Phaeoacremonium chlamydospora*. *Phytopathologia  
Mediterranea*, 48: 161 (abstract).
- LANDI L., ROMANAZZI G. (2006) – *Transformation of Phaeoacremonium chlamydospora with the syn-  
thetic green fluorescent protein (sGFP) gene*. *Journal of Plant Pathology*, 88: S47.
- LARIGNON P. (1991) – *Contribution à l'identification et au mode d'action des champignons associés au syndrome  
de l'esca de la vigne*. Thèse de Doctorat, Université de Bordeaux II, UFR de Sciences, Bordeaux (F).
- LARIGNON P. (1999a) – *Esca disease from a European perspective*. In: MORTON L. (ed.), *Black goo:  
symptoms and occurrence of grape declines*. IAS/ICGTD Proceedings 1998 [Virginia, USA]. Inter-  
national Ampelography Society, pp. 43-55.
- LARIGNON P. (1999b) – *Preliminary results on the biology of Phaeoacremonium*. In: MORTON L. (ed.),  
*Black goo: symptoms and occurrence of grape declines*. IAS/ICGTD Proceedings 1998 [Virginia,  
USA]. International Ampelography Society, pp. 49-55.
- LARIGNON P. (2004) – *Réflexion sur l'Esca. Ce que l'on sait déjà montre qu'il en reste beaucoup à  
apprendre*. *Phytoma. La Défense des Végétaux*, 576: 28-31.
- LARIGNON P., BERUD F., GIRARDON K. (2006) – *Maladies du bois de la vigne: et les pépinières?*  
*Phytoma. La Défense des Végétaux*, 592: 14-17.
- LARIGNON P., DUBOS B. (1987) – *Les séquences parasitaires impliquées dans le syndrome de l'esca*.  
Symposium sur la lutte intégrée en viticulture [Logroño (Spain), 3-5 Mars 1987].
- LARIGNON P., DUBOS B. (1993) – *La forme lente de l'esca*. Proceedings OILB Meeting [Bordeaux  
(France), 2-5 mars 1993].
- LARIGNON P., DUBOS B. (1997) – *Fungi associated with Esca disease in grapevine*. *European Journal  
of Phytopathology*, 103: 147-157.
- LARIGNON P., DUBOS B. (2000) – *Preliminary studies on the biology of Phaeoacremonium*. *Phytopa-  
thologia Mediterranea*, 39: 184-189.



- LAUKART N., EDWARDS J., PASCOE I.G., NGUYEN N.K. (2001) – *Curative treatments trialed on young grapevines infected with Phaeoconiella chlamydospora*. *Phytopathologia Mediterranea*, 40: S459-S463.
- LECOMTE P., LOUVET G., VACHER B., GUILBAUD P. (2006b) – *Survival of fungi associated with grapevine decline in pruned wood after composting*. *Phytopathologia Mediterranea*, 45: S127-S130.
- LETOUSEY P., BAILLIEU F., BOULAY M., CLÉMENT C., FONTAINE F. (2009) – *Alteration of photosynthesis and activation of defense in grapevine before severe Esca expression*. *Phytopathologia Mediterranea*, 48: 168 (abstract).
- LOSKILL B., ROSSWOG K., KAPPES E., BERKELMAN-LOEHNERTZ B. (2006) – *Investigations on the control of Esca disease by means of stem injection*. *Bulletin OILB/SROP*, 29, 11: 119-122.
- MAINARDI G. (2000) – *La recrudescenza del mal dell'Esca*. *Il Corriere Vinicolo*, 4: 13.
- MARCHI G. (2001) – *Susceptibility to esca of various grapevine (Vitis vinifera) cultivars grafted on different rootstocks in a vineyard in the province of Siena (Italy)*. *Phytopathologia Mediterranea*, 40: 27-36.
- MARCHI G., PEDUTO F., MUGNAI L., DI MARCO S., CALZARANO F., SURICO G. (2006) – *Some observations on the relationship of manifest and hidden esca to rainfall*. *Phytopathologia Mediterranea*, 45: S117-S126.
- MARCHI G., ROBERTI S., D'OVIDIO R., MUGNAI L., SURICO G. (2001) – *Pectic enzymes production by Phaeoconiella chlamydospora*. *Phytopathologia Mediterranea*, 40: S407-S416.
- MARTIN M.T., COBOS R. (2007) – *Identification of fungi associated with grapevine decline in Castilla y León (Spain)*. *Phytopathologia Mediterranea*, 46: 18-25.
- MATERAZZI A., NUNZI-CONTI G., PICONE M., TRIOLO E. (1993) – *Influenza di combinazioni di innesto sulla diffusione del "mal dell'Esca" della vite*. Atti della giornata di studio su "La ricerca sperimentale in corso per la viticoltura in Toscana" [San Felice, Castelnuovo Berardenga (SI), 27 maggio 1993], pp. 221-223.
- MAZZULLO A., DI MARCO S., OSTI F., CESARI A. (2000) – *Bioassays on the activity of resveratrol, pterostilbene and phosphorous acid towards fungi associated with esca of grapevine*. *Phytopathologia Mediterranea*, 39: 1-9.
- MCLEOD A., FOURIE P.H., RETIEF E. (2006) – *Potential inoculum sources of Phaeoconiella chlamydospora in South African grapevine nurseries*. *European Journal of Plant Pathology*, 115: 331-339.
- MICHELON L., PELLEGRINI C., PERTOT I. (2007) – *Il mal dell'esca della vite. Safe Crop (Produzione integrata)*. Istituto Agrario di San Michele all'Adige, San Michele all'Adige (TN).
- MINERVINI G., BISIACH M. (1988) – *Il deperimento della vite. Sintomatologia e indagine sui complessi fungini associati*. *Notiziario sulle Malattie delle Piante*, 109: 19-27.
- MINERVINI G., BISIACH M. (1995) – *Presenza di Eutipiosi ed esca nei vigneti del Veneto e della Lombardia*. *Vigne e Vini, Suppl. vol. 2, 4: 19-26*.
- MINERVINI G., BISIACH M., SANCASSANI G.P. (1996a) – *Diffusione ed andamento epidemico di eutipiosi ed esca nei vigneti della Lombardia e del Veneto*. *Atti Giornate Fitopatologiche*, 2: 381-388.
- MINERVINI G., MUGNAI L., CONTESINI A.M., BISIACH M., SURICO G., GRANITI A. (1996b) – *Il "mal dell'Esca" della vite, diffusione e gravità in Italia*. Atti Convegno nazionale "Arsenico, sì-no" [Villa Manin di Passariano, Codroipo (UD), 14 dicembre 1995], pp. 107-113.
- MONDELLO V., CONIGLIARO G., ALFONZO A., FERRARO V., TORTA L., BURRUANO S. (2008) – *Preliminary studies on "esca" disease in sicilian vineyards*. *IOBC/wprs Bulletin*, 36: 181-187.
- MORETTI G., GARDIMAN M., LOVAT L. (2005) – *Moltiplicazione per innesto di marze e talee di vite affette dal mal dell'esca*. *Informatore Fitopatologico*, 55: 52-57.
- MORTON L. (1995) – *Mystery diseases hit young vines*. *Wines and Vines*, 76: 46-47.
- MORTON L. (1997) – *Update on Black goo*. *Wines & Vines*, 78: 62-64.
- MORTON L. (2000) – *Viticulture and grapevine declines: lessons of black goo*. *Phytopathologia Mediterranea*, 39: 59-67.
- MORTON L. (2001) – *L'impatto del "black goo" sul futuro del vigneto*. *Informatore Fitopatologico*, 5: 32-36.
- MOSTERT L., ABELN E.C.A., HALLEEN F., CROUS P.W. (2006a) – *Genetic diversity among isolates of Phaeoconiella chlamydospora on grapevines*. *Australasian Plant Pathology*, 35: 453-460.
- MOSTERT L., CROUS P.W., GROENEWALD J.Z., GAMS W., SUMMERBELL R. (2003) – *Togninia (Calosphaeriales) is confirmed as teleomorph of Phaeoacremonium by means of morphology, sexual compatibility, and DNA phylogeny*. *Mycologia*, 95: 646-659.
- MOSTERT L., GROENEWALD J.Z., GAMS W., SUMMERBELL R., CROUS P.W. (2006b) – *Taxonomy and pathology of Togninia (Diaporthales) and its Phaeoacremonium anamorphs*. *Studies in Mycology*, 54: 1-113.
- MOSTERT L., GROENEWALD J.Z., SUMMERBELL R.C., ROBERT V., SUTTON D.A., PADHYE A.A., CROUS P.W. (2005) – *Species of Phaeoacremonium associated with infections in humans and environmental reservoirs in infected woody plants*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 1752-1767.
- MOSTERT L., HALLEEN F., FOURIE P., CROUS P.W. (2006c) – *A review of Phaeoacremonium species involved in Petri disease and esca of grapevines*. *Phytopathologia Mediterranea*, 45: S12-S29.
- MUGNAI L., BERTELLI E., SURICO G. (1998) – *Il mal dell'Esca in piante "giovani" e "adulte" di vite: contributi alla conoscenza della malattia e delle sue cause*. In: PARRINI C. (ed.), *Il mal dell'Esca nella viticoltura toscana*, ARSIA-Regione Toscana, Firenze, pp. 24-30.
- MUGNAI L., BERTELLI E., SURICO G., BRUNO E. (1997a) – *Effetto di alcune sostanze fenoliche sulla crescita di funghi del legno di viti colpite dal "mal dell'esca"*. *Petria*, 11: 35-46.
- MUGNAI L., BERTELLI E., SURICO G., ESPOSITO A. (1997b) – *Observations on the aetiology of "esca" disease of grapevine in Italy*. *Proceeding 10th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union [Montpellier (France), 1-5 June 1997]*, pp. 269-272.
- MUGNAI L., CONTESINI A.M., SURICO G., GRANITI A., IMBRIANI R., BIANCO N. (1996a) – *Recenti progressi nella conoscenza del mal dell'Esca della vite in Italia*. Atti Convegno nazionale "Arsenico sì-no" [Villa Manin di Passariano, Codroipo (UD), 14 dicembre 1995], pp. 115-122.
- MUGNAI L., DI MARCO S. (2006) – *Control of esca of grapevine in Italy: what we can learn from past experience in view of an integrated management approach*. *Bulletin OILB/SROP*, 29, 11: 113-117.
- MUGNAI L., GRANITI A., SURICO G. (1999) – *Esca (Black Measles) and brown wood-streaking: two old and elusive diseases of grapevines*. *Plant Disease*, 83: 404-418.
- MUGNAI L., IMBRIANI R., SURICO G. (1996b) – *Indagine sulla diffusione e gravità del "mal dell'Esca" in alcuni vigneti della Toscana*. *Informatore Fitopatologico*, 46: 50-56.
- MUGNAI L., SURICO G., ESPOSITO A. (1996c) – *Microflora associata al mal dell'Esca della vite in Toscana*. *Informatore Fitopatologico*, 46: 49-55.
- MUGNAI L., SURICO G., SPALANGA A. (1997c) – *Produzione di enzimi esocellulari da parte di funghi del legno di viti colpite dal "mal dell'Esca"*. *Micologia Italiana*, 26: 11-22.
- NASCIMENTO T., REGO C., OLIVEIRA H. (2007) – *Potential use of chitosan in the control of grapevine trunk diseases*. *Phytopathologia Mediterranea*, 46: 218-224.
- NIEDER G. (1991) – *Esca-eine Pilzkrankheit des Holzes der Rebe*. *Der Winzer*, 47: 24-28.
- OSTI F., DI MARCO S. (2003) – *Il mal dell'esca è ancora un'emergenza nei vigneti*. *Agricoltura*, 6: 68-69.
- OSTI F., DI MARCO S. (2005) – *Il mal dell'esca della vite, tra passato, presente e futuro*. *Agronomica*, 6: 27-37.
- OVERTON B.E., STEWART E.L., QU X., WENNER N.G., CHRIST B.J. (2004) – *Qualitative real-time PCR SYBR<sup>®</sup>Green detection of Petri disease fungi*. *Phytopathologia Mediterranea*, 43: 403-410.
- OVERTON B.E., STEWART E.L., WENNER N.G. (2005) – *Molecular phylogenetics of grapevine decline fungi from Pennsylvania and New York*. *Proceedings 4th International Workshop on Grapevine Trunk Diseases [Stellenbosch (South Africa), 2005 January 20-21]*, p. 27.
- OVERTON B.E., STEWART E.L., WENNER N.G. (2006) – *Manganese oxidation in Petri disease fungi as a novel taxonomic character*. *Phytopathologia Mediterranea*, 45: S131-S134.

- PASCOE I.G. (1998) – *Trunk diseases of grapevines - perspectives from a tour of California*. Australian Grapegrower Winemaker, 417: 68-71.
- PASCOE I.G. (1999) – *Grapevine trunk diseases in Australia: diagnostic and taxonomy*. In: MORTON L. (ed.), *Black goo-occurrence and symptom of grapevine declines*. IAS/ICGTD Proceedings 1998, International Ampelography Society, pp. 56-57.
- PASCOE I.G., COTTRAL E. (2000) – *Developments in grapevine trunk diseases research in Australia*. Phytopathologia Mediterranea, 39: 68-75.
- PASCOE I.G., EDWARDS J. (2000) – *Esca or not?* The Austral. Grape Grower and Winemaker, 439: 14.
- PASCOE I.G., EDWARDS J., CUNNINGTON J.H., COTTRAL E.H. (2004) – *Detection of the Togninia teleomorph of Phaeoacremonium aleophilum in Australia*. Phytopathologia Mediterranea, 43: 51-58.
- PAYAN J.J. (1987) – *Une maladie a ne pas négliger: l'esca*. Phytoma-Défense des cultures, 11, 392: 30-31.
- PELLEGRINI C., PERTOT I., MICHELON L. (2006) – *Esca disease: spore trapping, symptom evolution and incidence in Trentino Region, Italy*. Bulletin OILB/SROP, 29, 11: 127-130.
- PÉREZ MARÍN J.L., SOLER CAMPELLO J., GARCÍA DEL MORAL PONZALO E. (1996) – *Ensayo de eficacia del producto ciproconazol contra la yesca de la vid (Stereum hirsutum Pers., Phellinus ignarius Fr.)*.
- PÉROS J-P., BERGER G., JAMAUX-DESPREAUX I. (2008) – *Symptoms, wood lesions and fungi associated with esca in organic vineyards in Languedoc-Roussillon (France)*. Journal of Phytopathology, 156: 297-303.
- PÉROS J.P., JAMAUX-DESPREAUX I., BERGER G. (2000) – *Population genetics of fungi associated with esca disease in French vineyards*. Phytopathologia Mediterranea, 39: 150-155.
- PERRIN-CHERIOUX S., ABOU-MANSOUR E., TABACCHI R. (2004) – *Synthesis and activity of grape wood phytotoxins and related compounds*. Phytopathologia Mediterranea, 43: 83-86.
- PETIT A.N., VAILLANT N., BOULAY M., CLÉMENT C., FONTAINE F. (2006) – *Alteration of photosynthesis in grapevines affected by esca*. Phytopathologia, 96: 1060-1066.
- POLLASTRO S., ABBATECOLA A., DONGIOVANNI C., FARETRA F. (2000a) – *Usage of molecular markers (PCR-RAPD) for studying genetic variability in Phellinus (Fomitiporia) sp.* Phytopathologia Mediterranea, 39: 107-111.
- POLLASTRO S., DONGIOVANNI C., ABBATECOLA A., DE GUIDO M.A., DE MICCOLIS ANGELINI R.M., NATALE P., FARETRA F. (2001) – *Specific SCAR primers for fungi associated with wood decay of grapevine*. Phytopathologia Mediterranea, 40: S362-S368.
- POLLASTRO S., DONGIOVANNI C., ABBATECOLA A., DE MICCOLIS ANGELINI R.M., NATALE P., FARETRA F. (1999) – *Il mal dell'Esca della vite ad uva da tavola in Puglia*. L'Informatore Agrario, 55, Suppl. 50: 33-36.
- POLLASTRO S., DONGIOVANNI C., ABBATECOLA A., FARETRA F. (2000b) – *Observations on the fungi associated with esca and on spatial distribution of esca-symptomatic plants in Apulian (Italy) vineyards*. Phytopathologia Mediterranea, 39: 206-210.
- POLLASTRO S., HABIB W., PICHIERRI A., MASIELLO N., FARETRA F. (2009) – *Potential sources of Phaeoacremonium chlamydospora inoculums in grapevine nurseries in southern Italy*. Phytopathologia Mediterranea, 48: 174 (abstract).
- POLLASTRO S., PICHIERRI A., HABIB W., MASIELLO N., SEBAALY C., FARETRA F. (2007) – *Critical points for Phaeoacremonium chlamydospora infections of propagation materials in grapevine nursery*. Journal of Plant Pathology, 89, Suppl. 3: 55.
- PORTER M. (1999) – *Guerrilla research in the North Coast region of California*. In: MORTON L. (ed.), *Black goo-Occurrence and Symptoms of grapevine declines*. IAS/ICGTD Proceedings 1998, International Ampelography Society, pp. 1-14.
- QUAGLIA M., COVARELLI L., ZAZZERINI A. (2009) – *Epidemiological surveys on esca disease in Umbria, central Italy*. Phytopathologia Mediterranea, 48: 84-91
- RAPOSO R., AROCA A. (2007) – *PCR-based strategy to detect and identify species of Phaeoacremonium causing grapevine diseases*. Applied and environmental microbiology, 73: 2911-2918.
- RAVAZ L. (1898) – *Sur le folletage*. Revue de Viticulture, 10: 184-186.
- RAVAZ L. (1909) – *Sur l'apoplexie de la vigne*. Progrès agricole et viticole, 52: 547-579.
- REDONDO C., TELLO M.L., AVILA A., MATEO-SAGASTA E. (2001) – *Spatial distribution of symptomatic grapevines with esca disease in the Madrid region (Spain)*. Phytopathologia Mediterranea, 40: S439-S442.
- REGO C., OLIVEIRA H., CARVALHO A., PHILLIPS A. (2000) – *Involvement of Phaeoacremonium spp. and Cylandrocarpon destructans with grapevine decline in Portugal*. Phytopathologia Mediterranea, 39: 76-79.
- REISENZEIN H. (1996) – *Esca-bedeutungslos oder die Gefahr im Hintergrund?* Der Winzer, 52: 9-16.
- REISENZEIN H., BERGER N., NIEDER G. (2000) – *Esca in Austria*. Phytopathologia Mediterranea, 39: 26-34.
- RETIÉF E., DAMM U., VAN NIEKERK J.M., MCLEOD A., FOURIE P.H. (2005) – *A protocol for molecular detection of Phaeoacremonium chlamydospora in grapevine wood*. South African Journal of Science, 101: 139-142.
- RETIÉF E., MCLEOD A., FOURIE P.H. (2006) – *Potential inoculum sources of Phaeoacremonium chlamydospora in South African grapevine nurseries*. European Journal of Plant Pathology, 115: 331-339.
- RIDGWAY H., SLEIGHT B.E., STEWART A. (2002) – *Molecular evidence for the presence of Phaeoacremonium chlamydospora in New Zealand nurseries, and its detection in rootstock mother vines using species-specific PCR*. Australasian Plant Pathology, 31: 267-271.
- RIDGWAY H.J., STEYAERT J.M., POTTINGER B.M., CARPENTER M., NICOL D., STEWART A. (2005) – *Development of an isolate-specific marker for tracking Phaeoacremonium chlamydospora infection in grapevines*. Mycologia, 97: 1093-1101.
- ROMANAZZI G., MUROLO S., PIZZICHINI L., NARDI S. (2006) – *Grapevine esca disease in Marche region: first results*. Atti Giornate Fitopatologiche, 2: 289-290.
- ROMANAZZI G., MUROLO S., PIZZICHINI L., NARDI S. (2009) – *Esca in young and mature vineyards, and molecular diagnosis of the associated fungi*. European Journal of Plant Pathology, 125: 277-290.
- ROMANAZZI G., MUROLO S., TRAMONTANO A., PIZZICHINI L., NARDI S. (2009) – *Esca disease in young and mature vineyards in Marche, central-eastern Italy, and molecular detection of some associated fungi*. Phytopathologia Mediterranea, 48: 165-166 (abstract).
- ROONEY S.N. (2002) – *Detection, control of Phaeoacremonium chlamydospora and Phaeoacremonium species, causal agents of Petri disease of grapevines*. Master Thesis, University of California, Davis, CA-USA.
- ROONEY S.N., ESKALEN A., GUBLER W.D. (2001) – *Recovery of Phaeoacremonium chlamydospora and Phaeoacremonium inflatipes from soil and grapevine tissues*. Phytopathologia Mediterranea, 40: S351-S356.
- ROONEY S.N., GUBLER W.D. (2001) – *Effect of hot water treatments on eradication of Phaeoacremonium chlamydospora and Phaeoacremonium inflatipes from dormant grapevine wood*. Phytopathologia Mediterranea, 40: S467-S472.
- ROONEY-LATHAM S., ESKALEN A., GUBLER W.D. (2005a) – *Teleomorph formation of Phaeoacremonium aleophilum, cause of esca and grapevine decline in California*. Plant Disease, 89: 177-184.
- ROONEY-LATHAM S., ESKALEN A., GUBLER W.D. (2005b) – *Occurrence of Togninia minima perithecia in esca-affected vineyards in California*. Plant Disease, 89: 867-871.
- ROONEY-LATHAM S., ESKALEN A., GUBLER W.D. (2005c) – *Occurrence of Togninia fraxinopen-sylvanica on esca-diseased grapevines (Vitis vinifera) and declining ash trees (Fraxinus latifolia) in California*. Plant Disease, 89: 528.
- ROSSI R. (2000) – *Vigneti, cercasi terapia contro il mal dell'Esca*. Agrimese, 4: 28-30.
- RUI D. (1971) – *Il "mal dell'esca" della vite*. L'Informatore Agrario, 26: 5785-5788.

- RUI D., BATTEL C. (1962) – *Messa a punto di un nuovo mezzo di lotta contro il “Mal dell’Esca”*. Notiziario sulle Malattie delle Piante, 62-63: 9-15.
- RUMBOS I., RUMBOU A. (2001) – *Fungi associated with esca and young grapevine decline in Greece*. Phytopathologia Mediterranea, 40: S330-S335.
- SÁNCHEZ-TORRES P., HINAREJOS R., GONZÁLEZ V., TUSET BARRANCHINA J.J. (2008) – *Identification and characterization of fungi associated with esca in vineyards of the Comunidad Valenciana (Spain)*. Spanish Journal of Agricultural Research, 6: 659-660.
- SANTOS C., FRAGOIRO S., OLIVEIRA H., PHILLIPS A. (2006a) – *Response of Vitis vinifera L. plants inoculated with Phaeoacremonium angustius and Phaeomoniella chlamydospora to thiabendazole, resveratrol and sodium arsenite*. Scientia Horticulturae, 107: 131-136.
- SANTOS C., FRAGOIRO S., PHILLIPS A. (2005) – *Physiological response of grapevine cultivars and a rootstock to infection with Phaeoacremonium and Phaeomoniella isolates: an in vitro approach using plants and calluses*. Scientia Horticulturae, 103: 187-198.
- SANTOS C., FRAGOIRO S., VALENTIM H., PHILLIPS A. (2006b) – *Phenotypic characterisation of Phaeoacremonium and Phaeomoniella strains isolated from grapevines: enzyme production and virulence of extra-cellular filtrate on grapevine calluses*. Scientia Horticulturae, 107: 123-130.
- SCALABRELLI G. (2009) – *Come opere d’arte*. Speciale Lunga vita al vigneto, VQ, 8: 39-43.
- SCALABRELLI G. (2009) – *Prevenire l’Esca in vigneto*. VQ, 11: 22-27.
- SCALABRELLI G., FERRONI G., ANDREINI L. (2008) – *Caratteristiche qualitative sensoriali delle uve di “Sangiovese” affette da mal dell’Esca*. Abstracts, Terzo Simposio Internazionale sul Sangiovese. Modelli di terroir per vini d’eccellenza [Firenze (Italy), 3-5 dicembre 2008], p. 96 (abstract).
- SCALABRELLI G., D’ONOFRIO C., FERRONI F., FELICOLI A. (2005) – *Agronomical approach to reduce Esca disease spread in the vineyard*. Abstract, 4<sup>th</sup> International Workshop on Grapevine Trunk Diseases [Stellenbosch (South Africa), 2005 January 20-21], p. 88.
- SCALABRELLI G., VITI R., ANDREINI L. (2009) – *Evolution of Esca symptoms on different combinations between grapevine varieties and rootstocks*. Phytopathologia Mediterranea, Vol. 48 (1): 178-179.
- SCHECK H.J., VASQUEZ S.J., FOGLE D., GUBLER W.D. (1998a) – *Grape growers report losses to black-foot and grapevine decline*. California Agriculture, 52: 19-23.
- SCHECK H.J., VASQUEZ S.J., GUBLER W.D. (1998b) – *First report of three Phaeoacremonium spp. causing young grapevine decline in California*. Plant Disease, 82: 590.
- SCHILIRÒ E., SIDOTI A., BUONOCORE E., DI NATALE A., ZAFFUTTO G. (1996) – *Incidenza del mal dell’Esca della vite nella Sicilia centro-orientale*. Tecnica Agricola, 2-3: 71-79.
- SERRA S. (1999) – *Relazione tra sintomatologia fogliare, alterazioni e microflora del legno in viti affette da mal dell’esca ed entipiosi*. L’Informatore Fitopatologico, 49: 30-34.
- SERRA S., BORGO M., ZANZOTTO A. (2000) – *Investigation into the presence of fungi associated with esca of young vines*. Phytopathologia Mediterranea, 39: 21-25.
- SERRA S., MANNONI A., LIGIOS V. (2007) – *Preliminary studies on the susceptibility of pruning wounds to contamination with fungi involved in grapevine decline diseases in Italy*. Phytopathologia Mediterranea, 46: 115.
- SERRA S., MANNONI M.A., LIGIOS V. (2009) – *Susceptibility to esca of grapevine cultivars and clones in Italy*. Phytopathologia Mediterranea, 48: 179 (abstract).
- SERRA S., ZANZOTTO A., BORGO M. (1998) – *Espressione di sintomi di mal dell’esca ed entipiosi in alcuni vigneti del Veneto*. Atti Giornate Fitopatologiche: 607-612.
- SIDOTI A., BUONOCORE E., SERGES T., MUGNAI L. (2000) – *Decline of young grapevines associated with Phaeoacremonium chlamydosporum in Sicily (Italy)*. Phytopathologia Mediterranea, 39: 87-91.
- SMETHAM G., ADES P., FORD R. (2008) – *Development of microsatellite markers for the grapevine fungal pathogen Phaeomoniella chlamydospora*. Molecular Ecology Resources, 8: 1052-1054; Phytopathologia Mediterranea, 47: 20-27.
- SOFIA J., GONÇALVES M.T., OLIVEIRA H. (2006) – *Spatial distribution of esca symptomatic plants in Dão vineyards (Centre Portugal) and isolation of associated fungi*. Phytopathologia Mediterranea, 45: S87-S92.
- SOSNOWSKI M., WICKS T., SCOTT E., LARDNER R., EDWARDS J. (2005) – *What’s happening in the world of grapevine trunk diseases? The Australian & New Zealand Grapegrower & Winemaker*, 498: 18-21.
- SPARAPANO L., BRUNO G., CAMPANELLA A. (2001a) – *Interactions between three fungi associated with esca of grapevine, and their secondary metabolites*. Phytopathologia Mediterranea, 40: S417-S422.
- SPARAPANO L., BRUNO G., CICCARONE C., GRANITI A. (2000a) – *Infection of grapevines with some esca-disease associated fungi. I. Fomitiporia punctata as a wood-decay inducer*. Phytopathologia Mediterranea, 39: 46-52.
- SPARAPANO L., BRUNO G., CICCARONE C., GRANITI A. (2000b) – *Infection of grapevines with some esca-disease associated fungi. II. Interaction among Fomitiporia punctata, Phaeoacremonium chlamydosporum and P. aleophilum*. Phytopathologia Mediterranea, 39: 53-58.
- SPARAPANO L., BRUNO G., GRANITI A. (1998a) – *Esopolissaccaridi fitotossici sono prodotti in coltura da due specie di Phaeoacremonium associate al complesso del mal dell’esca della vite*. X Incontro “Aspetti molecolari e fisiologici delle interazioni pianta-patogeno” [Potenza, 24-25 settembre 1998].
- SPARAPANO L., BRUNO G., GRANITI A. (1998b) – *Esopolissaccaridi fitotossici sono prodotti in coltura da due specie di Phaeoacremonium associate al complesso del mal dell’esca*. Petria, 8: 210-212.
- SPARAPANO L., BRUNO G., GRANITI A. (2000c) – *Effects on plants of metabolites produced in culture by Phaeoacremonium chlamydosporum, P. aleophilum and Fomitiporia punctata*. Phytopathologia Mediterranea, 39: 169-177.
- SPARAPANO L., BRUNO G., GRANITI A. (2001b) – *Three-year observation of grapevines cross-inoculated with esca-associated fungi*. Phytopathologia Mediterranea, 40: S376-S386.
- SPARAPANO L., DE LEONARDIS S., CAMPANELLA A., BRUNO G. (2001c) – *Interaction between esca-associated fungi, grapevine calli and micropropagated shoot cultures of grapevine*. Phytopathologia Mediterranea, 40: S423-S428.
- STAMP J.A. (2001) – *The contribution of imperfections in nursery stock to the decline of young vines in California*. Phytopathologia Mediterranea, 40: S369-S375.
- STAMP J.A. (2003) – *Pathogenic status of high quality grapevine nursery stock*. Wine Business Monthly, 10, 2: 30-35.
- STEFANINI F.M., SURICO G., MARCHI G. (2000) – *Longitudinal analysis of symptom expression in grapevines affected by esca*. Phytopathologia Mediterranea, 39: 225-231.
- SURICO G. (1998) – *Stato delle ricerche sul mal dell’esca e prospettive future*. In: PARRINI C. (ed.), *Il mal dell’esca nella viticoltura toscana*, ARSIA-Regione Toscana, Firenze, pp. 49-50.
- SURICO G. (1999a) – *Esca della vite e malattie associate*. Atti del Convegno “Lunga Vita alla Vite” [Alessandria, 9 novembre 1999], pp. 9-12.
- SURICO G. (1999b) – *Un nuovo allarme fitosanitario per i viticoltori: la presenza di funghi del mal dell’Esca nelle barbatelle e deperimento delle giovani piante*. In: Atti Accademia dei Georgofili, Anno 1998, Serie VII, Vol. XLV, pp. 399-409.
- SURICO G. (2000) – *The grapevine and wine production through the ages*. Phytopathologia Mediterranea, 39: 3-10.
- SURICO G. (2001a) – *Focus sul mal dell’Esca: un problema in via di soluzione*. Informatore Fitopatologico, 51: 11-12.
- SURICO G. (2001b) – *Towards commonly agreed answers to some basic questions on esca*. Phytopathologia Mediterranea, 40: S487-S490.
- SURICO G., BANDINELLI R., BRACCINI P., DI MARCO S., MARCHI G., MUGNAI L., PARRINI C. (2004) – *On the factors that may influenced the esca epidemic in the eighties in Tuscany*. Phytopathologia Mediterranea, 43: 136-143.

- SURICO G., BERTELLI E., MUGNAI L. (1998) – *Infezioni di Phaeoacremonium chlamydosporum su barbatelle di vite*. L'Informatore Agrario, 54: 79-82.
- SURICO G., MARCHI G., BRACCINI P., MUGNAI L. (2000a) – *Epidemiology of esca in some vineyards in Tuscany (Italy)*. Phytopathologia Mediterranea, 39: 190-205.
- SURICO G., MARCHI G., FERRANDINO F.J., BRACCINI P., MUGNAI L. (2000b) – *Analysis of the spatial spread of esca in some Tuscan vineyards (Italy)*. Phytopathologia Mediterranea, 39: 211-224.
- SURICO G., MUGNAI L. (2001a) – *Focus sul mal dell'Esca: sulla presenza di venature brune nella vite*. Informatore Fitopatologico, 51: 22-26.
- SURICO G., MUGNAI L. (2001b) – *Eziologia del mal dell'esca*. Notiziario Tecnico n. 63, Atti dei Convegni XXVI MOMEVI, pp. 81-84.
- SURICO G., MUGNAI L., MARCHI G. (2003) – *Il punto sul mal dell'Esca*. Informatore Fitopatologico, 53: 22-27.
- SURICO G., MUGNAI L., MARCHI G. (2006) – *Older and more recent observations on esca, a critical overview*. Phytopathologia Mediterranea, 45: S68-S86.
- SURICO G., MUGNAI L., MARCHI G. (2007) – *Esca e malattia di Petri: significato e potenziali fonti di inoculo nei vivai viticoli*. In: Atti del Convegno Nazionale "Il vivaismo viticolo. Aspetti normativi e fitopatologici di un settore produttivo ad alta specializzazione" [Istituto Agrario di San Michele all'Adige, San Michele all'Adige (TN), 9-10 ottobre 2006], pp. 116-126.
- SVAMPA G., TOSATTI E.M. (1977) – *Prove di lotta contro il "mal dell'esca" della vite*. Informatore Fitopatologico, 12: 21-24.
- TABACCHI R., FKYERAT A., POLIART C., DUBIN G.M. (2000) – *Phytotoxins from fungi of esca of grapevine*. Phytopathologia Mediterranea, 39: 156-161.
- TEGLI S. (2000) – *A hypothesis about the reproductive modes of Phaeoacremonium aleophilum and Phaeoacremonium chlamydospora*. Phytopathologia Mediterranea, 39: 125-133.
- TEGLI S., BERTELLI E., SANTILLI E., SURICO G. (1998) – *Caratterizzazione delle popolazioni di Phaeoacremonium aleophilum e P. chlamydosporum da piante di vite*. Petria, 8: 258-260.
- TEGLI S., BERTELLI E., SURICO G. (2000a) – *Sequence analysis of ITS ribosomal DNA in five Phaeoacremonium species and development of a PCR-based assay for the detection of P. chlamydosporum and P. aleophilum in grapevine tissue*. Phytopathologia Mediterranea, 39: 134-149.
- TEGLI S., SANTILLI E., BERTELLI E., SURICO G. (2000b) – *Genetic variation within Phaeoacremonium aleophilum and P. chlamydosporum in Italy*. Phytopathologia Mediterranea, 39: 125-133.
- THIND T.S., GUBLER W.D. (2009) – *Fruit symptoms of esca (black measles) induced by injecting culture filtrates and spore suspensions of the causal pathogen*. Phytopathologia Mediterranea, 46: 116 (abstract).
- TROCCOLI L., CALAMASSI R., MORI B., MUGNAI L., SURICO G. (2001) – *Phaeoacremonium chlamydospora-grapevine interaction: histochemical reactions to fungal infection*. Phytopathologia Mediterranea, 40: S400-S406.
- VAN NIEKERK J.M., HALLEEN F., FOURIE P.H. (2007) – *Susceptibility of grapevine pruning wounds to trunk pathogen infection in South Africa*. Phytopathologia Mediterranea, 46: 114-115.
- VERCESI A. (1988) – *Osservazioni sulla sensibilità varietale al mal dell'esca della vite*. Vigne e Vini, 4: 55-58.
- VINET E. (1909) – *L'apoplexie de la vigne en Anjou*. Revue de Viticulture, 32: 676-681.
- VITI R., ANDREINI L., SCALABRELLI G. (2009) – *Study on the morphological evolution of bud break in Vitis vinifera L.* Vitis, 48 (4): 153-158.
- WAITE H., MAY P. (2005) – *The effects of hot water treatment, hydratation and order of nursery operations on cuttings of Vitis vinifera cultivars*. Phytopathologia Mediterranea, 44: 144-152.
- WAITE H., MORTON L. (2007) – *Hot water treatment, trunk diseases and other critical factors in the production of high-quality grapevine planting material*. Phytopathologia Mediterranea, 46: 5-17.
- WHITEMAN S.A., JASPERS M.V., STEWART A., RIDGWAY H.J. (2002) – *Detection of Phaeoacremonium chlamydospora in soil using species-specific PCR*. New Zealand Plant Protection, 55: 139-145.
- WHITEMAN S.A., JASPERS M.V., STEWART A., RIDGWAY H.J. (2004) – *Identification of potential sources of Phaeoacremonium chlamydospora in the grapevine propagation processes*. Phytopathologia Mediterranea, 43: 152-153.
- WHITEMAN S.A., STEWART A., RIDGWAY H.J., JASPERS M.V. (2007) – *Infection of rootstock mother vines by Phaeoacremonium chlamydospora results in infected young grapevines*. Australasian Plant Pathology, 36: 198-203.
- WHITING E., CUNHA M., GUBLER W.D. (2005) – *Phaeoacremonium chlamydospora and Phaeoacremonium species distinguished through cultural characters and ribosomal DNA sequence analysis*. Mycotaxon, 92: 351-360.
- WHITING E.C., KHAN A., GUBLER W.D. (2001) – *Effect of temperature and water potential on survival and mycelial growth of Phaeoacremonium chlamydospora and Phaeoacremonium spp.* Plant Disease, 85: 195-201.
- ZANZOTTO A., AUTERIO F., BELLOTTO D., DAL CORTIVO G., LUCCHETTA G., BORGO M. (2007) – *Occurrence of Phaeoacremonium spp. and Phaeoacremonium chlamydospora in grape propagation materials and young grapevines*. European Journal of Plant Pathology, 119: 183-192.
- ZANZOTTO A., GARDIMAN M., LOVAT L. (2008) – *Effect of Phaeoacremonium chlamydospora and Phaeoacremonium sp. on in vitro grapevine plants*. Scientia Horticulturae, 116: 404-408.
- ZANZOTTO A., SERRA S., VIEL W., BORGO M. (2001) – *Investigation into the occurrence of esca-associated fungi in cuttings and bench-grafted vines*. Phytopathologia Mediterranea, 40: S311-S316.

## Bibliografia\*\*

- AA.VV. (1990) – *Methods of community analysis to use in wine sector*. Official Gazette of the European Communities, 3 October 1990. Commission Regulation (EEC), No. 2676/90.
- ABOU-MANSOUR E., GODDARD M.L., MOTTIER N., CHRISTEN D., TABACCHI R. (2007) – *Toxins and secondary metabolites from the fungus Phomopsis spp., a pathogen responsible of vine excoriosis*. *Phytopathologia Mediterranea*, 46: 111.
- ABOUL-SOUD M.A.M., YUN B.W., HARRIER L.A., LOAKE G.J. (2004) – *Transformation of Fusarium oxysporum by particle bombardment and characterisation of the resulting transformants expressing a GFP transgene*. *Mycopathologia*, 158: 475-482.
- AGRIOS G.N. (2005) – *Plant Pathology*. Academic Press, San Diego, CA-USA.
- AHUMADA R. (2003) – *Fungal diseases affecting Eucalyptus plantations in Chile*. MSc Thesis. University of Pretoria, Pretoria, South Africa.
- ALANIZ S., ARMENGOL J., LEON M., GARCÍA-JIMÉNEZ J., ABAD-CAMPOS P. (2009) – *Analysis of genetic and virulence diversity of Cylandrocarpon liriiodendri and C. macrodidymum associated with black foot disease of grapevine*. *Mycological Research*, 113: 16-23.
- ALANIZ S., LEÓN M., VICENT A., GARCÍA-JIMÉNEZ J., ABAD-CAMPOS P., ARMENGOL J. (2007) – *Characterization of Cylandrocarpon species associated with Black Foot Disease of Grapevine in Spain*. *Plant Disease*, 91 (9): 1187-1193.
- ALVES A., CORREIA A., LUQUE J., PHILLIPS A.J.L. (2004) – *Botryosphaeria corticola, sp. nov. on Quercus species, with notes and description of Botryosphaeria stevensii and its anamorph, Diplodia mutila*. *Mycologia*, 96: 598-613.
- ALVES A., PHILLIPS A.J.L., HENRIQUES I., CORREIA A. (2005) – *Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) as a method for the identification of Botryosphaeria species*. *FEMS Microbiology Letters*, 245: 221-229.
- ALVES A., PHILLIPS A.J.L., HENRIQUES I., CORREIA A. (2007) – *Rapid differentiation of species of Botryosphaeriaceae by PCR fingerprinting*. *Research in Microbiology*, 158: 112-121.
- ANDERSON S., BANKIER A.T., BARRELL B.G., DE BRUIJN M.H.L., COULSON A.R., DROUIN J., EPERON I.C., NIERLICH D.P., ROSE B.A., SANGER F., SCHREIER P.H., SMITH A.J.H., STADEN R., YOUNG I.G. (1981) – *Sequence and organization of the human mitochondrial genome*. *Nature*, 290: 457-465.
- ANDRIE R.M., MARTINE J.P., CIUFFETTI L.M. (2005) – *Development of ToxA and ToxB promoter-driven fluorescent protein expression vectors for use in filamentous ascomycetes*. *Mycologia*, 97: 1152-1161.
- APPEL D.J., GORDON T.R. (1996) – *Relationship among pathogenic and non pathogenic isolates of Fusarium oxysporum based on the partial sequence of the intergenic spacer region of the ribosomal DNA*. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 9: 125-138.

\*\* Sono qui elencati tutti i lavori citati che non riguardano direttamente il mal dell'esca della vite e i suoi agenti causali.

- AROCHA A., SAIRAM R.K., SRIVASTAVA G.C. (2002) – *Oxidative stress and antioxidative system in plants*. Current Science, 82: 1227-1238.
- ASAH I., KOJIMA M., KOSUGE T. (1979) – *The energetics of parasitism, pathogenism and resistance in plant disease*. In: HORSEFALL J.G., COWLING E.B. (eds.), *Plant Disease. An advanced treatise*, Vol. IV, Academic Press, New York, NY-USA, pp. 47-74.
- BAE Y.S., KNUDSON G.R. (2000) – *Cotransformation of Trichoderma harzianum with  $\beta$ -glucuronidase and green fluorescent protein genes provides a useful tool for monitoring fungal growth and activity in natural soils*. Applied and Environmental Microbiology, 66: 810.
- BAIS A.J., MURPHY P.J., DRY I.B. (2000) – *The molecular regulation of stilbene phytoalexin biosynthesis in Vitis vinifera during grape berry development*. Australian J. of Plant Physiology, 27: 425-433.
- BAKER D.R., FENYES J.G., STEFFENS J.J. (1997) – *Synthesis and chemistry of agrochemicals. III*. ACS Symposium, Series 504, pp. 395-404.
- BARBOSA A.M., STELUTI R.M., DEKKER R.F.H., CARDOSO M.S., CORRADI DA SILVA M.L. (2003) – *Structural characterization of Botryosphaeran: a (1 $\rightarrow$ 3;1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucan produced by the ascomyceteous fungus, Botryosphaeria sp.* Carbohydrate Research, 338: 1691-1698.
- BARR M.E. (1987) – *Prodomus to the class Loculoascomycetes*. Publ. by the author, Amherst, MA-USA.
- BARTSCH H., OHSHIMA H., PIGNATELLI B., CALMELS S. (1992) – *Endogenously formed N-nitroso compounds and nitrosating agents in human cancer etiology*. Pharmacogenetics, 2: 272-277.
- BAVARESCO L., FREGONI C., CANTÙ E., TREVISAN M. (1999) – *Stilbene compounds: from the grapevine to wine*. Drugs Exptl. Clin. Res., XXV(2/3): 57-63.
- BECKMAN C.H. (1964) – *Host response to vascular infection*. Ann. Review of Phytop., 2: 231-252.
- BELGUENDOUZ L., FREMONO L., LINARD A. (1997) – *Resveratrol inhibits metal ion-dependent and independent peroxidation of porcine low-density lipoproteins*. Biochemical Pharmacology, 53: 1347-1355.
- BERRAF A., PEROS J.P. (2005) – *Importance of Eutypa dieback and esca in Algeria and structure of the associated fungal community*. Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, 39: 121-128.
- BERTEAUX-LECELLIER V., ZICKLER D., DEBUCHY R., PANVIER-ADOUTTE A., THOMPSON-COFFE C., PICARD M. (1998) – *A homologue of the yeast SHE4 Gene is essential for the transition between the syncytial and cellular stages during sexual reproduction of the fungus Podospora anserina*. EMBO Journal, 17: 1248-1258.
- BERTELLI A.A., GIOVANNINI L., DE CATERINA R., BERNINI W., MIGLIORI M., FREGONI M., BAVARESCO L., BERTELLI A. (1996) – *Plasma, urine and tissue levels of trans- and cis-resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene) after short-term or prolonged administration of red wine to rats*. Under Experimental Clinical Research, 22: 61-63.
- BERTELLI A.A., GIOVANNINI L., RIANNESI D., MIGLIORI M., BERNINI W., FREGONI M., BERTELLI A. (1995) – *Antiplatelet activity of synthetic and natural resveratrol in red wine*. International Journal Tissue Reaction, 17: 1-3.
- BESTER W., CROUS P.W., FOURIE P.H. (2007) – *Evaluation of fungicides as potential grapevine pruning wound protectants against Botryosphaeria species*. Australasian Plant Pathology, 36: 73-77.
- BONFIGLIOLI R., MCGREGOR S. (2006) – *The Botryosphaeria conundrum – a New Zealand perspective*. The Australian & New Zealand Grapegrower & Winemaker: 49-53.
- BORIE B., JEANDET P., PARIZE A., BESSIS R., ADRIAN M. (2004) – *Resveratrol and stilbene synthase mRNA production in grapevine leaves treated with biotic and abiotic phytoalexin elicitors*. American Journal of Enology and Viticulture, 55: 60-64.
- BOSSI R., DEWEY F.M. (1992) – *Development of a monoclonal antibody-based immunodetection assay for Botrytis cinerea*. Plant Pathology, 41: 472-482.
- BOOTH C. (1966) – *The genus Cylandrocarpon*. Mycological Papers, 104: 1-56.
- BOTTIN A., LARCHE L., VILLALBA F., GAULIN E., ESQUERRE-TUGAYE M.T., RICKAUER M. (1999) – *Green fluorescent protein (GFP) as Gene expression reporter and vital marker for studying development and microbe-plant interaction in the tobacco pathogen Phytophthora parasitica var. nicotianae*. FEMS Microbiology Letters, 176: 51-56.
- BOUBALS D., MUR G. (1983) – *Difficultés concernant des fongicides viticoles*. Progrès agricole et viticole, 100, 2: 109-113.
- BOYER J.S. (1982) – *Plant productivity and environment*. Science, 218: 443-448.
- BRAMWELL P.A., BAROLLON R.V., ROGERS H.J., BAILEY M.J. (1995) – *Extraction and PCR amplification of DNA from the rizoplane*. Molecular Microbiological Ecology Manual, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht (NL), 1.4.2, pp. 1-20.
- BRAYFORD D. (1992) – *Cylindrocarpon*. In: SINGLETON L.L., MIHAIL J.D., RUSH C.M. (eds.), *Methods for Research, on soilborne phytopathogenic fungi*. American Phytopathologic Society, St. Paul, MN-USA, pp. 103-106.
- BRUNS Y., WHITE T.J., TAYLOR J.W. (1991) – *Fungal molecular systematics*. Annual Review of Ecological System, 22: 525-564.
- BURKI N., MICHEL A., TABACCHI R. (2003) – *Naphthalenones and isocoumarins of the fungus Cera-tocystis fimbriata sp. platani*. Phytopathologia Mediterranea, 42: 191-198.
- BURRUANO S., MONDELLO V., CONIGLIARO G., ALFONZO A., SPAGNUOLO A., MUGNAI L. (2008) – *Grapevine decline in Italy caused by Lasiodiplodia theobromae*. Phytopathologia Mediterranea, 47: 132-136.
- BUTLER M.J., DAY A.W. (1998) – *Fungal melanins: a review*. Can. J. Microbiol., 44: 1115-1136.
- CAETANO-ANOLLÈS G., BASSAM B.J., GRESSOHOFF P.M. (1991) – *DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotides primers*. Bio/Technology, 9: 533-557.
- CALABRESE G. (1999) – *Nonalcoholic compounds of wine: the phytoestrogen resveratrol and moderate red wine consumption during menopause*. Under Experimental Clinical Reserch, 25: 111-114.
- CAMPBELL C.L., MADDEN L.V. (1990) – *Introduction to plant disease epidemiology*. John Wiley & Sons, New York.
- CAPONERO A., VENA G.M., LOPS F., CARLUCCI A., FRISULLO S. (2001) – *La "Gommosi parassitaria" del pesco causata da Botryosphaeria dothidea in Italia*. Informatore Fitopatologico, 6: 67-70.
- CARLUCCI A., CAPONERO A., VENA G.M., CATALANO L., F. LOPS, FRISULLO S. (2004a) – *A Study on susceptibility to Eutypa armeniacae of various combinations of Apricot cultivars and rootstocks*. Acta Horticulturac, 658: 399-406.
- CARLUCCI A., CAPONERO A., VENA G.M., CATALANO L., F. LOPS, FRISULLO S. (2004b) – *L'Eutypiosi dell'albicocco in Basilicata*. Petria, 13: 183-189.
- CARLUCCI A., COLATRUGLIO L., LOPS F., RAIMONDO M.L., GENTILE V., MUCCI M., FRISULLO S. (2008a) – *Diffusione della "Lebbra" delle olive e specie fungine isolate da vari organi dell'olivo in Puglia*. Petria, 18: 1-14.
- CARLUCCI A., COLATRUGLIO L., LOPS F., RAIMONDO M.L., GENTILE V., MUCCI M., FRISULLO S. (2008b) – *Comportamento patogenetico di alcuni isolati fungini associati a striature brune del legno dell'olivo*. Petria, 18: 15-26.
- CARLUCCI A., FRISULLO S. (2009) – *First report of Diplodia corticola on grapevine in Italy*. Plant Disease 91, 1683.
- CARLUCCI A., LOPS F., RAIMONDO M.L., GENTILE V., MUCCI M., FRISULLO S. (2009) – *The Botryosphaeria species from grapevine orchards of Apulia*. Phytopathologia Mediterranea, 48 (1): 180 (abstract).
- CASTILLO-PANDO M., SOMERS A., GREEN C.D., PRIEST M., SRISKANTHADES M. (2001) – *Fungi associated with dieback of Semillon grapevines in the Hunter Valley of New South Wales*. Australasian Plant Pathology, 30: 59-63.

- CATAL M., JORDAN S.A., BUTTERWORTH S.C., SCHILDER A.M.C. (2007) – *Detection of Eutypa lata and Eutypella vitis in grapevine by nested multiplex polymerase chain reaction*. *Phytopathology*, 97: 737-747.
- CESARI V., DE NOTARIS G. (1863) – *Schema di classificazione degli sferiacei italici aschigeni più o meno appartenenti al genere Sphaeria nell'antico significato attribuitogli da Persoon*. *Commentario della Società Crittogamica Italiana*, 1, 4: 177-240.
- CHALFIE M., TU Y., EUSKIRCHEN G., WARD W.W., PRASHER D.C. (1994) – *Green fluorescent protein as a marker for Gene expression*. *Science*, 263: 802-805.
- CHIU W., NIWA Y., ZENG W., HIRANO T., KOBAYASHI H., SHEEN J. (1996) – *Engineered GFP as a vital reporter in plants*. *Current Biology*, 6: 325-330.
- CHOUËIRI È., JREIJIRI F. (2006) – *Occurrence of grapevine declines and first report of Black Dead Arm associated with Botryosphaeria obtusa in Lebanon*. *Plant Disease*, 90: 115.
- CICCARONE A. (1953) – *Disease outbreaks on economic plants in Italy*. *Plant Protection Bulletin FAO*, 1: 49-51.
- CICHEWICZ R.H., KOUZI S.A. (2002) – *Resveratrol oligomers: structure, chemistry, and biological activity*. In: ATTA-UR-RAHMAN (ed.), *Studies in natural products chemistry*, Elsevier Science, B.V., 26: 507-579.
- CIUFFETTI L.M., TUORI R.P., GAVENTA J.M. (1997) – *A single Gene encodes a selective toxin causal to the development of tan spot of wheat*. *Plant Cell*, 9: 135-144.
- COLRAT S., DESWARTE C., LATCHÉ A., KLAËBE K., BOUZAYEN M., FALLOT J., ROUSTAN J.P. (1999) – *Enzymatic detoxification of eutypine, a toxin from Eutypa lata, by Vitis vinifera cells: partial purification of an NADPH-dependent aldehyde reductase*. *Planta*, 207: 544-550.
- COMMODARI F., KHIAI A., IBRAHIMI S., BRIZIUS A.R., KALKSTEIN N. (2005) – *Comparison of the phytoestrogen trans-resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene) structures from X-ray diffraction and solution NMR*. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 43: 567-572.
- COOMBE R.G., LOWE H., WATSON T.R. (1972) – *Fungal metabolites. I. Chromone and naphthoquinone metabolites from a Cylindrocarpus species*. *Australian Journal of Chemistry*, 25: 875-879.
- CORSARO M.M., DE CASTRO C., EVIDENTE A., LANZETTA R., MOLINARO A., MUGNAI L., PARRILLI M., SURICO G. (1998) – *Chemical structure of two phytotoxic exopolysaccharides produced by Phomopsis foeniculi*. *Carbohydrate Research*, 308: 349-357.
- COSS A., CANTOR K.P., RELF J.S., LYNCH C.F., WARD M.H. (2004) – *Pancreatic cancer and drinking water and dietary sources of nitrate and nitrite*. *American Journal of Epidemiology*, 159: 693-701.
- CREASER M.L., WICKS T.J. (2004) – *Short-term effects of remedial surgery to restore productivity to Eutypa lata infected vines*. *Phytopathologia Mediterranea*, 43: 105-107.
- CREASY L.L., COFFEE M. (1988) – *Phytoalexin production potential of grape berries*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 113: 230-234.
- CRISTEN D., SHÖNMANN S., JERMINI M., STRASSER R.J., DEFAGO G. (2007) – *Characterization and early detection of grapevine (Vitis vinifera) stress responses to Esca disease by in situ chlorophyll fluorescence and comparison with drought stress*. *Environmental and Experimental Botany*, 60: 504-514.
- CRISTINZIO G. (1978) – *Gravi attacchi di Botryosphaeria obtusa su vite in provincia di Isernia*. *Informatore Fitopatologico*, 6: 21-23.
- CROGNALE S., BRUNO M., FIDALEO M., MORESI M., PETRUCCIOLI M. (2007) – *Production of  $\beta$ -glucan and related glucan-hydrolases by Botryosphaeria rhodina*. *Journal of Applied Microbiology*, 102: 860-871.
- CROGNALE S., FEDERICI F., PETRUCCIOLI M. (2003) –  *$\beta$ -Glucan production by Botryosphaeria rhodina on undiluted olive-mill wastewaters*. *Biotechnology Letters*, 25: 2013-2015.
- CROUS P.W., KNOX-DAVIES P.S., WINGFIELD M.J. (1989) – *Newly-recorded foliage fungi of Eucalyptus spp. in South Africa*. *Phytophylactica*, 21: 85-88.
- CROUS P.W., SLIPPERS B., WINGFIELD M.J., RHEEDER J., MARASAS W.F.O., PHILLIPS A.J.L., ALVES A., BURGESS T., BARBER P., GROENEWALD J.Z. (2006) – *Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae*. *Studies in Mycology*, 55: 235-253.
- CROUS P.W., WOOD A.R., OKADA G., GROENEWALD J.Z. (2008) – *Follicolous microfungi occurring on Encephalartos*. *Persoonia*, 21: 135-146.
- CUBITT A.B., HEIM R., ADAMS S.R., BOYD A.E., GROSS L.A., TSIEN R.Y. (1995) – *Understanding, improving and using green fluorescent proteins*. *Trends in Biochemical Sciences*, 20: 448-455.
- DALLOT S., GOTTWALD T., LABONNE G., QUIOT J.B. (2003) – *Spatial pattern analysis of Sharka disease (Plum pox virus strain M) in peach orchards of southern France*. *Phytopathology*, 93: 1543-1552.
- DALY M.J. (1976) – *The carbon balance of diseased plants: changes in respiration, photosynthesis and translocation*. In: HEITEFUSS R., WILLIAMS P.H. (eds.), *Physiological Plant Pathology*, Springer-Verlag, Berlino, pp. 450-479.
- DAMM U., FOURIE P.H. (2005) – *Development of a cost-effective protocol for molecular detection of fungal pathogens in soil*. *South African Journal of Science*, 101: 135-139.
- DATNOFF L.E., ELMER W.H., HUBER D.M. (2007) – *Mineral nutrition and plant disease*. *The American Phytopathological Society*, St. Paul, MN-USA, p. 278.
- DAVISON E.M., TAY F.C.S. (1983) – *Twig, branch, and upper trunk cankers of Eucalyptus marginata*. *Plant Disease*, 61: 1285-1287.
- DEACON J.L. (2000) – *Micologia moderna*. Edagricole, Bologna.
- DECOK C., HERRERA FIGUEROA S., ROBLEDO G., CASTILLO G. (2007) – *Fomitiporia punctata (Basidiomycota, Hymenochaetales) and its presumed taxonomic synonyms in America: taxonomy and phylogeny of some species from tropical/subtropical areas*. *Mycologia*, 99: 733-752.
- DE GROOT M.J.A., BUNDOCK P., HOOYKAAS P.J.J., BEIJERSBERGEN A.G.M. (1998) – *Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of filamentous fungi*. *Nature Biotechnology*, 16: 839-842.
- DE JONG J.C., MCCORMACK B.J., SMIRNOFF N., TALBOT N. (1997) – *Glycerol generates turgor in rice blast*. *Nature*, 389: 244-245.
- DENMAN S., CROUS P.W., TAYLOR J.E., KANG J.C., PASCOE I., WINGFIELD M.J. (2000) – *An overview of the taxonomic history of Botryosphaeria, a re-evaluation of its anamorph based on morphology and ITS rDNA phylogeny*. *Studies in Mycology*, 45: 129-140.
- DEL SORBO G., EVIDENTE A., SCALA F. (1994) – *Production of cyclonal antibodies for cyclopaldic acid, a major phytotoxic metabolite produced by the plant pathogen Seiridium cupressi*. *Natural Toxins*, 2: 136-140.
- DENNY T.P. (1995) – *Involvement of bacterial polysaccharides in plant pathogenesis*. *Annual Review of Phytopathology*, 33: 173-197.
- DIFFLOTH P. (1923) – *Les ennemis de la vigne. Galle et Cryptogames*. *La vie agricole*, 22: 367-370.
- DI MARCO S., OSTI F. (2008a) – *Foliar symptom expression of wood decay in Actinidia deliciosa in relation to environmental factors*. *Plant Disease*, 92: 1150-1157.
- DI STEFANO R., CRAVERO M.C. (1991) – *Metodi per lo studio dei polifenoli dell'uva*. *Rivista di Viticoltura ed Enologia*, 2: 37-45.
- DI STEFANO R., CRAVERO M.C., GENTILINI N. (1989) – *Metodi per lo studio dei polifenoli dei vini*. *L'Enotecnico*, 25, 5: 83-89.
- DIXON R.A., HARRISON M. (1990) – *Activation, structure and organization of genes involved in microbial defence in plants*. *Adv. Genet.* 1990, 28: 165-234.
- DIXON D.M., SZANISZLO P.J., POLAK A. (1991) – *Dihydroxynaphthalene (DHN) melanin and its relationship with virulence in the early stages of phaeoerythromycosis*. In: COLE G.T., HOCH H.C. (eds.), *The fungal spore and disease initiation in plants and animals*, Plenum Press, New York, NY-USA, pp. 297-318.

- DOYLE J.J., DOYLE J.L. (1990) – *Isolation of plant DNA from fresh tissue*. Focus, 12: 13-15.
- DRAYTON F.L. (1926) – *A summary of the prevalence of plant diseases in the Dominion of Canada 1920-1924*. Canadian Department of Agriculture, Division of Botany, Bulletin 71, n.s.: 27.
- DU W., HUANG Z., FLAHERTY J.E., WELLS K., PAYNE G.A. (1999) – *Green fluorescent protein as a reporter to monitor Gene expression and food colonization by Aspergillus flavus*. Applied and Environmental Microbiology, 65: 834-836.
- DU X., LU C., LI Y., ZHENG Z., SU W., SHEN Y. (2008) – *Three new antimicrobial metabolites of Phomopsis sp.* Journal of Antibiotics, 61: 250-253.
- DUBROVSKY S., FABRITIUS A.L. (2007) – *Occurrence of Cylindrocarpum spp. in nursery grapevines in California*. Phytopathologia Mediterranea, 46: 84-86.
- DUMAS B., CENTIS S., SARRAZIN N., ESQUERRE-TUGAYE M.T. (1999) – *Use of green fluorescent protein to detect expression of an endopolygalacturonase Gene of Colletotrichum lindemuthianum during bean infection*. Applied and Environmental Microbiology, 65: 1769-1771.
- DUMOT V., MENARD E., COURLIT Y., OUVRIE M., DESACHE F., BOURSIER N., DAVID S., DUBOS B., LARIGNON P. (2004) – *L'eutypiose en Charentes: résultats de dix ans d'étude sur Ugni blanc*. Phytoma. La Défense des Végétaux, 568: 4-7.
- DUNCAN C., DOUGALL H., JOHNSTON P., GREEN S., BROGAN R., LEIFERT C., SMITH L., GOLDEN M., BENJAMIN N. (1995) – *Chemical generation of nitric oxide in the mouth from the enterosalivary circulation of dietary nitrate*. Nature Medicine, 1: 546-551.
- DURRELL L.W. (1964) – *The composition and structure of walls of dark fungus spores*. Mycopathology and Mycology Applied, 23: 339-345.
- EDEL V., STEINBERG C., GAUTHERON N., ALABOUVETTE C. (1997) – *Populations of non pathogenic Fusarium oxysporum associated with roots of four plant species compared to soilborne populations*. Phytopathology, 87: 693-697.
- EICHORN K.W., LORENZ H. (1997) – *Phaenologische Entwicklungsstadien der Rebe*. Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes (Braunschweig), 29: 119-120.
- ELENA K., FISCHER M., DIMOU D., DIMOU D.M. (2006) – *Fomitiporia mediterranea infecting citrus trees in Greece*. Phytopathologia Mediterranea, 45: 35-39.
- ERIKSSON K.E. (1981) – *Fungal degradation of wood components*. Pure & Appl. Chem., 53: 33-43.
- ESAU K. (1948) – *Anatomic effects of the virus of Pierce's disease and phony peach*. Hilgardia, 18: 423-482.
- ESTEBAN M.A., VILLANUEVA M.J., LISSARRAGUE J.R. (1999) – *Effect of irrigation on changes in berry composition of Tempranillo during maturation. Sugars, organic acids, and mineral elements*. American Journal of Enology and Viticulture, 50: 418-434.
- EVIDENTE A., LANZETTA R., MOLINARO A., VURRO M. (1997) – *Composizione della frazione esopolisaccaridica fitotossica prodotta da Phoma exigua var. heteromorpha*. IV Convegno nazionale Giornate di Chimica delle Sostanze Naturali NAT4 [Salerno, 24-26 settembre], p. 38.
- EVANS G., CARTWRIGHT J.B., WHITE N.H. (1967) – *The production of a phytotoxin, nectrolide, by some root-surface isolates of Cylindrocarpum radicola Wr.* Plant and Soil, 26: 253-260.
- EVIDENTE A., MOTTA A. (2002) – *Bioactive metabolites from phytopathogenic bacteria and plants*. In: ATTA-UR-RAHMAN (ed.), *Studies in natural products chemistry*, Elsevier Publisher, Amsterdam (NL), pp. 581-629.
- FENN M.E., COFFEY M.D. (1984) – *Studies on the in vitro and in vivo antifungal activity of fosetyl-Al and phosphorous acid*. Phytopathology, 74 (5): 606-611.
- FERNÁNDEZ-ÁBALOS J.M., FOX H., PITT C., WELLS B., DOONAN J.H. (1998) – *Plant-adapted green fluorescent protein is a versatile vital reporter for Gene expression, protein localization and mitosis in the filamentous fungus, Aspergillus nidulans*. Molecular Microbiology, 27: 121-130.
- FERREE D.C., STREETER J.G. (2004) – *Response of container-grown grapevines to soil compaction*. Hortscience, 39: 1250-1254.
- FERRERO M.D. (1998) – *New and enigmatic species of Licuala from New Guinea*. Palm Journal, 138: 47-49.
- FEY P., COMPTON K., COX E.C. (1995) – *Green fluorescent protein production in the cellular slime molds Polysphondylium pallidum and Dictyostelium discoideum*. Gene, 165: 127-130.
- FILIPPINI L., BONFIGLIOLI M. (2005) – *L'impiego dei biostimolanti per la difesa delle colture dagli stress abiotici: relazioni tra sostanze che incrementano l'accumulo di prolina nei tessuti vegetali e autodifesa delle piante*. In: *Speciale biostimolanti*, Phytomagazine, 36. [www.agrimodena.it/biblioteca/biostimolanti.htm/](http://www.agrimodena.it/biblioteca/biostimolanti.htm/)
- FINCHAM J.R.S. (1989) – *Transformation in Fungi*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 53: 148-170.
- FINETTI-SIALER M.M., GALLITELLI D. (2001) – *Identificazione dei patogeni delle piante in tempo reale*. Informatore Fitopatologico, 6: 58-62.
- FISCHER M. (1995) – *Phellinus igniarius and its closest relatives in Europe*. Mycol. Res., 99: 735-744.
- FISCHER M. (1996) – *On the species complexes within Phellinus: Fomitiporia revisited*. Mycological Research, 100: 1459-1467.
- FISCHER M., BINDER M. (2004) – *Species recognition, geographic distribution and host-pathogen relationships: a case study in a group of lignicolous basidiomycetes, Phellinus s.l.* Mycologia, 96: 798-810.
- FISHER N.L., BURGESS L.W., TOUSSOUN T.A., NELSON P.E. (1982) – *Carnation leaves as a substrate and for preserving cultures of Fusarium species*. Phytopathology, 72: 151-153.
- FLACH J., BOSSIE M., VOGEL J., CORBETT A., JINKS T., WILLINS D.A., SILVER P.A. (1994) – *A yeast RNA-binding protein shuttles between the nucleus and the cytoplasm*. Molecular and Cellular Biology, 14: 8399-8407.
- FLEXAS J., BOTA J., LORETO F., CORNIC G., SHARKEY T.D. (2004) – *Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants*. Plant Biology, 6: 1-11.
- FORBES P.J., MILLAM S., HOOKER J.E., HARRIER L.A. (1998) – *Transformation of the arbuscular mycorrhiza Gigaspora rosea by particle bombardment*. Mycological Research, 102: 497-501.
- FRANKEL E.N. (2005) – *Lipid oxidation. The oily press*. The University of California, CA-USA, pp. 1-455.
- FRANKEL E.N., WATERHOUSE A.L., KINSELLA J.E. (1993) – *Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol*. Lancet, 341: 1103-1104.
- FRANKEL E.N., WATERHOUSE A.L., TEISSEDE P.L. (1995) – *Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human LDL*. Journal Agriculture of Food Chemistry, 43: 890-894.
- FREGONI M. (1999) – *Viticultura di qualità*. Ediz. L'Informatore Agrario, Verona, pp. 707.
- FREGONI M., FREGONI C. (2005) – *Speciale Biostimolanti*. Phytomagazine.com 11, Phytoline Ed., Verona.
- FRÉMONT L. (2000) – *Biological effects of resveratrol*. Life Sciences, 66: 663-673.
- FREZZI M.J. (1952) – *Presencia de "Botryosphaeria ribis" en la Republica Argentina y su importancia economica*. Revista de Investigacion Agricola, 6: 247-262.
- FRIEND J. (1981) – *Plant phenolics, lignification and plant disease*. Progress in Phytochemistry, 7: 197-261.
- FRISULLO S., CAMELE I., CARLUCCI A., LOPS F. (2000) – *Botryosphaeria and Botryosphaeria-like micromycetes on declining oaks in Apulia and Basilicata*. Petria, 10: 1-10.
- FRISULLO S., CAPONERO A., CIRULLI M. (1992) – *Ricerche sulle cause dell' "imbrunimento del legno" delle barbatelle di vite*. Petria, 2: 171-182.
- FRY S.M., MILHOLLAND R. (1990) – *Response of resistant, tolerant, and susceptible grapevine tissues to invasion by the Pierce's disease bacterium Xylella fastidiosa*. Phytopathology, 80: 66-69.
- GALLMETZER M., BURGSTALLER W., SCHINNER F. (1999) – *An optimized method for the isolation of protoplasts from Penicillium simplicissimum to produce sealed plasma membrane vesicles*. Mycologia, 91: 206-212.



- GANG L., RUIXUE L., QIUYUN L., QIANG W., MIN C., BAOJIAN L. (2006) – *A highly efficient polyethylene glycol-mediated transformation method for mushrooms*. FEMS Microbiology Letters, 256: 203-208.
- GATICA M., CÉSARI C., ESCORIAZA G. (2004) – *Phellinus species inducing hoja de malvón symptoms on leaves and wood decay in mature field-grown grapevines*. Phytopathologia Mediterranea, 43: 59-65.
- GATICA M., DUBOS B., LARIGNON P. (2000) – *The “hoja de malvón” grape disease in Argentina*. Phytopathologia Mediterranea, 39: 41-45.
- GEIS P.A., WHEELER M.H., SZANISZLO P.J. (1984) – *Pentaketide metabolites of melanin synthesis in the dematiaceous fungus Wangiella dermatitidis*. Arch. Microbiol., 137: 324-328.
- GHIGNONE S., MIGHELI Q. (2001) – *Nuovi strumenti di diagnosi per i funghi fitopatogeni*. Informatore Fitopatologico, 3: 7-22.
- GLASS N.L., DONALDSON G.C. (1995) – *Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes*. Applied and Environmental Microbiology, 61: 1323-1330.
- GLINKA Z., REINHOLD L. (1971) – *Abscisic acid raises the permeability of plant cells to water*. Plant Physiology, 48: 103-105.
- GOIDANICH G. (1937) – *Notizie su una malattia della vite poco conosciuta*. Atti della Reale Accademia dei Lincei, 26: 107-112.
- GOIDANICH G. (1964) – *Stereum hirsutum 708-710*. In: *Manuale di Patologia Vegetale*, Vol. 2, Edagricole, Bologna.
- GOODEL B., JELLISON J., LIU J., DANIEL G., PASZCZYNSKI A., FEKETE F., KRISHNAMURTHY S., JUN L., XU G. (1997) – *Low molecular weight chelators and phenolic compounds isolated from wood decay fungi and their role in the fungal biodegradation of wood*. Journal of Biotechnology, 53:133-162.
- GOODWIN P.H., DE VAY J.E., MEREDITH C.P. (1988) – *Roles of water stress and phytotoxins in the development of Pierce's disease of the grapevine*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 32: 1-15.
- GOTTSTEIN D., GROSS D. (1992) – *Phytoalexins of woody plant*. Trees, 6: 55-68.
- GRASSO S., MAGNANO DI SAN LIO G. (1975) – *Infezioni di Cylindrocarpon obtusisporum su piante di vite in Sicilia*. Vitis, 14: 36-39.
- GRASSO S. (1984) – *Infezioni di Fusarium oxysporum e di Cylindrocarpon destructans associate a una moria di giovani piante di vite in Sicilia*. Informatore Fitopatologico, 34: 59-63.
- GUARRO J., ALVES S.H., GENÉ J., GRAZZIOTIN N.A., MUZZUCO R., DALMAGRO C., CAPILLA J., ZAROR L., MAYAYO E. (2003) – *Two cases of subcutaneous infection due to Phaeoacremonium spp.* Journal of Clinical Microbiology, 41: 1332-1336.
- GUBLER W.D., BAUMGARTNER K., BROWNE G.T., ESKALEN A., ROONEY-LATHAM S., PETIT E., BAYRAMIAN L.A. (2004a) – *Root diseases of grapevines in California and their control*. Australasian Plant Pathology, 33: 157-165.
- HALLEEN F., FOURIE P.H., CROUS P.W. (2006a) – *A review of black foot disease of grapevine*. Phytopathologia Mediterranea, 45: S55-S67.
- HALLEEN F., FOURIE P.H., CROUS P.W. (2007a) – *Control of black foot disease in grapevine nurseries*. Plant Pathology, 56: 637-645.
- HALLEEN F., SCHROERS H.J., GROENEWALD J.Z., CROUS P.W. (2004) – *Novel species of Cylindrocarpon (Neonectria) and Campylocarpon gen. nov. associated with black foot disease of grapevines (Vitis spp.)*. Studies in Mycology, 50: 431-455.
- HALLEEN F., SCHROERS H.J., GROENEWALD J.Z., CROUS P.W. (2006b) – *Neonectria liriodendri sp. nov., the main causal agent of black foot disease of grapevines*. Studies in Mycology, 55: 227-234.
- HAMELIN R.C., BERUBE P., CIGNAC M., BOURASSA M. (1996) – *Identification of root rot fungi in nursery seedlings by nested multiplex PCR*. Applied and Environmental Microbiology, 62: 4026-4031.
- HAMER J.E., FARRALL L., ORBACH M.J., VALENT B., CHUMEY F.G. (1989) – *Host species-specific conservation of a family of repeated DNA sequences in the genome of a fungal plant pathogen*. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 86: 9981-9985.
- HAMMEL K.E., KAPICH A.N., JENSEN K.A. JR., RYAN Z.C. (2002) – *Reactive oxygen species as agent of wood decay by fungi*. Enzyme and Microbial Technology, 30: 445-453.
- HANSEN M.A., WICK R.L. (1993) – *Plant disease diagnosis: present status and future perspectives*. Advances in Plant Pathology, 10: 65-126.
- HARBORNE J.B. (1983) – *Toxin of plant fungal interaction*. In: KEELER R.F., TU A. (eds.), *Plant and Fungal Toxins*, MerceL Dekker Publisher, New York, NY-USA, pp. 743-782.
- HARDY P.J. (1967) – *Sucrose breakdown and synthesis in the ripening grape berry*. Australian Journal of Biological Sciences, 20: 465-470.
- HARMAN G.E., HOWELL C.R., VITERBO A., CHET I., LORITO M. (2004) – *Trichoderma species –opportunistic, avirulent plant symbionts*. Nature Reviews Microbiology, 2: 43-56.
- HART J.H. (1981) – *Role of phytoalexins in decay and disease resistance*. Annual Review of Phytopathology, 19: 427-436.
- HASELOFF J., AMOS B. (1995) – *GFP in plants*. Trends in Genetics, 11: 328-329.
- HASELOFF J., SIEMERING K.R., PRASHER D.C., HODGE S. (1997) – *Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic Arabidopsis plants brightly*. Proceedings of the National Academy of Science, USA, 94: 2122-2127.
- HAYMES K.M., VAN-DE-WEGG W.E., ARENS P., MAAS J.L., VOSMAN B., DEN-NIJS A.P.M. (2000) – *Development of SCAR markers linked to a Phytophthora fragariae resistance gene and their assessment in European and North-american strawberry genotypes*. Journal of American Society of Horticultural Science, 125: 330-339.
- HEATH D.D., IWAMA G.K., DEVLIN R.H. (1993) – *PCR primed with VNTR core sequences yields species specific patterns and hypervariable probes*. Nucleic Acids Research, 21: 5782-5785.
- HEWITT W.B., PEARSON R.C. (1988) – *Diplodia cane dieback and bunch rot*. In: PEARSON R.C., GOHEEN A.C. (eds.), *Compendium of Grape Diseases*, APS Press, MN-USA, pp. 25-26.
- HODGEKINSON S. (1995) – *GFP in Dictyostelium*. Trends in Genetics, 11: 327-328.
- HODGES J.D., ELAM W.W., WASTON W.F., NEBEKER T.E. (1979) – *Oleoresin characteristics and susceptibility of four southern pines to southern pine beetle (coleopteran: Scolytidae) attacks*. Canadian Entomologist, 111: 889-896.
- HODGSON R., PETERSON W.H., RIKER A.J. (1949) – *The toxicity of polysaccharides and other large molecules to tomato cuttings*. Phytopathology, 1949; 39:47-62.
- HOLGUÍN-PEÑA R.G., ARCOS J.F. (2005) – *First report of gray mold in tomato caused by Botrytis cinerea in Baja California, Mexico*. Plant Disease, 89: 528.
- HOLLAND P.M., ABRAMSON R.D., WATSON R., GELFAND D.H. (1991) – *Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase*. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 88: 7276-7280.
- HOPKINS D.L. (1981) – *Seasonal concentration of the Pierce's disease bacterium in grapevine stems, petioles, and leaf veins*. Phytopathology, 71: 415-418.
- HOWARD R.J., FERRARI M.A. (1989) – *Role of melanin in appressorium function*. Experimental Mycology, 13: 403-418.
- HUDINA M., STAMPAR F. (2000) – *Influence of water regimes and mineral contents in soil upon the contents of minerals, sugars and organic acids in pear fruits (Pyrus communis L.) cv. 'Williams'*. Phytion-Annales Rei Botanicae, 40: 91-96.
- HUGHES G., MADDEN L.V. (1993) – *Using the beta-binomial distribution to describe aggregated patterns of disease incidence*. Phytopathology, 83: 759-763.
- ILLMAN B.L. (1991) – *Oxidative degradation of wood by brown-rot fungi*. In: PELL E., STEFFEN K. (eds.), *Active oxygen/oxidative stress and plant metabolism*. Am. Soc. of Plant Physiol., Rockville, MD-USA, pp. 97-196.
- INGHAM D.J., BEER S., MONEY S., HANSEN G. (2001) – *Quantitative real time PCR assay for determining transgene copy number in transformed plants*. Biotechniques, 31: 132-140.

- INOUE S., TSUJI F.I. (1994) – *Aequorea green fluorescent protein. Expression of the Gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein.* FEBS Letters, 341: 277-280.
- ISPERSVIT - ISTITUTO SPERIMENTALE PER LA VITICOLTURA (2007) – [www.ispervit.it/](http://www.ispervit.it/)
- ISTAT - ISTITUTO CENTRALE DI STATISTICA (2007) – [www.istat.it/](http://www.istat.it/)
- JAMAUX-DESPREAUX I., PÉROS J.P. (2003) – *Genetic structure in populations of the fungus Fomitiporia punctata associated with the esca syndrome in grapevine.* Vitis, 42: 43-51.
- JANG M., PEZZUTO M.J. (1999) – *Cancer chemopreventive activity of resveratrol.* Under Experiment Clinical Reserch, 25: 65-77.
- JANG M.S., CAI E.N., UDEANI G.O., SLOWING K.V., THOMAS C.F., BEECHER C.W.W., FONG H.H.S., FARNSWORTH N.R., KINGHORN A.D., MEHTA R.G., MOON R.C., PEZZUTO J.M. (1997) – *Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes.* Science, 275: 218-220.
- JANSE J.D. (1995) – *New methods of diagnosis in plant pathology - perspective and pitfalls.* EPP0 Bulletin, 25: 5-17.
- JEANDET P., BESSIS R., SBAGHI M., MEUNIER P., TROLLAT P. (1995) – *Resveratrol content of wines of different ages: relationship with fungal disease pressure in the vineyard.* American Journal of Enology and Viticulture, 46: 1-4.
- JEANDET P., DOUILLET-BREUIL A., BESSIS R., DEBORD S., SBAGHI M., ADRIAN M. (2002) – *Phytoalexins from the vitaceae: biosynthesis, phytoalexin Gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50: 2731-2741.
- JEFFREYS A.J., WILSON V., THEIN S.L. (1985) – *Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA.* Nature, 314, 67-73.
- JIMÉNEZ-TEJA D., HERNÁNDEZ-GALÁN R., GONZÁLEZ COLLADO I. (2005) – *Metabolites from Eutypa species that are pathogens on grapes.* Natural Product Reports, 23: 108-116.
- JOHN S., MALONE J., SCOTT E.S., WICKS T.J., HUNT J.S. (2005) – *Biological control of Eutypa dieback in Australia: field evaluation of fungal antagonists.* Phytopathologia Mediterranea, 44 (1): 113-114.
- JOHN S., SCOTT E.S., WICKS T.J., HUNT J.S. (2004) – *Interactions between Eutypa lata and Trichoderma harzianum.* Phytopathologia Mediterranea, 43: 95-104.
- KASUGA T., MITCHELSON K.R. (1994) – *The development of a rapid identification of Heterobasidiom annosum intersterility groups by ribosomal RNA gene polymorphism and by minisatellite allele polymorphism.* In: SCHOTS A., DEWEY F.M., OLIVER R. (eds.), *Modern assays for plant pathogenic fungi: identification, detection and quantification.* CAB Int., Wallingford (UK), pp. 117-126.
- KEEN N.T., WANG M.C., BARTNICKI-GARCIA S., ZENTMEYER G.A. (1975) – *Phytotoxicity of mycolaminarans-β,3-glucans from Phytophthora spp.* Physiological Plant Pathology, 7: 91-97.
- KIM D.H., MARTYN R.D., MAGILL C.W. (1993) – *Mitochondrial DNA (mtDNA)-relatedness among formae speciales of Fusarium oxysporum in the Cucurbitaceae.* Phytopathology, 83: 91-97.
- KIRK P.M., CANNON P.F., MINTER D.W., STAPLERS J.A. (2008) – *Dictionary of fungi.* 10<sup>th</sup> edition, CAB Int., Wallingford (UK).
- KIRK T.K., COWLING E.B. (1984) – *Biological decomposition of solid wood.* In: ROWELL R.M. (ed.), *The Chemistry of Solid Wood.* Adv. Chem. Ser. 207. Am. Chemical Society, Washington, D.C.-USA.
- KIRK T.K., HIGUCHI T., CHANG H. (1980) – *Lignin Biodegradation: Microbiology, Chemistry, and potential Applications.* CRC Press, Florida; vol. 1, pp. 241; vol. 2, pp. 255.
- KOPPEL VAN DER M., SCHOTS A. (1994) – *A double (monoclonal) antibody sandwich ELISA for the detection of Verticillium sp. in roses.* In: SCHOTS A., DEWEY F.M., OLIVER R. (eds.), *Modern assays for plant pathogenic fungi: identification, detection and quantification,* CAB Int., Wallingford (UK), pp. 99-104.
- KRIEDEMANN P.E. (1969) – *Sugar uptake by the grape berry: A note on the absorption pathway.* Planta, 85: 111-117.
- KRÓL E. (2006) – *Fungi inhabiting decaying grapevine (Vitis spp.) cuttings.* Journal of Plant Protection Research, 46: 353-358.
- KUMMERT J., MARINHO V.L.A., RUFTLARD G., COLINET D., LEPOIVRE P. (1998) – *Sensitive detection of apple stem grooving and apple stem pitting viruses from infected apple trees by RT-PCR.* Acta Horticulturae, 472: 97-104.
- KUMMUANG N., DIEHL S.V., SMITH B.J., GRAVES C.H. jr. (1996a) – *Muscadine grape berry rot diseases in Mississippi: disease, epidemiology and crop reduction.* Plant Disease, 80: 244-247.
- KUMMUANG N., SMITH B.J., DIEHL S.V., GRAVES C.H. jr. (1996b) – *Muscadine grape berry rot diseases in Mississippi: disease identification and incidence.* Plant Disease, 80: 238-243.
- KUROSAKI F., TASHIRO N., NISHI A. (1986) – *Induction of chitinase and phenylalanine ammonia-lyase in cultured carrot cells treated with fungal mycelial walls.* Plant and Cell Physiology, 27: 1587-1591.
- KWON-CHUNG K.J., POLACHEK I. (1982) – *Melanin-lacking mutants of Cryptococcus neoformans and their virulence for mice.* Journal of Bacteriology, 150: 1414-1421.
- LALITHAKUMARI D. (1996) – *Protoplasts - A biotechnological tool for plant pathological studies.* Indian Phytopathology, 49: 199-212.
- LANGCAKE P. (1981) – *Disease resistance of Vitis spp. and the production of the stress metabolites resveratrol, ε-viniferin, α-viniferin and pterostilbene.* Physiological Plant Pathology, 18: 213-226.
- LANGCAKE P., MCCARTY W.V. (1979) – *The relationship of resveratrol production to infection of grapevine leaves by Botrytis cinerea.* Vitis, 18: 244-253.
- LANGCAKE P., PRYCE R.J. (1976) – *The production of resveratrol by Vitis vinifera and other members of the Vitaceae as a response to infection.* Physiological Plant Pathology, 9: 77-86.
- LANGCAKE P., PRYCE R.J. (1977) – *The production of resveratrol and viniferins by grapevines in response to ultra-violet irradiations.* Phytochemistry, 16: 1193-1196.
- LARCHER W. (1993) – *Ecofisiologia vegetale.* Edagricole, Bologna.
- LARDNER R., STUMMER B.E., SOSNOWSKI M.R., SCOTT E.S. (2005) – *Molecular identification and detection of Eutypa lata in grapevine.* Mycological Research, 109: 799-808.
- LARDNER R., MAHONEY N., ZANKER T.P., MOLYNEUX R.J., SCOTT E.S. (2006) – *Secondary metabolite production by the fungal pathogen Eutypa lata: analysis of extracts from grapevine cultures and detection of those metabolites in planta.* Australian Journal of Grape and Wine Research, 12: 107-114.
- LARIGNON P., FULCHIC R., DUBOS B. (2001a) – *Un nouveau dépérissement de la vigne en France: le Black Dead Arm causé par Botryosphaeria spp.* Integrated Control in Viticulture, IOBC/wprs Bulletin, 24 (7): 51-55.
- LARIGNON P., FULCHIC R., CERE L., DUBOS B. (2001b) – *Observation on black dead arm in French vineyards.* Phytopathologia Mediterranea, 40: S336-S342.
- LAZZIZERA C., FRISULLO S., ALVES A., PHILLIPS A.J.L. (2008a) – *Morphology, phylogeny and pathogenicity of Botryosphaeria and Neofusicoccum species associated with drupe root of olives in Southern Italy.* Plant Pathology, 57: 948-956.
- LAZZIZERA C., FRISULLO S., ALVES A., PHILLIPS A.J.L. (2008b) – *Phylogeny and morphology of Diplodia species on olives in southern Italy and description of Diplodia olivarum sp. nov.* Fungal Diversity, 31: 63-71.
- LEE R.F., RAJU B.C., NYLAND G., GOHEEN A.C. (1982) – *Phytotoxin(s) produced in culture by the Pierce's disease bacterium.* Phytopathology, 72: 886-888.
- LE GALL D. (1994) – *Protéger les plaies de taille.* Vitis, 192: 22-25.
- LEHOCZKY J. (1974) – *Black dead-arm disease of grapevine caused by Botryosphaeria stevensii infection.* Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae, 9: 319-327.
- LEATHERS T.D. (2002) – *Pullulan.* In: VANDAMME E.J., DE BAETS S., STEINBÜCHEL A. (eds.), *Biopolymers*, vol. 6, *Polysaccharides II: Polysaccharides from Eukaryotes*, Wiley-VCH, Weinheim, pp. 1-35.

- LEAVITT G. (2003) – *The occurrence, distribution, effects and control of Botryodiplodia theobromae on Vitis vinifera in California, Arizona and Northern Mexico*. Phytopathologia Mediterranea, 43: 155.
- LECOMTE P., GUILLAUME D., DEFIVES A., LOUVET G., LIMINANA J.M., BLANCARD D. (2006a) – *Observations of Black Dead Arm symptoms in Bordeaux vineyards: evolution of foliar symptoms, localisation of longitudinal necroses, questions, hypotheses*. Integrated Control in Viticulture, IOBC/wprs Bulletin, 29 (11): 93-94.
- LECOMTE P., LEYO M., LOUVET G., CORIO-COSTET M.F., GAUDILLÈRE J.P., BLANCARD D. (2005) – *Le Black Dead Arm, genèse des symptômes*. Phytoma. La Défense des Végétaux, 587: 29-37.
- LEE C.Y., JAWORSKI A. (1989) – *Major phenolic compounds in ripening white grapes*. American Journal of Enology and Viticulture, 40: 43-46.
- LEE H.B., PARK J.Y., JUNG H.S., SUMMERBELL R.C. (2006) – *Phacomoniella zymoides and Phacomoniella pinifoliorum spp. nov. new acid-tolerant epiphytic fungi isolated from pine needles in Korea*. Mycologia, 98: 598-611.
- LEE L.G., CONNELL C.R., BLOCH W. (1993) – *Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes*. Nucleic Acids Research, 21: 3761-3766.
- LEGGE R.L., THOMPSON J.E., BAKER J.E., LIEBERMAN M. (1982) – *The effect of calcium on the fluidity of phase properties of microsomal membrane isolated from postclimateric Golden Delicious apples*. Plant and Cell Physiology, 23: 161-169.
- LI K.N., ROUSE D.J., GERMAN T.L. (1994) – *PCR primers that allows intergeneric differentiation of ascomycetes and their application in Verticillium spp.* Applied and Environmental Microbiology, 60: 4324-4331.
- LIU Z.M., KOLATTUKUDY P.E. (1999) – *Early expression of the calmodulin Gene which precedes appressorium formation in Magnaporthe grisea, is inhibited by self-inhibitors and requires surface attachment*. Journal of Bacteriology, 181: 3571-3577.
- LORANG M., TUORI R.P., MARTINEZ J.P., SAWYER T.L., REDMAN R.S., ROLLINS J.A., WOLPERT T.J., JOHNSON K.B., RODRIGUEZ R.J., DICKMAN M.B., CIUFFETTI L.M. (2001) – *Green fluorescent protein is lighting up fungal biology*. Applied and Environmental Microbiology, 67: 1987-1994.
- LORENZ D.H., EICHHORN K.W., BLEIHOLDER H., KLOSE R., MEIER U., WEBER E. (1994) – *Phänologische Entwicklungsstadien der Weinrebe (Vitis vinifera L. sp. vinifera)*. Viticultural and Enological Sciences, 49: 66-70.
- LORENZ D.H., EICHHORN K.W., BLEIHOLDER H., KLOSE R., MEIER U., WEBER E. (1995) – *Phenological growth stages of the grapevine (Vitis vinifera L. sp. vinifera). Encoding and description of the phenological stages of the grapevine according to the extended BBCH scheme*. Australian Journal of Grape and Wine Research, 1: 100-103.
- LUGONES L., SCHOLTMEIJER K., KLOOTWIJK R., WESSELS J. (1999) – *Introns are necessary for mRNA accumulation in Schizophyllum commune*. Molecular Microbiology, 32: 681-689.
- LUPO S., BETTUCCI L., PÉREZ A., MARTÍNEZ S., CÉSARI C., ESCORIAZA G., GATICA M. (2006) – *Characterization and identification of the basidiomycetous fungus associated to 'boja de malvón' grapevine disease in Argentina*. Phytopathologia Mediterranea, 45: S110-S116.
- LUQUE J., MARTOS S., PHILLIPS A.J.L. (2005) – *Botryosphaeria viticola sp. nov. on grapevines: a new species with a Dothiorella anamorph*. Mycologia, 97: 1111-1121.
- LUQUE J., SIERRA D., TORRES E., GARCIA F. (2006) – *Cryptovalsa ampelina on grapevines in N.E. Spain: identification and pathogenicity*. Phytopathologia Mediterranea, 45: S101-S109.
- MA Z., LUO Y., MICHAILIDES T.J. (2003) – *Nested PCR Assays for Detection of Monilinia fructicola in Stone Fruit Orchards and Botryosphaeria dothidea from Pistachios in California*. Journal of Phytopathology, 151(6): 312-322.
- MACLEAN D.J., BRAITHWAITE K.S., MANNERS J.M., IRWIN J.A.G. (1993) – *How do we identify and classify fungal plant pathogens in the era of DNA analysis?* Advances in Plant Pathology, 10: 207-244.
- MADDEN L.V. (1989) – *Dynamic Nature of within-field disease and pathogen distributions*. In: JEGER M.J. (ed.), *Spatial Components of Plant Disease, Epidemics*, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ-USA, pp. 96-126.
- MADDEN L.V., HUGHES G. (1994) – *BBD - computer software for fitting the beta-binomial distribution to disease incidence data*. Plant Disease, 78: 536-540.
- MAGNANO DI SAN LIO G., SCALA F., MIGHELI Q. (1995) – *Moderne tecniche diagnostiche in micologia fitopatologica*. Petria, 5: 261-298.
- MAHONEY N., LARDNER R., MOLYNEUX R.J., SCOTT E.S., SMITH L.R., SCHOCH T.K. (2003) – *Phenolic and heterocyclic metabolite profiles of the grapevine pathogen Eutypa lata*. Phytochemistry, 64: 475-484.
- MALDONADO C., ZUNIGA G.E., CORCUREA L.J., ALBERDI M. (1997) – *Effect of water stress on frost resistance of oat leaves*. Environ. Exp. Bot., 38: 99-107.
- MALUTA D.R., LARIGNON P. (1991) – *Pied noir: micux vaut prévenir*. Vitis, 159: 71-72.
- MANICOM B.Q., BAR-JOSEPH M., ROSNER A., VIGODSKY-HAAS H., KOTZE J.M. (1987) – *Potential applications of random DNA probes and restriction fragment length polymorphism in the taxonomy of Fusaria*. Phytopathology, 77: 669-672.
- MANTIRI F.R., SAMUELS G.J., RAHE J.E., HONDA B.M. (2001) – *Phylogenetic relationship in Nectria species having Cy lindrocarpon anamorphs inferred from mitochondrial ribosomal DNA sequences*. Canadian Journal of Botany, 79: 334-340.
- MAOR R., PUYESKY M., HORWITZ B.A., SHARON A. (1998) – *Use of green fluorescent protein (GFP) for studying development and fungal-plant interaction in Cochliobolus heterostrophus*. Mycological Research, 102: 491-496.
- MARSCHNER H. (1998) – *Mineral Nutrition of Higher Plants*. (2<sup>nd</sup> edition). Academic Press, London.
- MARTIN F.N. (1991) – *Selection of DNA probes useful for isolate identification of two Pythium species*. Phytopathology, 81: 742-746.
- MARTIN M.T., COBOS R. (2007) – *Identification of fungi associated with grapevine decline in Castilla y León (Spain)*. Phytopathologia Mediterranea, 46: 18-25.
- MARTIN R.R., JAMES D., LEVESQUE C.A. (2000) – *Impact of molecular diagnostic technologies on plant disease management*. Annual Review of Phytopathology, 38: 207-239.
- MARTÍNEZ S. (2005) – *Inocutis jamaicensis, the causal agent of eucalypt stem rot in Uruguay*. Mycotaxon, 91: 165-171.
- MARTOS S., ANDOLFI A., LUQUE J., MUGNAI L., SURICO G., EVIDENTE A. (2008) – *Production of phytotoxic metabolites of Botryosphaeriaceae causing decline on grapevines, with special interest in the species Neofusicoccum luteum and N. parvum*. European Journal of Plant Pathology, 121: 451-461.
- MATTA A., LUISONI E., SURICO G. (1996) – *Fondamenti di Patologia Vegetale*. Patron Editore, Bologna.
- MCDERMOTT J.M., McDONALD B.A. (1993) – *Gene flow in plant pathosystems*. Annual Review of Phytopathology, 31: 353-373.
- McKINNEY H.H. (1923) – *Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by Helminthosporium sativum*. Journal of Agricultural Research, 26: 195-218.
- McWAIN P., GREGORY G.F. (1972) – *A neutral mannan from Ceratocystis fagacearum culture filtrate*. Phytochemistry, 11: 2609-2612.
- MEDENTSEV A.G., AKIMENKO Y.K. (1998) – *Naphthoquinone metabolites of the fungi*. Phytochemistry, 47: 933-959.
- MICHELMORE R.W., HULBERT S.H. (1987) – *Molecular markers for genetic analysis of phytopathogenic fungi*. Annual Review of Phytopathology, 25: 383-404.
- MILHOLLAND R.D. (1988) – *Macrophoma Rot*. In: PEARSON R.C., GOHEEN A.C. (eds.), *Compendium of Grape Diseases*, APS Press, MN-USA, p. 24.

- MILHOLLAND R.D. (1991) – *Muscadine grapes: some important diseases and their control*. Plant Disease, 75: 113-117.
- MITTLER R. (2002) – *Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance*. Trends in Plant Sc., 7: 405-410.
- MOHAMED H., SANDERS I.R. (2005) – *Low Gene copy number shows that arbuscular mycorrhizal fungi inherit genetically different nuclei*. Nature, 433: 160-163.
- MOLLENHAUER H.H., HOPKINS D.L. (1976) – *Xylem morphology of Pierce's disease-infected grapevines with different levels of tolerance*. Physiological Plant Pathology 9: 95-100.
- MOLYNEUX R.J., MAHONEY N., BARMAN P., WONG R.Y., MEYER K., IRELAN N. (2002) – *Eutypa dieback in grapevines: differential production of acetylenic phenol metabolites by strains of Eutypa lata*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50: 1393-1399.
- MORRISSEY J.P., OSBOURN A.E. (1999) – *Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 63: 708-724.
- MOSTERT L., CROUS P.W., KANG J.C., PHILLIPS A.J.L. (2001) – *Species of Phomopsis and Libertella sp. occurring on grapevines with specific references to South Africa: morphological, cultural, molecular and pathological characterization*. Mycologia, 93: 146-147.
- MOTTIER N. (2005) – *Isolation and identification of secondary metabolites from the fungus Phomopsis spp., a pathogen responsible for vine excoriosis*. PhD Thesis, University of Neuchâtel, Neuchâtel, (CH).
- MULLINS M.G., BOUQUET A., WILLIAMS L.E. (1992) – *Biology of the Grapevine*. Cambridge University Press, Cambridge (UK), pp. 52-54.
- MUNKVOLD G.P. (2001) – *Eutypa dieback of grapevine and apricot*. Plant Health Progress, [www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/diagnosticguide/dieback/](http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/diagnosticguide/dieback/)
- MURPHY J., RILEY J.P. (1962) – *Modified single solution method for the determination of phosphate in natural water*. Analytica Chimica Acta, 27: 31-36.
- NADAL M., AROLA L. (1995) – *Effect of limited irrigation on the composition of must and wine of Cabernet Sauvignon under semi-arid conditions*. Vitis, 34: 151-154.
- NASCIMENTO T., REGO C., OLIVEIRA H. (2001) – *Detection of Cylandrocarpon black-foot pathogens in grapevine by nested PCR*. Phytopathologia Mediterranea, 40: 357-361.
- NAVAS-CORTÉS J.A., LANDA B.B., MERCADO-BLANCO J., TRAPER-CASAS J.L., RODRÍGUEZ-JURADO D., JIMÉNEZ-DÍAZ R.M. (2008) – *Spatiotemporal analysis of spread of infections by Verticillium dahliae pathotypes within a high tree density olive orchard in southern Spain*. Phytopathology, 98: 167-180.
- NAZARENKO A., BHATNAGAR S.K., HOHMAN R.J. (1997) – *A close tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer*. Nucleic Acids Research, 25: 2516-2521.
- NIEDENTHAL R.K., RILES L., JOHNSTON M., HEGEMANN J.H. (1996) – *Green fluorescent protein as a marker for Gene expression and subcellular localization in budding yeast*. Yeast, 12: 773-786.
- NIEMANN G.J., VAN DER KERK A., NIESSEN M.A., VERSLUIS K. (1991) – *Free and cell wall-bound phenolics and other constituents from healthy and fungus-infected carnation (Dianthus caryophyllus L.) stems*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 38: 117-136.
- NONOMURA S., KANAGAWA H., MAKIMOTO A. (1963) – *Chemical constituents of polygonaceous plants. I. Studies on the components of Ko-Jo-Kon (Polygonum cuspidatum Sieb. et Zucc.)*. Yakugaku Zasshi, 83: 983-988.
- O'DONNELL K. (1992) – *Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete Fusarium sambucinum (Gibberella pulicaris)*. Current Genetics, 22: 213-220.
- O'DONNELL K., CIGELNIK E. (1997) – *Two different intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus Fusarium are nonorthologous*. Molecular Phylogenetics and Evolution, 7: 103-106.
- OJEDA H., ANDARY C., KRAEVA E., CARBONNEAU A., DELOIRE A. (2002) – *Influence of pre- and postveraison water deficit on synthesis and concentration of skin phenolic compounds during berry growth of Vitis vinifera cv. Shiraz*. American Journal of Enology and Viticulture, 53: 261-267.
- OLIVEIRA H., BARROS A.S., DELGADILLO I., COIMBRA M.A., SANTOS C. (2009) – *Effects of fungus inoculation and salt stress on physiology and biochemistry of in vitro grapevines: emphasis on sugar composition changes by FT-IR analyses*. Environmental and Experimental Botany, 65: 1-10.
- OSMAN F., ROWHANI A. (2006) – *Application of a spotting sample preparation technique for the detection of pathogens in woody plants by RT-PCR and real-time PCR (TaqMan)*. Journal of Virological Methods, 133: 130-136.
- PACE-ASCIAC C.R., HAHN S., DIAMANDIS E.P., SOLEAS G., GOLDBERG D.M. (1995) – *The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease*. Clinical Chimica Acta, 235: 207-219.
- PADHYE A.A., DAVIS M.S., BAER D., REDDICK A., SINHA K.K., OTT J. (1998) – *Phaeoophomycosis caused by Phaeoacremonium inflatipes*. Journal of Clinical Microbiology, 36: 2763-2765.
- PANZELLA L., DE LUCIA M., AMALFITANO C., PEZZELLA A., EVIDENTE A., NAPOLETANO A., D'ISCHIA M. (2006) – *Acid-promoted reaction of the stilbene antioxidant resveratrol with nitrite ions: mild phenolic oxidation at the 4'-Hydroxystyryl sector triggering nitration, dimerization, and aldehyde-forming routes*. Journal of Organic Chemistry, 71: 4246-4254.
- PARAN I., MICHELMORE R.W. (1993) – *Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce*. Theoretical and Applied Genetics, 85: 985-993.
- PARRINI C., PANDOLFO F.M. (1990) – *Incidenza delle malattie crittogamiche e difesa dei vigneti in Toscana*. La difesa delle piante, 13: 113-130.
- PEARCE R.B. (1996) – *Transley Review No. 87, Antimicrobial defences in the wood of living trees*. New Phytol., 132: 203-233.
- PEARSON R.C., GOHEEN A.C. (1994) – *Phomopsis cane and leaf spot*. In: HEWITT W.B., PEARSON R.C. (eds.), *Compendium of Grape Disease*, Aps Press, St. Paul, MN-USA, pp. 17-18.
- PECCHIA S., FANTI S., VANNACCI G. (1996) – *Impiego della tecnica RAPD-PCR nello studio della variabilità di funghi fitopatogeni*. Informatore Fitopatologico, 46: 11-19.
- PÉROS J.P., JAMAUX-DESPREAU I., BERGER G., GERBA D. (1999) – *The potential importance of diversity in Eutypa lata and co-colonising fungi in explaining variation in development of grapevine dieback*. Mycological Research, 103: 1385-1390.
- PERRY J.N. (1995) – *Spatial analysis by distance indices*. Journal of Animal Ecology, 64: 303-314.
- PERRY J.N. (1998) – *Measures of spatial pattern for counts*. Ecology, 79: 1008-1017.
- PERRY J.N., WINDER L., HOLLAND J.M., ALSTON R.D. (1999) – *Red-blue plots for detecting clusters in count data*. Ecology Letters, 2: 106-113.
- PETIT E., GUBLER W.D. (2005) – *Characterization of Cylandrocarpon species, the cause of black foot disease of grapevine in California*. Plant Disease, 89: 1051-1059.
- PHILLIPS A.J.L. (1998) – *Botryosphaeria dothidea and other fungi associated with excoriosis and dieback of grapevines in Portugal*. Journal of Phytopathology, 146: 327-332.
- PHILLIPS A.J.L. (2000) – *Excoriosis, cane blight and related diseases of grapevines: a taxonomic review of the pathogens*. Phytopathologia Mediterranea, 39: 341-356.
- PHILLIPS A.J.L. (2002) – *Botryosphaeria species associated with diseases of grapevines in Portugal*. Phytopathologia Mediterranea, 41: 3-18.
- PHILLIPS A.J.L., ALVES A., CORREIA A., LUQUE J. (2005) – *Two new species of Botryosphaeria with brown, 1-septate ascospores and Dothiorella anamorphs*. Mycologia, 97: 513-529.
- PHILLIPS A.J.L., ALVES A., PENNYCOOK S.R., JOHNSTON P.R., RAMALEY A., AKULOV A., CROUS P.W. (2008) – *Resolving the phylogenetic and taxonomic status of dark-spored teleomorph genera in the Botryosphaeriaceae*. Persoonia, 21: 29-55.
- PHILLIPS A.J.L., CROUS P., ALVES A. (2007) – *Diplodia seriata, the anamorph of "Botryosphaeria" obtusa*. Fungal Diversity, 25: 141-155.
- PHILLIPS A.J.L., FONSECA F., PVOVA V., CASTILHO R., NOLASCO G. (2002) – *A reassessment of the*

- anamorphic fungus* Fusicoccum luteum and description of its teleomorph Botryosphaeria lutea sp. nov. Sydowia, 54: 59-77.
- PIERCE M., RASCHKE K. (1981) – *Synthesis and metabolism of abscisic acid in detached leaves of Phaeolus vulgaris L. after loss and recovery of turgor*. Planta, 153: 153-165.
- PIGLIONICA V. (1981) – *Phomopsis viticola Sacc., l'agente della "necrosi corticale" o "escoriosi" della Vite*. Vignevini, Suppl. al n. 1-2-3: 14-16.
- PIGLIONICA V., ELIA M. (1972) – *La difesa della vite dai parassiti crittogamici in Puglia*. Atti Accademia Italiana della Vite e del Vino, 24: 409-414.
- PILOTTI M., GERVAZI F., BRUNETTI A. (2005) – *Molecular identification of Fomitiporia mediterranea and Eutypa lata/Libertella blepharis in Platanus acerifolia*. Journal of Phytopathology, 153: 193-202.
- PINES J. (1995) – *GFP in mammalian cells*. Trends in Genetics, 11: 326-327.
- PLYLER T.R., SIMONE G.W., FERNANDEZ D., KISTLER H.C. (1999) – *Rapid detection of the Fusarium oxysporum lineage containing the Canary Island date palm wilt pathogen*. Phytopathology, 89: 417-413.
- POLIGNONE M., CARLUCCI A., D'AMBROSIO T., LOPS F., FRISULLO S. (2006) – *Studies on susceptibility of pruning cuts and on progressing of Esca disease fungi in the host*. Journal of Plant Pathology, 88: 54.
- PONTI I., LAFFI F. (1982) – *Malattie crittogamiche dei fruttiferi e della vite*. L'Informatore Agrario, Verona.
- PRASHER D.C. (1992) – *Primary structure of Aequorea victoria green-fluorescent protein*. Gene, 111: 229-233.
- PRATT C. (1974) – *Vegetative anatomy of cultivated grapes – a review*. American Journal of Enology and Viticulture, 25: 131-149.
- PROTA U. (1967) – *Presenza in Sardegna di una malattia della vite caratterizzata dalla necrosi corticale*. Informatore Fitopatologico, 17: 3-6.
- PROVINCIA AUTONOMA DI TRENTO (2006) – *Rapporto agricoltura 2005. Relazione sull'attività svolta*. PAT, Dipartimento Agricoltura e Alimentazione, Trento (IT).
- PROVINCIA DI RAVENNA, SETTORE POLITICHE AGRICOLE E SVILUPPO RURALE (2004) – *Annata Agraria 2002-2003*.
- PUTNAM M.L. (1995) – *Evaluation of selected methods of plant disease diagnosis*. Crop Protection, 14: 517-525.
- QIU Y., SAVOCCHIA S., STEEL C.C., ASH G.J. (2008) – *Botryosphaeria dothidea associated with grapevine trunk disease in south-eastern Australia*. Australasian Plant Pathology, 37(5): 482-485.
- RAHA S.K., ROY S.K., DEY S.K., CHAKRABARTY S.L. (1990) – *Purification and properties of an L-asparaginase from Cylandrocarpon obtusisporum MB-10*. Biochemistry Int., 21: 987-1000.
- REAL L.A., MCELHANY P. (1996) – *Spatial pattern and process in plant-pathogen interactions*. Ecology, 77: 1011-1025.
- REDDICK D. (1909) – *Necrosis of the grape vine*. Cornell Univ. Agric. Exp. Station Bulletin, 263: 323-343.
- REDL H. (1987) – *Biotisch bedingte Beerenberostungen mit nachfolgender Apoplexie*. Der Pflanzenarzt, 40 (2): 3-4.
- REGO C., CARVALHO A., NASCIMENTO T., OLIVEIRA H. (2001b) – *First approach on the understanding of inoculum sources of Cylandrocarpon destructans and Phaeoconiella chlamydospora concerning grapevine rootstocks in Portugal*. Integrated Control in Viticulture, IOBC/wprs Bulletin, 24 (7): 67-71.
- REGO C., FARROPAS L., NASCIMENTO T., CABRAL A., OLIVEIRA H. (2006) – *Black foot of grapevine: sensitivity of Cylandrocarpon destructans to fungicides*. Phytopathologia Mediterranea, 45: S93-S100.
- REGO C., NASCIMENTO T., OLIVEIRA H. (2001a) – *Characterisation of Cylandrocarpon destructans isolates from grapevines in Portugal*. Phytopathologia Mediterranea, 40: S343-S350.
- REGO M.C., PÁDUA M., CARVALHO A., OLIVEIRA H. (1998) – *Contributo para o estudo da espécie Cylandrocarpon destructans (Zin.) Scholtens em material vitícola nacional*. Actas 4° Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo [Évora (Portugal), 1998 May 20-22], 1, pp. 129-135.
- RENAUD J.M., TSOUPRAS G., TABACCHI R. (1989) – *Biologically active natural compounds from Eutypa lata (Pers:F) Tul*. Helvetica Chimica Acta, 72: 929-932.
- RENAUD S., DE LOGERIL M. (1992) – *Wine, alcohol, platelets and the French paradox for coronary disease*. Lancet, 393: 1523-1526.
- RIACH M.B.R., KINGHORN J.R. (1996) – *Genetic transformation and vector developments in filamentous fungi*. In: BOS C.J. (ed.), *Fungal Genetics: principles and practice*, Marcel Dekker, New York, NY-USA, pp. 209-233.
- RIDGWAY H.J., STEWART A. (2000) – *Molecular marker assisted detection of the mycoparasite Coniothyrium minitans A69 in soil*. New Zealand Plant Protection, 53: 114-121.
- RIOUX D., NICOLE M., SIMARD M., OUELLETTE G.B. (1998) – *Immunocytochemical evidence that secretion of pectin occurs during gel (gum) and tylosis formation in trees*. Phytopathology, 88: 494-505.
- ROBINSON M., SHARON A. (1999) – *Transformation of the bioherbicide Colletotrichum gloeosporioides f. sp. aescynomene by electroporation of germinated conidia*. Current Genetics, 36: 98-104.
- RODAS C. (2003) – *Diseases of Eucalyptus in Colombia*. MSc. Thesis, University of Pretoria (South Africa).
- ROGERS S.O., BENDICH A.J. (1985) – *Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues*. Plant Molecular Biology, 5: 69-76.
- ROLSHAUSEN P.E., TROUILLAS F.P., GUBLER W.D. (2004) – *Identification of Eutypa lata by PCR-RFLP*. Plant Disease, 88: 925-929.
- ROVESTI L., MONTERMINI A. (1987) – *A grapevine decline caused by Sphaeropsis malorum widespread in the province of Reggio-Emilia*. Informatore Fitopatologico, 37: 59-61.
- RUDOLPH K.W.E., GROSS M., NEUGEBAUER M., HOKAWAT S., ZACHOWSKI A., WANDDRA K., KLEMENT K. (1989) – *Extracellular polysaccharides as determinants of leaf spot diseases caused by pseudomonads and xanthomonads*. In: GRANITI A., DURBIN R.D., BALLIO A. (eds.), *Phytotoxins and plant pathogenesis*, pp. 177-218; NATO, ASI series, Springer-Verlag, Berlino.
- RUFFNER H.P. (1982) – *Metabolism of tartaric and malic acids in Vitis. A review - Part B*. Vitis, 21: 346-358.
- RUI D., BOLAY A., TORRESIN G.C. (1985) – *Prima segnalazione della presenza in Italia dell'eutipiosi sulla vite (Eutypa lata = E. armenicae)*. Atti dell'Accademia Italiana della Vite, 37.
- SACCARDO P.A. (1915) – *Notae mycologicae*. Annales Mycologici, 13: 115-138.
- SAKIHAMA Y., COHEN M.F., GRACE S.C., YAMASAKI H. (2002) – *Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants*. Toxicology, 177: 67-80.
- SALINAS J., SCHÖBER G., SCHOTS A. (1994) – *Monoclonal antibodies for the detection of conidia of Botrytis cinerea on cut flowers using an immunofluorescence assay*. In: SCHOTS A., DEWEY F.M., OLIVER R. (eds.), *Modern assays for plant pathogenic fungi: identification, detection and quantification*. CAB Int., Wallingford (UK), pp. 7173-7178.
- SAMOUILOV A., KUPPUSAM P., ZWEIER J.L. (1998) – *Evaluation of the magnitude and rate of nitric oxide production from nitrite in biological systems*. Archives Biochemistry Biophysics, 357: 1-7.
- SANTERRE HENRIKSEN A.L., EVEN S., MULLER C., PUNT P.J., VAN DEN HONDEL C.A., NIELSEN J. (1999) – *Study of the glucoamylase promoter in Aspergillus niger using green fluorescent protein*. Microbiology, 145: 729-734.
- SAUER K.M., HULBERT S.H., TISSERAT N.A. (1993) – *Identification of Ophiostoma herpotricha by cloned DNA probes*. Phytopathology, 83: 97-102.

- SAVOCCHIA S., STEEL C.C., STODART B.J., SOMERS A. (2007) – *Pathogenicity of Botryosphaeria species isolated from declining grapevines in sub tropical regions of Eastern Australia*. Vitis, 46: 27-32.
- SCHÄR C., VIDALE P.L., LÜTHI D., FREI C., HÄBERLI C., LINIGER M.A., APPENZELLER C. (2004) – *The role of increasing temperature variability in European summer heatwaves*. Nature, 427: 332-336.
- SCHECK H.J., VASQUEZ S.J., FOGLE D., GUBLER W.D. (1998a) – *Grape growers report losses to black-foot and grapevine decline*. California Agriculture, 52: 19-23.
- SCHESSER K., LUDER A., HENSON J.M. (1991) – *Use of polymerase chain reaction to detect the take-all fungus, Gaumannomyces graminis in infected wheat plants*. Applied and Environmental Microbiology, 57: 553-556.
- SCHILDKRAUT C.L., MARMUR J., DOTY P. (1961) – *The formation of hybrid DNA molecules and their use in studies of DNA homologies*. Journal of Molecular Biology, 3: 595-617.
- SCHILLING A.G., MÖLLER E.M., GEIGER H.H. (1996) – *Polymerase chain reaction-based assay for specific detection of Fusarium culmorum, F. graminearum, and F. avenaceum*. Phytopathology, 86: 515-522.
- SEIFERT K.A., GAMS W., CROUS P.W., SAMUELS G.J. (2000) – *Molecules, morphology and classification: towards monophyletic genera in Ascomycetes*. Studies in Mycology, 45: 1-4.
- SELBMANN L., CROGNALE S., PETRUCCIOLI M. (2004) – *Beta-glucan production by Botryosphaeria rhodina in different bench-top bioreactors*. Journal of Applied Microbiology, 96: 1074-1081.
- SELBMANN L., STINGELE F., PETRUCCIOLI M. (2003) – *Exopolysaccharide production by filamentous fungi: the example of Botryosphaeria rhodina*. Antonie van Leeuwenhoek, 84: 135-145.
- SELBY A.D., VAN HOOK J.M. (1907) – *Dying of bearing grapevines*. Ohio Agricultural Experiment Station Circular, 64: 1-6.
- SERRA S. (1995) – *Indagine micologica su viti affette da mal dell'Esca nel Veneto*. Rivista di Viticoltura e di Enologia, 48: 3-9.
- SHEARER B.L., TIPPETT J.T., BARTLE J.R. (1987) – *Botryosphaeria ribis infection associated with death of Eucalyptus radiata in species selection trials*. Plant Disease, 71: 140-145.
- SHEEN J., HWANG S., NIWA Y., KOBAYASHI H., GALBRAITH D.M. (1995) – *Green-fluorescent protein as a new vital marker in plant cells*. Plant Journal, 8: 777-784.
- SHINGEL K.I. (2004) – *Current knowledge on biosynthesis, biological activity, and chemical modification of the exopolysaccharide, pullulan*. Carbohydrate Research, 339: 447-60.
- SHLIZERMAN L., MARSH K., BLUMWALD E., SADKA A. (2007) – *Iron-shortage-induced increase in citric acid content and reduction of cytosolic aconitase activity in Citrus fruit vesicles and calli*. Physiologia Plantarum, 131: 72-79.
- SHOEMAKER R.A. (1964) – *Conidial states of some Botryosphaeria species on Vitis and Quercus*. Canadian Journal of Botany, 42: 1297-1303.
- SIEDENBERG D., MESTRIC S., GANZLIN M., SCHMIDT M., PUNT P.J., VAN DEN HONDEL C.A. M.J., RINAS U. (1999) – *GlaA promoter controlled production of a mutant green fluorescent protein (S65T) by recombinant Aspergillus niger during growth on defined medium in batch and fed-batch cultures*. Biotechnology Progress, 15: 43-50.
- SKINNER W., BAILEY A., RENWICK A., KEON J., GURR S., HARGREAVES J. (1998) – *A single amino acid substitution in the iron-sulphur protein subunit of succinate dehydrogenase determines resistance to carboxin in Mycosphaerella graminicola*. Current Genetics, 34: 393-398.
- SLIPPERS B., BURGESS T., WINGFIELD B.D., CROUS P.W., COUTINHO T.A., WINGFIELD M.J. (2004a) – *Development of simple sequence repeat markers for Botryosphaeria spp. with Fusicoccum anamorphs*. Molecular Ecology Notes, 4: 675-677.
- SLIPPERS B., CROUS P.W., DENMAN S., COUTINHO T.A., WINGFIELD B.D., WINGFIELD M.J. (2004b) – *Combined multiple Gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as Botryosphaeria dothidea*. Mycologia, 96: 83-101.
- SLIPPERS B., FOURIE G., CROUS P.W., COUTINHO T.A., WINGFIELD B.D., WINGFIELD M.J. (2004c) – *Multiple Gene sequences delimit Botryosphaeria australis sp. nov. from B. lutea*. Mycologia, 96: 1030-1041.
- SMART R.E., COOMBE B.G. (1983) – *Water relations of grapevines*. In: KOZLOWSKI T.T. (ed.), *Water Deficits and Plant Growth, Vol. VIII*, pp. 137-196, Academic Press, New York, USA.
- SMITH H., KEMP G.H.J., WINGFIELD M.J. (1994) – *Canker and die-back of Eucalyptus in South Africa caused by Botryosphaeria dothidea*. Plant Pathology, 43: 1031-1034.
- SMITH H., WINGFIELD M.J., CROUS P.W., COUTINHO T.A. (1996b) – *Sphaeropsis sapinea and Botryosphaeria dothidea endophytic in Pinus spp. in South Africa*. South African Journal of Botany, 62: 86-88.
- SMITH H., WINGFIELD M.J., PETRINI O. (1996a) – *Botryosphaeria dothidea endophytic in Eucalyptus grandis and Eucalyptus nitens in South Africa*. Forest Ecology and Management, 89: 189-195.
- SOLEAS G.J., DIAMANDIS E.P., GOLDBERG D.M. (1997) – *Resveratrol: A molecule whose time has come? And gone?* Clinical Biochemistry, 30: 91-113.
- SOUTHERN E.M. (1975) – *Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis*. Journal of Molecular Biology, 98: 503-507.
- SPALDING D.H., BRUEHL G.W., FOSTER R.J. (1961) – *Possible role of pectinolytic enzymes and polysaccharide in pathogenesis by Cephalosporium gramineum in wheat*. Phytopathology, 51: 227-235.
- SPANNA F., SALINARI F., CHIESI V., CAFFI T. (2005) – *Influence of climatic factors on the epidemiology of the main grape fungal diseases*. Informatore Fitopatologico, 55 (4): 9-14.
- SPELLIG T., BOTTIN A., KAHMANN R. (1996) – *Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus Ustilago maydis*. Molecular Genetics and Genomics, 252: 503-509.
- SPIERS A.G., BREWSTER A.T. (1997) – *Evaluation of chemical and biological treatments for control of Chondrostereum purpureum infection of pruning wounds in willow, apples and peaches*. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 25: 19-31.
- STAFFORD H.A., LOEWUS F.A. (1958) – *The fixation of 14 CO<sub>2</sub> into tartaric and malic acids of excised grape leaves*. Plant Physiology, 33: 194-199.
- STEFFAN H., RAPP A. (1979) – *Ein Beitrag zum Nachweis unterschiedlicher Malatpools in Beeren der Rebe*. Vitis, 18: 100-105.
- STENLID J., KARLSSON J., HOGBERG N. (1994) – *Intraspecific genetic variation in Heterobasidion annosum revealed by amplification of minisatellite DNA*. Mycological Research, 98: 57-63.
- STEVENS N.E. (1933) – *Two apple black rot fungi in the United States*. Mycologia 25: 536-548.
- STEVENSON J.F., MATTHEWS M.A., GREVE L.C., LABAVITCH J.M., ROST T.L. (2004) – *Grapevine susceptibility to Pierce's Disease II: progression of anatomical symptoms*. American Journal of Enology and Viticulture, 55: 238-245.
- STEWART C.R. (1971) – *Effect of wilting on carbohydrates during incubation of excised bean leaves in the dark*. Plant Physiology, 48: 792-794.
- STEWART C.R., MORRIS C.J., THOMPSON J.F. (1966) – *Changes in amino acid content of excised leaves during incubation. II. Role of sugar in the accumulation of proline in wilted leaves*. Plant Physiol., 41: 1585-1590.
- STOREY R., WYN-JONES R.G. (1977) – *Quaternary ammonium compounds in plants in relation to salt resistance*. Phytochemistry, 16: 447-453.
- STROBEL G.A., VAN ALFEN N., HAPNER K.D., MCNEIL M., ALBERSHEIM P. (1978) – *Some phytotoxic glycopeptides from Ceratocystis ulmi, the Dutch Elm Disease pathogen*. Biochimica et Biophysica Acta, 538: 60-75.
- STRZELCZYK E., KAMPERT M. (1983) – *Production of cytokinin-like substances by Cyindrocarpum destructans (Zins.) Scholt. isolates pathogenic and non-pathogenic to fir (Abies alba Mill.) seedlings*. Journal of Phytopathology, 106: 90-96.

- STRZELCZYK E., POKOJSKA-BURDZIEZ A. (1982) – *Production of auxins and gibberellin-like substances by* *Cylindrocarpon destructans* (Zins.) Scholt. isolates pathogenic and non-pathogenic to fir (*Abies alba Mill.*). *Journal of Phytopathology*, 105: 327-335.
- SUELMANN R., SIEVERS N., FISCHER R. (1997) – *Nuclear traffic in fungal hyphae: in vivo study of nuclear migration and positioning in Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology*, 25: 757-769.
- SUKARNO N., SMITH F.A., SCOTT E.S., JONES G.P., SMITH S.E. (1998) – *The effect of fungicides on vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis*. *New Phytologist*, 139: 321-330.
- SUN J.Q., YU H.Y., ZHANG P., ZHANG Y.F., LING H.B., XIE Y.H., ZHOU D.P., PING W.X. (2001) – *The formation and regeneration of Nodulisporium sylviforme protoplast*. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 7: 375-381.
- SUTHERLAND M.D. (1991) – *The generation of oxygen radicals during host plant responses to infection*. *Physiology and Molecular Plant Pathology*, 39: 79-93.
- SUTTON B.C. (1980) – *The Coelomycetes, Fungi Imperfect with acervuli, pycnidia and stromata*. Commonwealth Mycological Institute, Kew (UK).
- SWEETINGHAM M. (1983) – *Studies on the nature and pathogenicity of soilborne Cylindrocarpon spp.* PhD Thesis, University of Tasmania, Tasmania (Australia).
- TAIZ L., ZEIGER E. (2002) – *Fisiologia vegetale*. Piccin-Nuova libreria, Padova.
- TAYLOR A., HARDY G.E.St.J., WOOD P., BURGESS T. (2005) – *Identification and pathogenicity of Botryosphaeria species associated with grapevine decline in Western Australia*. *Australasian Plant Pathology*, 34: 187-195.
- THOMAS C.A. (1949) – *A wilt-inducing polysaccharide from Fusarium solani f. eumartii*. *Phytopathology*, 39: 572-579.
- THOMSON R.H. (1971) – *Naturally Occuring Quinones*. Academic Press, London (UK), pp. 39-92.
- THORNE E.T., STEVENSON J.F., ROST T.L., LABAVITCH J.M., MATTHEWS M.A. (2006) – *Pierce's disease symptoms: comparison with symptoms of water deficit and the impact of water deficits*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57: 1-11.
- THORNTON C.R., DEWEY F.M., GILLIGAN C.A. (1993) – *Development of monoclonal antibody-based immunological assays for the detection of live propagules of Rhizoctonia solani in soil*. *Plant Pathology*, 42: 763-773.
- TSOUPRAS G., DE ANGELIS P., ZESIGER T., RENOUD J.M., TABACCHI R. (1988) – *Biologically active natural acetylenes from the culture medium of Eutypa lata*. *Bioactive Molecules*, 7: 93-100.
- TYAGI S., KRAMER F.R. (1996) – *Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization*. *Nature Biotechnology*, 14: 303-308.
- TYREE M.T., SPERRY J.S. (1989) – *Vulnerability of xylem to cavitation and embolism*. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 40: 19-38.
- TYSON G.E., STOJANOVIC B.J., KUKLINSKI R.F., DI VITTORIO T.J., SULLIVAN M.K. (1985) – *Scanning electron microscopy of Pierce's disease bacterium in petiolar xylem of grape vines*. *Phytopathology*, 75: 264-269.
- ÚRBEZ-TORRES J.R., LEAVITT G.M., GUERRERO J.C., GUEVARA J., GUBLER W.D. (2008) – *Identification and Pathogenicity of Lasiodiplodia theobromae and Diplodia seriata, the causal agents of bot canker disease of grapevines in Mexico*. *Plant Disease*, 9: 519-529.
- ÚRBEZ-TORRES J.R., LEAVITT G.M., VOEGEL T.M., GUBLER W.D. (2006) – *Identification and distribution of Botryosphaeria spp. associated with grapevine cankers in California*. *Plant Disease*, 90: 1490-1503.
- VAN ALFEN N.K. (1989) – *Reassessment of plant wilt toxins*. *Annual Reviews of Phytopathology*, 27: 533-550.
- VAN DEN WYMELENBERG A.J., CULLEN D., SPEAR R.N., SCHOENIKE B., ANDREWS J.H. (1997) – *Expression of green fluorescent protein in Aureobasidium pullulans and quantification of the fungus on leaf surfaces*. *Biotechniques*, 23: 686-690.
- VAN DER KOPPEL M.M., SCHOTS A. (1994) – *A double (monoclonal) antibody sandwich elisa for the detection of Verticillium sp. in roses*. In: SCHOTS A., DEWEY F.M., OLIVER R. (eds.), *Modern assays for plant pathogenic fungi: identification, detection and quantification*. CAB Int., Wallingford (UK), pp. 99-104.
- VAN DER WESTHUIZEN J.H. (1981) – *Voortplanting*. In: BURGER J., DEIST J. (eds.), *Wingerdbou in Suid-Afrika*, Maskew Miller, Cape Town, pp. 141-168.
- VAN ETTEN H.D., MANSFIELD J.W., BAILEY J.A., FARMER E.E. (1994) – *Two Classes of Plant Antibiotics: Phytoalexins versus "Phytoanticipins"*. *The Plant Cell*, 6 (9): 1191-1192.
- VAN NIEKERK J.M., CROUS P.W., GROENEWALD J.Z., FOURIE P.H., HALLEEN F. (2004) – *DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of Botryosphaeria species on grapevines*. *Mycologia*, 96: 781-798.
- VAN NIEKERK J.M., FOURIE P.H., HALLEEN F., CROUS P.W. (2006) – *Botryosphaeria spp. as grapevine trunk disease pathogens*. *Phytopathologia Mediterranea*, 45: S43-S54.
- VAN WEST P., REID B., CAMPBELL T.A., SANDROCK R.W., FRY W.E., KAMOUN S., GOW N.A.R. (1999) – *Green fluorescent protein (GFP) as a reporter Gene for the plant pathogenic oomycete Phytophthora palmivora*. *FEMS Microbiology Letters*, 178: 71-80.
- VAUTARD-MEY G., COTTON P., FEVRE M. (1999) – *Expression and compartmentation of the glucose repressor CRE1 from the phytopathogenic fungus Sclerotinia sclerotiorum*. *European Journal of Biochemistry*, 266: 252-259.
- VENKATASUBBIAH P., CHILTON W.S. (1990) – *Phytotoxins of Botryosphaeria obtusa*. *Journal of Natural Products*, 53: 1628-1630.
- VERCESI A., PRESUTTO P., PEZZETTO S. (2005) – *I vantaggi dell'applicazione di glucosio fosforilato e amminoacidi alla vite: una sperimentazione dell'efficacia dei biostimolanti su sviluppo vegetativo e produzione*. In: *Speciale biostimolanti*. *Phytomagazine*, 36. <http://www.agrimodena.it/biblioteca/biostimolanti.htm/>
- VIALA P. (1887) – *Les maladies de la vigne*. Coulet Ed., Montpellier; Delahaye et Lecrosnier Ed., Paris, (1985), 462 pp.
- VOLSCHEK H., VAN VUUREN H.J.J., VILJOEN-BLOOM M. (2006) – *Malic acid in wine: origin, function and metabolism during vinification*. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 27: 123-136.
- VON ARX J.A. (1987) – *Plant-pathogenic Fungi*. J. Cramer, Berlin.
- VON ARX J.A., MULLER E. (1954) – *Die Gattungen der amersporen Pyrenomyceten*. *Beiträge zur Kryptogamenflora der Schweiz*, 11 (1): 1-434.
- WALTER B., MARTELLI G.P. (1997) – *Clonal and sanitary selection of the grapevine*. In: WALTER B. (ed.), *Sanitary Selection of the Grapevine. Protocols for Detection of Viruses and Virus-like Diseases*. Les Colloques, No. 86, Paris, INRA Editions, pp. 43-95.
- WANG S., HAZELRIGG T. (1994) – *Implications for bcd mRNA localization from spatial distribution of Exu protein in Drosophila oogenesis*. *Nature*, 369: 400-403.
- WANG Y., CASADEVALL A. (1995) – *Decreased susceptibility of melanized Cryptococcus neoformans to UV light*. *Applied Environmental Microbiology*, 60: 3864-3866.
- WARD W. (1998) – *Biochemical and physical properties of green fluorescent protein*. In: CHALFIE M., KAIN S. (eds.), *Green fluorescent protein: properties, applications, and protocols*. Wiley-Liss, Inc., New York, NY-USA, pp. 45-75.
- WETMUR J.G. (1991) – *DNA probes: application of the principle of nucleic acid hybridization*. *Critical Review of Biochemical and Molecular Biology*, 26: 227-259.
- WHEELER M.H., BELL A.A. (1988) – *Melanins and their importance in pathogenic fungi*. *Current Topics in Medical Mycology*, 2: 338-387.
- WHITCOMBE D., THEAKER J., GUY S.P., BROWN T., LITTLE S. (1999) – *Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence*. *Natural Biotechnology*, 17: 804-807.

- WHITE T.J., BRUNS T.D., LEE S., TAYLOR J.W. (1990) – *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. In: INNIS M.A., GELFAND D.H., SNINSKY J.J., WHITE T.J. (eds.), *PCR protocols*. Academic Press, San Diego, CA-USA, pp. 315-322.
- WIGLESWOTH M.D., NESMITH W.C., SCHARDL C.L., LI D., SIEGEL M.R. (1994) – *Use of specific repetitive sequences on Peronospora tabacina for the early detection of the tobacco blue mold pathogen*. *Phytopathology*, 84: 425-430.
- WILLIAMS J.G.K., KUBELIK A.R., LIVAK K.J., RAFALSKI J.A., TINGEY S.V. (1990) – *DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers*. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531-6535.
- WILLIAMS J.G.K., KUBELIK A.R., RAFALSKI J.A., TINGEY S. (1991) – *Genetic analysis with RAPD markers*. In: BENNET J.W., LASURE L.L. (eds.), *More Gene manipulation in fungi*. Academic Press, San Diego, CA-USA, pp. 431-439.
- WOJTASZEK P. (1997) – *Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection*. *Biochemical Journal*, 322: 681-692.
- WOOD P.M., WOOD C.E. (2005) – *Cane dieback of Dawn Seedless table grapes (Vitis vinifera) in Western Australia caused by Botryosphaeria rhodina*. *Australasian Plant Pathology*, 34: 393-395.
- XIONG L.M., SCHUMAKER K.S., ZHU J.K. (2002) – *Cell signaling during cold, drought, and salt stress*. *Plant Cell*, 14: S165-S183.
- XIOUNG L., ZHU J.K. (2002) – *Molecular and genetic aspects of plant response to osmotic stress*. *Plant Cell and Environment*, 25: 131-139.
- XU F., TAO W.Y., CHENG L., GUO L.J. (2006) – *Formation and regeneration of protoplasts of taxol-producing endophytic fungus Fusarium maire*. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 25: 20-24.
- YANG T.T., CHENG L., KAIN S.R. (1996) – *Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein*. *Nucleic Acids Research*, 24: 4592-4593.
- ZEEVAART J.A.D., CREELMAN R.A. (1988) – *Metabolism and physiology of abscisic acid*. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 39: 439-474.
- ZEILINGER S., GALHAUP C., PAYER K., WOO S.L., MACH R.L., FEKETE C., LORITO M., KUBICEK C.P. (1999) – *Chitinase Gene expression during mycoparasitic interaction of Trichoderma harzianum with its host*. *Fungal Genetics and Biology*, 26: 131-140.
- ZHAO K., ZHOU D.P., PING W.X., GE J.P. (2004) – *Study on the preparation and regeneration of protoplast from taxol-producing fungus Nodulisporium sylviforme*. *Nature and Science*, 2: 52-59.
- ZHOU S., STRANOSZ G.R. (2001) – *Primers for amplification of mt SSU rDNA, and a phylogenetic study of Botryosphaeria and associated anamorphic fungi*. *Mycological Research*, 105: 1033-1044.
- ZHOU X., YAMIN W., HUIFANG Z., ZINAN W., JUAN L., LU L., KEXUAN T. (2008) – *Protoplast formation, regeneration and transformation from the taxol-producing fungus Ozonium sp.* *African Journal of Biotechnology*, 7: 2017-2024.

## Indice analitico degli Autori

- Alfonzo Antonio:** p. 171
- Agrelli Diana:** p. 296
- Amalfitano Carmine:** pp. 296, 403, 412, 421, 483
- Andolfi Anna:** pp. 214, 382, 442
- Andreini Lucia:** pp. 124, 261, 269, 272, 292, 435
- Bardi Elisa:** p. 241
- Bazzo Francesco:** p. 65
- Bellotto Diego:** p. 93
- Bergaglio Stefano:** p. 160
- Bertazza Gianpaolo:** p. 427
- Bertolla Claudio:** pp. 124, 261, 269, 272, 292
- Borgo Michele:** pp. 93, 186
- Braccini Piero:** p. 178
- Burrano Santa:** pp. 171, 191
- Calabrese Claudia:** p. 241
- Calamai Luca:** p. 232
- Calzarano Francesco:** pp. 132, 403, 412, 421, 483
- Cantalupo Livio:** p. 232
- Capparelli Rosanna:** p. 382
- Carlucci Antonia:** pp. 104, 162, 307, 472
- Caruso Giovanni:** pp. 124, 261, 264, 272, 292
- Cimmino Alessio:** p. 382
- Comparini Cecilia:** p. 232
- Conigliaro Gaetano:** p. 171
- Cravero Sergio:** p. 160
- Crous Pedro W.:** p. 375
- D'Agostino Vincenzo:** pp. 132, 403, 412, 421, 483
- Dal Cortivo Gianluca:** p. 93
- Del Carlo Michele:** pp. 403, 412, 421
- Demontis Angelo:** p. 104
- Di Marco Stefano:** pp. 136, 191, 427, 449, 456, 456, 475, 479, 489
- Essakhi Salwa:** p. 375
- Evidente Antonio:** pp. 214, 296, 382, 442
- Faretra Francesco:** pp. 93, 307
- Ferroni Giuseppe:** pp. 435, 468
- Frisullo Salvatore:** pp. 104, 162, 307, 472
- Ghironi Massimiliano:** p. 140
- Giorgini Alessio:** p. 241
- Groenewald Joannes Z.:** p. 375
- Gucci Riccardo:** pp. 124, 261, 269, 272, 292
- Guiggiani Marco:** p. 65
- Habib Wassim:** pp. 93, 307
- Iannaccone Marco:** p. 382
- Landi Lucia:** p. 388
- Ligos Virna:** pp. 104, 126, 165
- Lops Francesco:** pp. 104, 162, 307, 472
- Lucchetta Gianluca:** p. 93
- Mannoni Maria Angela:** pp. 93, 104, 126, 165
- Marchi Guido:** pp. 59, 65, 89, 122, 178, 191, 207, 214, 276
- Mattii Giovanni:** p. 241
- Michelon Lorenza:** pp. 104, 182
- Mondello Vincenzo:** p. 171
- Montanari Elio:** p. 26
- Mugnai Laura:** pp. 59, 65, 89, 178, 207, 214, 276, 375, 382, 489
- Murolo Sergio:** pp. 143, 388
- Nardi Sandro:** p. 143
- Natalini Giovanni:** p. 184
- Osti Fabio:** pp. 136, 191, 427, 456
- Paravidino Elisa:** p. 160
- Peduto Francesca:** pp. 214, 276
- Pellegrini Chiara:** pp. 104, 182
- Pertot Ilaria:** pp. 182, 191
- Pesenti Barili Beatrice:** p. 140
- Pichierrri Arianna:** p. 93
- Pizzichini Laura:** p. 143
- Pollastro Stefania:** pp. 93, 307
- Quaglia Mara:** p. 184
- Romanazzi Gianfranco:** pp. 143, 388
- Seghetti Leonardo:** pp. 403, 412, 421, 483
- Serra Salvatorica:** pp. 93, 104, 126, 165
- Scalabrelli Giancarlo:** pp. 124, 269, 272, 292, 435, 468
- Surico Giuseppe:** pp. 21, 35, 59, 65, 89, 178, 191, 207, 214, 276, 375, 382, 489, 493
- Torta Livio:** p. 171
- Viti Raffaella:** pp. 124, 269, 272, 292
- Zazzerini Antonio:** p. 104
- Zini Elisa:** p. 232



Finito di stampare  
nel marzo 2010  
a Firenze  
da Tipografia Il Bandino srl  
per conto di  
ARSIA Regione Toscana