



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN SCIENZE AGRARIE E DEL TERRITORIO

**RELAZIONE TRA DIMENSIONE DEI VASI
XILEMATICI DI CULTIVAR DI VITE E
INCIDENZA DEL MAL DELL'ESCA**

***RELATIONSHIP BETWEEN THE XILEM VESSEL
DIMENSION IN CULTIVARS OF GRAPEVINES AND
THE INCIDENCE OF ESCA DISEASE***

Relatore:

Prof. Gianfranco Romanazzi

**Studente:
Fabio Vagnoni**

Correlatore:

Dott.ssa Lucia Landi

ANNO ACCADEMICO 2018-2019

Indice

	Pag.
	3
	4
1	5
1.1	5
1.2	5
1.3	6
1.4	6
1.5	8
1.6	9
1.7	10
1.8	11
2	14
3	15
3.1	15
3.2	15
3.3	16
3.4	18
4	19
4.1	19
4.2	22
4.3	25
4.4	29
4.5	30
5	33
6	36
7	37
8	42

RIASSUNTO

Fra le malattie del legno della vite, il mal dell'esca è attualmente la più diffusa e grave in molte zone viticole del mondo, che provoca gravi perdite della produzione. Si tratta di una malattia complessa determinata da patogeni che colonizzano il legno. A tutt'oggi non sono state ancora individuate soluzioni di difesa diretta efficaci, e neanche cultivar (cv.) di vite resistenti, ma solo cv. con diversa suscettibilità alla malattia. Ricerche effettuate recentemente su vite hanno suggerito una possibile relazione tra la suscettibilità alle malattie vascolari e le dimensioni dei vasi xilematici, evidenziando l'esistenza di un rapporto tra la dimensione dei vasi xilematici e la proliferazione di uno degli agenti della malattia, *Phaeomoniella chlamydospora* inoculato in pianta.

Obiettivo di questa tesi è stato quello di analizzare il diametro medio e la densità dei vasi xilematici in 51 cv. di vite, di cui 24 cv. a bacca nera e 27 a bacca bianca, autoctone e/o internazionali, che da indagini precedentemente svolte mostravano una diversa suscettibilità all'esca. Tutte le piante erano allevate con il sistema a cordone speronato, nel campo sperimentale per la conservazione del germoplasma, collocato a Carassai (AP), nella regione Marche. Nel febbraio 2018, da cinque piante per ognuna delle cv. selezionate, sono stati campionate porzioni basali dello sperone. Per ogni cv. sono state analizzate 120 sezioni trasversali dalla porzione dorso-ventrali. Le sezioni sono state ottenute al microtomo dai frammenti internodali precedentemente fissati in formaldeide/acido acetico/alcool etilico (5:5:9). I risultati hanno evidenziato una variabilità nella dimensione e densità dei vasi tra le cv. sia a bacca bianca che a bacca nera ma nessuna correlazione lineare è stata osservata tra dimensione dei vasi e malattia in campo. Tuttavia, analizzando il dato medio complessivo, le cv. a bacca bianca hanno mostrato un diametro dei vasi e un'incidenza della malattia maggiore rispetto a quelle a bacca nera.

La ricerca ha evidenziato che le caratteristiche anatomiche dei vasi xilematici possono fornire informazioni utili per ulteriori indagini sulla relazione tra incidenza della malattia e caratteristiche delle cultivar.

ABSTRACT

Esca is one of the most destructive grapevine trunk diseases, responsible for economic loss due to the quality reduction of grape production. Esca is a complex disease caused by several pathogens that colonize the wood. To date, there are no cvs. that are resistant to such vascular diseases but only cvs. with different susceptibility to this disease. Previous studies shown a possible relationship between the susceptibility to vascular diseases and xylem vessels, highlighting the existence of an association between xylem vessels dimension and the proliferation of one of the agents of the disease, *Phaeomoniella chlamydospora*, that was inoculated in the plants.

The aim of this study was analyzed diameters and density of xylem vessels on 51 cvs., of which 24 red berried and 27 white berried cvs. previously analyzed for disease incidence and which showed a different susceptibility to esca. Samples were collected in February 2018, from basal spurs (cordon) growth an experimental vineyard for germplasm of the Agency for Services in the Agro-Food Sector of Marche Region (ASSAM) located in Carassai (AP), in the Marche region, central-eastern Italy. For each cvs. the cordons were collected from five plants. The microscope investigation was carried according to 120 cordons cross-sections obtained using a cryostat microtome, from internodal fragments previously fixed in formaldehyde/acetic acid/ethyl alcohol (5:5:9). The results showed significant differences in the xylem vessel parameters in both, red berried and white berried cvs.. However, no linear relationship was detected between vessel size and esca incidence in the field. Overall average data showed a higher diameter size in the white berried compared to red berried cvs.. At the same way, higher incidence of the disease was observed in white berried against red berried cvs.. We conclude that vessel anatomy profiles can provide useful information for further investigations on grapevine genotype structure–esca incidence relationships.

1. Introduzione

1.1 Mal dell'Esca

Il mal dell'esca rappresenta una delle malattie più complesse della vite. Si tratta di una fitopatia nota da secoli ai viticoltori che colpisce impianti vecchi, ma anche viti giovani, compromettendo l'investimento del nuovo vigneto. La complessità è dovuta principalmente al coinvolgimento di diversi patogeni presenti nello stesso ambiente che agiscono in combinazione e successione. Questo ha come risultato il concorso o sovrapposizione malattie presenti anche in punti diversi della pianta (Surico, 2000; Crous et al., 1996; Mugnai et al., 2010).

1.2 Cenni storici

La malattia era nota fin dai tempi dei Romani e dei Greci che ne avevano già osservati i sintomi. Solo nel Medioevo descrizioni più accurate della malattia sono state ritrovate in manoscritti come *Kitab al-Felahah* di Ibn al-Awam, spagnolo vissuto a Siviglia alla fine del dodicesimo secolo e nell'*Opus Ruralium Commodorum* di Piero de' Crescenzi, nato attorno al 1233 a Bologna (Mugnai et al., 1999). A partire dallo scorso secolo si sono approfondite le conoscenze sulla sua eziologia, biologia ed epidemiologia. La causa della malattia, ed in particolare della sua forma acuta (apoplessia), è stata attribuita in passato a disturbi di tipo fisiologico e solo verso la fine del 1800 è stata individuata la presenza di funghi nei tessuti interni del fusto delle piante sintomatiche. All'inizio del Novecento il patologo Lionello Petri aveva osservato che, oltre alla carie, le piante malate potevano presentare delle striature brunonere, tuttavia per molti anni si è creduto che la carie del legno fosse la causa unica e principale di sofferenza della pianta, dimenticando così in parte gli studi condotti da Petri nel 1990. A seguito del divieto all'utilizzo dell'arsenito di sodio posto in alcuni paesi europei (in quanto cancerogeno), si è registrata una recrudescenza della malattia, che iniziò ad essere un problema anche per le viti di giovane età (Mugnai et al., 1999). Il nome della malattia (utilizzato anche fuori dell'Italia) deriva proprio dal fatto che il legno alterato dalla presenza di carie, fungeva da ottima "esca" per il fuoco (Belli, 2011).

1.3 Funghi associati alla malattia

I funghi associati alla patologia sono rappresentati in una prima fase da ascomiceti tracheomicotici come, *Phaemoniella chlamydospora* (*Pch*), *Phaeoacremonium aleophilium* (*Pal*) e specie come, *P. angustius*, *P. inflatipes*, *P. mortoniae*, *P. parasiticum*, oltre a *Cephalosporium* spp., *E. lata* e *Phytophthora parasitica*. Questi funghi producono delle tossine nel tessuto vascolare della pianta, che conferiscono alla chioma le caratteristiche tigrature e ai grappoli delle maculature. Le piante infette riescono ad attuare internamente sistemi di difesa di origine fisica e chimica, costituite da talle e da produzione di trans-resveratrolo, ma non sono sufficienti per contrastare il decorso della malattia. In un secondo momento entrano in azione i funghi responsabili della carie bianca del legno come i basidiomiceti *F. mediterranea* (*Fomed*), *Stereum hirsutum* (Quélet) e *Fomes igniarius* (Kickx), (Bruno e Sparapano, 2007; Di Marco et al., 2011).

1.4 Stadi della malattia e sintomi relativi ad ogni stadio del “complesso del mal dell’esca”

L’esca viene nominata come malattia complessa, perché può dar luogo a sintomi diversi composti da ‘**venature brune delle barbatelle**’, ‘**malattia di Petri**’ (o “Black goo”), ‘**esca giovane**’, ‘**carie bianca**’ ed ‘**esca propria**’.

- **Le venature brune delle barbatelle** - In questo stadio la barbatella non mostra i sintomi esterni, ma presenta internamente delle striature bruno-nerastre accompagnate dalla presenza di gomme brune nei vasi. Per questo tipo di infezioni che si riscontrano in campo nei primi anni d’impianto, le cause vanno ricercate principalmente nel materiale vivaistico infetto (Sidoti et al., 2001).
- **La malattia di Petri** - Colpisce le viti molto giovani causando una crescita stentata della pianta e, in qualche caso portando anche alla morte a questo stadio dello sviluppo della pianta. Con il passare degli anni evolve in esca giovane e/o in esca propria. Uno dei sintomi visibili anche all’esterno è rappresentato dalla caratteristica fuoriuscita di materiale gommoso scuro e dall’aspetto catramoso (Mugnai et al., 1999). Un altro sintomo spesso presente è la clorosi del fogliame. In questa fase della malattia si osservano dei gradual declini della vigoria della pianta con perdita nella produzione, (Feliciano et al., 2004).

- **Carie bianca** - Lo sviluppo della carie bianca si ha quando le viti sono invase dal fungo basidiomicete *Fomed*, il quale decompone la lignina e forma il marciume del legno. In alcuni casi la carie raggiunge anche la superficie esterna causando la formazione di fratture lungo il tronco da cui deriva il nome di “mal dello spacco” (Mugnai et al., 2010). Il legno infetto, all’interno delle piante assume le sembianze di una massa spugnosa, friabile, di colore bianco-giallastro (Michelon et al., 2007). Quando, nella pianta si sovrappone l’esca giovane e la carie bianca, si manifesta l’esca propria.
- **Esca giovane** - L’esca giovane interessa piante di 3 - 4 o più anni. In questa fase sono visibili i tipici sintomi fogliari dell’esca rappresentati da striature rossastre tigrate. I primi 3 stadi sono provocati dalla presenza di *Pch* e/o *Pal*; invece si parla di carie bianca e l’esca propria quando agli agenti indicati si riscontra anche la presenza di *Fomed* (Pellegrini e Michelon, 2007). L’esca giovane può insorgere anche in campo infettando materiale di propagazione sano (Mugnai et al., 2010). I sintomi caratteristici sono dati dalle tipiche tigrature fogliari, nelle quali la necrosi del tessuto inizia dal margine fogliare, ma non interessa le nervature. Nelle varietà a bacca rossa, le tigrature delle foglie sono composte da una linea di colore viola, tra la zona necrotica e quella clorotica. Invece, i sintomi sugli acini sono rappresentati da macchie marroni scure, le quali possono necrotizzare e causare spaccature superficiali, dove possono insediarsi agenti di marciumi. Un altro sintomo importante dal punto di vista economico-quantitativo, è dato dal disseccamento di infiorescenze e grappoli, quindi la perdita dell’intera produzione viticola. La sintomatologia interna è costituita da imbrunimento e da necrosi bruno/bruno-chiare dei vasi xilematici, nel ceppo e/o nelle branche. In genere gli imbrunimenti all’interno del legno sono collegati a ferite provocate dalla potatura o dalla spollonatura (Mugnai et al., 2010).
- **Esca propria** - L’esca propria può sfociare in due diverse evoluzioni della malattia, di tipo cronico o di tipo acuto, che possono essere presenti, insieme o singolarmente, sulla stessa pianta (Petit et al., 2006). Il decorso cronico inizia a comparire all’inizio dell’estate, manifestando i classici sintomi descritti precedentemente, causando anche una prematura caduta delle foglie (Pellegrini e Michelon, 2007). Favorito da estati calde, in particolare quando a periodi piovosi segue un caldo secco (Mugnai et al.,

1999), la malattia va incontro ad un decorso cronico e alla manifestazione del colpo apoplettico e morte della pianta.

1.5 Fattori che condizionano la manifestazione dei sintomi

L'espressione dei sintomi esterni dell'esca cronica (così come quelli dell'esca giovane) si pensa siano dovuti a fattori di virulenza prodotti da *Pch* e *Pal*, che tramite il flusso xilematico vengono traslocati dall'area infetta alla chioma. Questi fattori di virulenza comprendono soprattutto enzimi esocellulari e fitotossine. Non si esclude comunque che possano essere coinvolti anche fenomeni di stress idrici dovuti all'occlusione di buona parte dei vasi xilematici, in seguito alla produzione da parte della pianta di tulle e gomme. Il fatto poi che spesso i primi sintomi a comparire sulle foglie siano rappresentati da clorosi può indicare un'alterazione dell'apparato fotosintetico e, quindi, del metabolismo dei carboidrati (Marchi et al., 2010). Nel campo degli enzimi, i due ascomiceti *Pch* e *Pal* producono enzimi esocellulari composti da β -glucosidasi e da endo-1,4- β -glucanasi, i quali sono coinvolti nella degradazione della cellulosa (Mugnai et al., 1997). *Pch* e *Pal* producono anche enzimi pectinolitici capaci di lacerare i tessuti e invadere la pianta, seguendo una via parenchimatosa e vascolare (Marchi et al., 2010). Inoltre, è stata quantificata una produzione elevata di amilasi da parte di *Pch* e *Pal*. Questi funghi sono in grado di utilizzare gli elementi nutritivi resi disponibili nei tessuti danneggiati come l'amido immagazzinato in abbondanza nei raggi parenchimatici. L'esame microscopico di sezioni trasversali di legno infetto dal mal dell'esca, ha mostrato l'esaurimento totale dell'amido nel tessuto xilematico che circonda le venature brune (Mugnai et al., 1999). Il basidiomicete *Fomed* produce la laccasi, la perossidasi e la fenolossidasi, enzimi coinvolti nella degradazione della lignina, oltre alla produzione dei due enzimi cellulolitici riscontrati in *Pch* e *Pal*.

Caratteristica delle piante affette da mal dall'esca è la discontinuità dell'espressione dei sintomi esterni. Una pianta infetta attraversa una fase latente e non manifesta subito i sintomi dell'esca, a causa dei miceti coinvolti che devono superare una prima fase endofitica. Inoltre, quando la pianta manifesta i tipici sintomi sulle foglie non è detto che li manifesti anche gli anni successivi in maniera continua (Surico et al., 2000; Murolo e Romanazzi, 2014; Borgo et al., 2016). Le motivazioni vanno ricercate nelle caratteristiche genetiche delle cultivar (cv.) e nell'interazione che esse hanno con i patogeni (Landi et al., 2012), ma anche i fattori ambientali

(suolo, altitudine, latitudine ed esposizione), e l'andamento climatico stagionale possono influenzare la variabilità stagionale nella manifestazione dei sintomi (Borgo, 2019). Di solito, i genotipi vegetali più tolleranti alle malattie vascolari, nonostante la colonizzazione dei patogeni, mostrano sintomi meno gravi rispetto ai genotipi sensibili. Ciò suggerisce che le piante tolleranti possono neutralizzare gli effetti dei fattori di virulenza prodotti da questi agenti patogeni (Beckman e Roberts, 1995). Ciò influenza la colonizzazione dell'ospite da parte delle spore trasportate nello xilema dal flusso di linfa e dalla crescita ifale. Questi ospiti che sono più tolleranti ai patogeni compensano rapidamente la perdita di vasi xilematici a causa della compartimentazione dei patogeni, differenziando nuovi vasi funzionali per mantenere una conduttività sufficiente, il che potrebbe anche spiegare la tolleranza alle malattie da appassimento (Talboys, 1972; Fradin e Thomma, 2006).

1.6 Cenni epidemiologici

L'infezione di tale patologia può avvenire sia in vivaio e sia in vigneto. Da alcuni studi effettuati in vivaio, si è osservato che le barbatelle che vengono utilizzate per l'impianto del vigneto sono già infette. Tale infezione è causata sia dalle piante madri infette che dalla contaminazione che si verifica durante il processo di propagazione (Gramaje e Armengol, 2011). Una volta in campo le giovani barbatelle infette daranno origine a piante che mostreranno in futuro i sintomi della malattia di Petri (Marchi et al., 2010). È stato ipotizzato che le barbatelle possono essere infettate da *Pch* tramite clamidospore presenti nel terreno, le quali formano conidi in grado di penetrare le radici illese delle viti (Bertelli et al., 1998; Feliciano et al., 2004). La presenza del fungo nel suolo dei vivai è stata accertata tramite analisi molecolare PCR, dimostrando che il terreno è una possibile fonte di inoculo di *Pch*. Le infezioni sembrano verificarsi in tutte le fasi del processo di propagazione della vite, perché le ferite prodotte in queste fasi sono numerose e costituiscono una via di penetrazione per i funghi del legno. In particolare, quando le talee e i nesti vengono idratati (per 12-24 ore) prima della frigoconservazione, e durante la reidratazione sia prima che dopo l'innesto, si verificano le condizioni termoisometriche ideali per la sporulazione e la dispersione dei conidi del fungo tracheomicotico.

Per quanto riguarda le infezioni che hanno origine dal vigneto, i patogeni riescono ad infettare le piante, entrando attraverso le ferite provocate durante la potatura invernale e la spollonatura. Per questo motivo, la potatura deve essere effettuata più tardi possibile, in quanto la cicatrizzazione dei tagli avviene più velocemente in prossimità del risveglio vegetativo (Frisullo et al., 2010). I conidi e le spore prodotti dai funghi e diffusi per via aerea si depositano sulla ferita e danno inizio al processo infettivo, in concomitanza di eventi piovosi (Frisullo et al., 2010). Infatti la maggior via di diffusione dei funghi è l'acqua piovana che, nella sua caduta, trascina le spore sospese nell'aria e ne preleva altre scorrendo lungo i rami e i tronchi delle piante (Michelon e Pellegrini, 2007). Le strutture riproduttive dei funghi coinvolti sono caratterizzate per *Pch* da picnidi o conidiofori liberi che si riscontrano sulle vecchie ferite o sulle anfrattuosità del ritidoma (sola fase riproduttiva asessuata) (Edwards et al., 2001). La forma teleomorfa di *Pal*, *Togninia minima*, forma ascocarpi negli stessi siti di *Pch* (Rooney-Latham et al., 2005). In fine *Fomed* forma basidiocarpi su diverse specie arboree, lungo il fusto e su vecchi tralci di vite.

1.7 Difesa dall'esca

Ad oggi, la lotta più efficace a tale patologia rimane quella agronomica, rappresentata dalla potatura, spollonatura e anche dalla gestione agronomica del terreno. La potatura riveste un ruolo fondamentale, perché attraverso le ferite provocate dai tagli di potatura, si aprono vie d'ingresso per i patogeni; quindi si devono evitare tagli di ritorno importanti e capitozzature, applicando dei principi base come la ramificazione, la continuità del flusso linfatico, e il mantenimento del legno di rispetto, onde evitare il cono di disseccamento all'interno del legno (Simonit e Sirch, 2014). Per quanto riguarda la spollonatura, deve essere effettuata nel momento ottimale, cioè il pollone non deve avere lignificazioni e inoltre, si devono utilizzare attrezzature idonee, le quali non creino ferite o lacerazioni al fusto della pianta. Anche la gestione del suolo svolge un'importante funzione di difesa contro questa malattia del legno, infatti negli ultimi anni molte aziende vitivinicole, stanno adottando tecniche di lavorazione conservative e inerbimenti, allo scopo di contrastare tali patologie con l'aumento della fertilità biologica e della biodiversità microbica nei terreni vitati. Nell'ultimo decennio si sono sviluppati formulati a base di *Trichoderma asperellum*, *T. gamsii* e recentemente a base di *T.*

atroviride SCI (isolato da legno di nocciolo), tali antagonisti sono capaci di prevenire e limitare le infezioni di mal dell'esca.

La dispersione delle spore dei suddetti funghi avviene per mezzo di acqua e vento, infatti le piogge forti battendo sul terreno, provocano degli spruzzi che trasferiscono sulla vegetazione sovrastante le spore presenti sul suolo (Ferri, 1985). Per tale motivo la copertura erbacea interfilare nei vigneti, svolge un ruolo importante nella riduzione delle spore che possono infettare le viti, che si può attuare ad esempio con una pacciamatura vegetale (cover crop) un roller crimper. Infatti, uno studio recente evidenzia che la microflora del suolo influenza direttamente lo sviluppo della malattia (Nerva et al., 2019).

1.8 Interazione tra la morfologia dei vasi xilematici e lo sviluppo dei patogeni

Nel mal dell'esca che coinvolge i tessuti legnosi, la pianta ospite può contenere la diffusione dell'agente patogeno attraverso la riduzione del lume spaziale dei vasi xilematici della pianta, o attraverso la produzione di gel e lo sviluppo di tilosi che occludono i vasi e intrappolano l'agente patogeno (Fradin e Thomma, 2006; Yadeta e Thomma, 2013). In questo contesto la morfologia dei vasi xilematici può avere un impatto fondamentale sullo sviluppo della malattia.

Lo xilema è un organo fondamentale nelle piante che garantisce un trasporto efficiente dell'acqua dalle radici alle foglie. L'efficienza del trasporto di acqua negli alberi e la capacità dello xilema di preservare la conduttività sotto stress abiotico (Choat et al., 2012; Silvertown et al., 2015) e biotico (Santini et al., 2013) sono caratteristiche chiave che modellano la forma fisica della pianta. Molte funzioni dello xilema sono guidate dalle proprietà anatomiche e strutturali del sistema vascolare. Ad esempio, il diametro del vaso xilematico influisce sulla resistenza alla cavitazione indotta dalla siccità perché vasi larghi spesso cavitano a potenziali idrici meno negativi rispetto a vasi di dimensioni inferiori (Pockman e Sperry, 2000; Wheeler et al., 2005; Martinez-Vilalta et al., 2012). Inoltre, la velocità di trasporto attraverso i vasi xilematici è direttamente proporzionale alla dimensione dei vasi stessi (Sperry e Tyree, 1988; Santiago et al., 2004). Inoltre, è stato proposto che il diametro dei vasi xilematici influisce sulla resistenza delle piante a malattie vascolari perché i piccoli vasi possono essere occlusi con tilosi e gel più velocemente di quelli ampi (Solla e Gil, 2002; Pouzoulet et al. 2017). Sia la

cavitazione dello xilema dovuta alla siccità, che l'occlusione dello xilema a causa di infezioni patogene, inducono la perdita delle funzioni idrauliche della pianta, che possono portare ad avvizzimento e alla morte della pianta.

La cavitazione dello xilema è stata ben studiata, mentre l'occlusione dei vasi rimane puramente descrittiva anche se è una risposta critica a lesioni da ferimento e compartimentazione di agenti patogeni vascolari (Beckman e Roberts, 1995; Sun et al., 2007; De Micco et al., 2016). A differenza della cavitazione, l'occlusione non è reversibile e spesso le piante guariscono dalla perdita della funzione vascolare rigenerando nuovi vasi dalle cellule cambiali (Fradin e Thomma, 2006; Brodersen e McElrone, 2013). Nei sistemi agricoli, lo stato dell'acqua delle piante e la conduttività dello xilema sono attentamente monitorati e spesso mantenuti alla massima capacità attraverso un'adeguata irrigazione per garantire una resa ottimale delle colture. Tuttavia, l'integrità e la funzione del sistema vascolare nelle colture perenni sono spesso compromesse a seguito di ferite e successiva infezione da agenti patogeni vascolari. Alberi e viti devono essere potati per mantenere un'alta resa e qualità dei frutti, il che espone il sistema vascolare ospite all'infezione da patogeni (Rolshausen et al., 2010). Una volta infettata, la pianta perde integrità delle funzioni vascolari e subisce una perdita di crescita vegetativa e produttività delle colture che peggiora nel tempo. L'occlusione dei vasi con tilosi e gel è un aspetto critico della risposta di difesa delle piante ad agenti patogeni (Shigo e Marx, 1977). Prove sperimentali su colture annuali come il pomodoro (*Solanum lycopersicum*) hanno determinato che la tempistica dell'occlusione è un fattore determinante per una compartimentalizzazione riuscita dei funghi vascolari all'interno del sistema vascolare delle piante (Beckman e Roberts, 1995). È stato osservato che in genotipi *Ulmus* affetti dalla malattia dell'olmo olandese, che è una malattia da appassimento causata da *Ophiostoma novo-ulmi* (Brasier, 1991), il diametro dei vasi ha un ruolo importante nella resistenza, per cui gli ospiti sensibili hanno proporzioni più elevate del diametro dei vasi, rispetto ai genotipi resistenti (Solla e Gil, 2002; Venturas et al., 2013).

Studi effettuati negli ultimi anni in vite hanno evidenziato che, la quantità di *P. chlamydospora* inoculata e la lunghezza della lesione necrotica è correlata alla dimensione del vaso (Pouzoulet et al., 2017). Pertanto, è stato suggerito che il diametro del vaso xilematico influenza la suscettibilità alla malattia nella vite, e può spiegare potenzialmente le differenze tra gli ospiti altamente sensibili e tolleranti all'esca (Pouzoulet et al., 2014, Pouzoulet et al.,

2017). Questi studi hanno evidenziato come la dimensione dei vasi xilematici delle diverse cv. influenzi direttamente la progressione della malattia, infatti se i vasi sono di dimensione superiori, le gomme prodotte dalle piante, impiegano più tempo per otturarli completamente (Pouzoulet et al., 2017).

A supporto di tale teoria, recentemente un modello sperimentale proposto per la vite ha evidenziato che il diametro dei vasi è un fattore determinante per la tempistica della loro occlusione (Pouzoulet et al., 2019). Gli studi effettuati, suggeriscono la necessità di approfondire la relazione esistente tra morfologia vasi xilematici e la suscettibilità alla malattia coinvolgendo un numero più elevato di cv.

2. SCOPO DELLA TESI

Il mal dell'esca rappresenta la più importante malattia del legno, che colpisce le viti coltivate in tutto il globo terrestre. Si tratta di una sindrome complessa determinata dalla sovrapposizione, o piuttosto in alcuni casi, dalla successione di una tracheomicosi di cui i principali agenti causali *P. clamospora* e *P. aleophylum*, e di una carie principalmente causata da *F. mediterranea* (Mugnai et al., 1999 Bruno e Sparapano, 2007). Ritenuta per lungo tempo un'esclusiva dei vigneti vecchi, il mal dell'esca è stato negli ultimi anni causa di deperimento anche di viti molto giovani. La crescente diffusione della malattia ha originato seri problemi per la viticoltura, in Italia e all'estero, stimolando l'approfondimento delle conoscenze su aspetti epidemiologici, biologici e fisiologici. Nonostante numerosi siano i fattori che interferiscono sulla malattia, in primo luogo quelli climatici e quelli associati al suolo, è noto che tutte le specie del genere *Vitis*, utilizzabili come cv. o portinnesti, sembrano essere suscettibili alla malattia. È altrettanto noto che esiste una variabilità molto elevata sul grado di suscettibilità alla malattia tra cv. e che i mezzi di lotta disponibili sono scarsamente efficaci.

In questo contesto si è ritenuto opportuno analizzare alcune caratteristiche anatomiche principali ove i patogeni associati alla malattia si muovono e agiscono: il tessuto xilematico. La scelta dei parametri da analizzare è stata suggerita da studi effettuati su alcune cv. commerciali allevate in vaso, che hanno mostrato una possibile relazione tra suscettibilità alle malattie vascolari e dimensioni dei vasi xilematici (Pouzoulet et al., 2014). Inoltre, dall'evidenza che esiste una relazione tra dimensione dei vasi xilematici e proliferazione di uno degli agenti della malattia, *P. chlamydospora* inoculato in pianta (Pouzoulet et al., 2017). Il lavoro presentato in questa tesi ha avuto come scopo principale quello di analizzare il diametro medio e la densità dei vasi xilematici in un numero elevato di cv. a bacca nera (24 cv.) e a bacca bianca (27 cv.) tutte allevate nel campo sperimentale per la conservazione del germoplasma curato dell'Agenzia Servizi Settore Agroalimentare delle Marche (ASSAM), collocato a Carassai (AP), nella regione Marche. I valori rilevati sono stati correlati con quelli relativi all'incidenza da esca precedentemente analizzati per le medesime cv. nello stesso campo sperimentale (Murolo e Romanazzi, 2014). Lo studio delle caratteristiche dei vasi xilematici può fornire informazioni utili alla comprensione delle dinamiche del mal dell'esca in campo.

3. MATERIALI E METODI

3.1 *Sito di campionamento*

La sperimentazione è stata realizzata in un vigneto di conservazione del germoplasma, situato a Carassai (AP), regione Marche, a 158 m s.l.m. (43°02'18.07''N;13°39'39.41''E), (Fig. 1) gestito dall'Agenzia Servizi del Settore Agroalimentare delle Marche (ASSAM). Il vigneto impiantato nel 1989, è allevato a cordone speronato con sesto d'impianto 3 × 1, su portinnesto Kober 5BB. Lo studio ha coinvolto 24 cv. a bacca nera e 27 cv. a bacca bianca. Studi precedenti realizzati nel vigneto hanno evidenziato la differente incidenza al mal dell'esca nelle cv. allevate (Murolo e Romanazzi, 2014).



Fig. 1 – Collocazione del vigneto situato a Carassai (AP), regione Marche.

3.2 *Indagine preliminare*

Con lo scopo di mettere a punto il metodo d'indagine e il numero di ripetizioni necessarie alla realizzazione della prova sperimentale, nell'inverno 2017-2018 sono state individuate due cv.: Passerina, a bacca bianca e Montepulciano, a bacca nera. Per ogni cv. sono state selezionate 5 piante. Da ogni pianta sono state selezionati 3 tralci. I frammenti legnosi di ogni tralcio, di 8-15 mm di diametro e 30-50 mm di lunghezza,

sono stati processati per l'analisi al microscopio per valutare il diametro medio dei vasi xilematici (vedi paragrafo 3.3). Questo studio preliminare è stato realizzato misurando 105 vasi per ogni pianta, 35 per ogni tralcio, per un totale di 525 vasi per ogni cv.. Non avendo osservato una variabilità significativa tra i tralci di ogni pianta, come mostrato nei risultati, si è deciso di procedere nel febbraio 2018 alla selezione di 5 piante per ognuna delle cv. analizzate. Da ogni pianta è stato campionato uno sperone di 1 anno contenente 2-3 internodi di 5 piante diverse. Da ciascun sperone, si sono ottenuti diversi segmenti, ognuno dei quali aveva la dimensione di 8-15 mm di diametro e 30-50 mm di lunghezza. Questi frammenti internodali sono stati processati per l'analisi al microscopio dei vasi xilematici come di seguito indicato.

3.3 Valutazione del diametro e della frequenza dei vasi xilematici

Le misure del diametro tangenziale e della frequenza dei vasi sono state eseguite sulle sezioni dei tralci o dello sperone, come descritto da Scholz et al. (2013). Per ogni pianta, sono stati fissati i frammenti degli internodi in formaldeide/acido acetico/alcool etilico (FAA) (5/5/9; Sigma – Aldrich, St Louis, MO, USA) per 48 ore a 4° C. Successivamente, sono stati risciacquati in acqua deionizzata e conservati a 4 ° C in etanolo all'80% (Fig. 2).



Fig. 2– Frammenti internodali fissati in FAA.

Le sezioni trasversali di spessore 100 micron sono state ottenute utilizzando un microtomo criostato (MICROM HM 505 E) settato a -25° C. Successivamente, le sezioni sono state colorate con una soluzione di Toluidina O 0,05%, pH 4,3 (Sigma – Aldrich). Le misure dei diametri e della frequenza dei vasi xilematici sono state effettuate al microscopio ottico verticale (Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Germania) con ingrandimento 4 \times , dotato di una fotocamera digitale (Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Germania) e utilizzando il righello dell'applicazione del software X Entry (Alexasoft, Firenze, Italia). Per ogni sezione, il numero dei vasi e le densità dei vasi sono stati valutati secondo una griglia software automatica di 1 mm² posizionata in posizione dorso-ventrale della sezione (Alexasoft) (Fig. 3). Per ogni pianta sono state analizzate 3 sezioni.

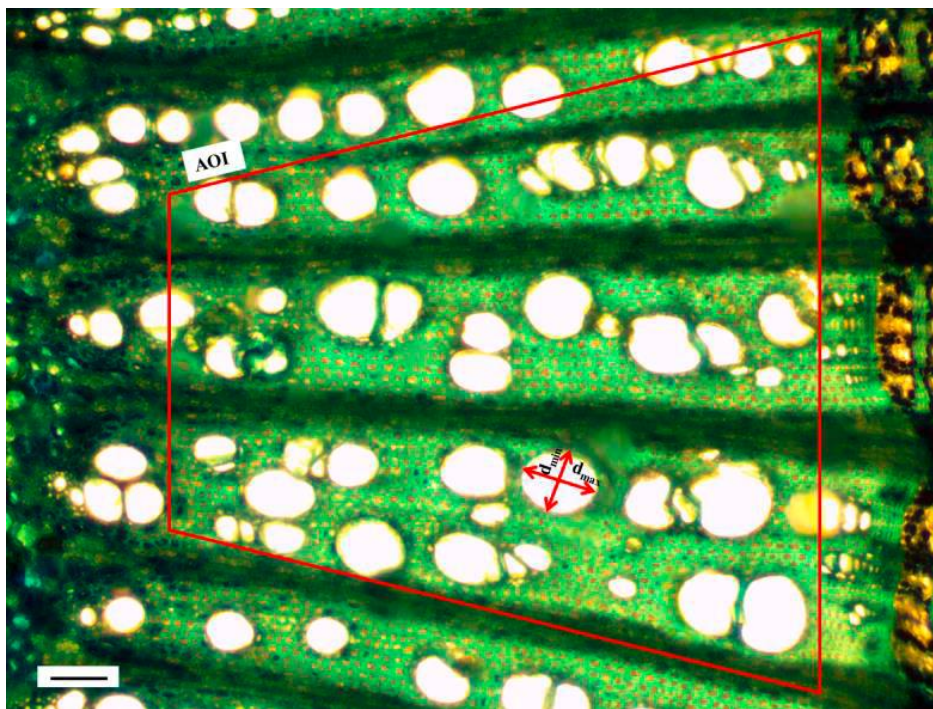


Fig. 3 – Sezione trasversale dello sperone. Il poligono rosso posizionato nell'area xilematica di interesse (AOI), mostra in posizione dorso-ventrale il diametro minimo (dmin) e massimo (dmax) considerato per ogni vaso. Ingrandimento 4 \times , 100 micron.

I diametri tangenziali dei vasi sono stati calcolati misurando la media dei diametri minimo e massimo per ogni vaso, considerando almeno 120 vasi xilematici per cv. La densità dei vasi è stata quantificata contando la media del numero dei vasi per 1 mm². Sono stati considerati nove classi di diametro: 40-59 micron, 60-79 micron, 80-99 µm, 100-119 µm, 120-139 µm, 140-159 µm, 160-179 µm, 180-199 µm e infine > 200 µm, due in più rispetto a quelle valutate da Pouzoulet et al. (2017). La frequenza di ogni classe di diametro è stata determinata utilizzando Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA).

3.4 Analisi statistica

Il diametro tangenziale e la densità dei vasi di ciascuna cv., sono stati sottoposti ad analisi unidirezionale della varianza (ANOVA), utilizzando la differenza minima significativa protetta (LSD) di Fisher test, a $p \leq 0.05$ e ≤ 0.01 (Statsoft, Tulsa, OK, USA).

4. RISULTATI

4.1 Indagine preliminare

L'indagine preliminare che ha coinvolto le cv. a bacca bianca Passerina e Montepulciano a bacca nera, ha evidenziato che, per Montepulciano non si sono osservate differenze tra i tralci di ciascuna pianta (Fig. 5). Per quanto riguarda la cv. Passerina, si è evidenziato che tra i tralci di ciascuna pianta non sono state evidenziate differenze significative, tranne che per la pianta P1 (Fig. 6).

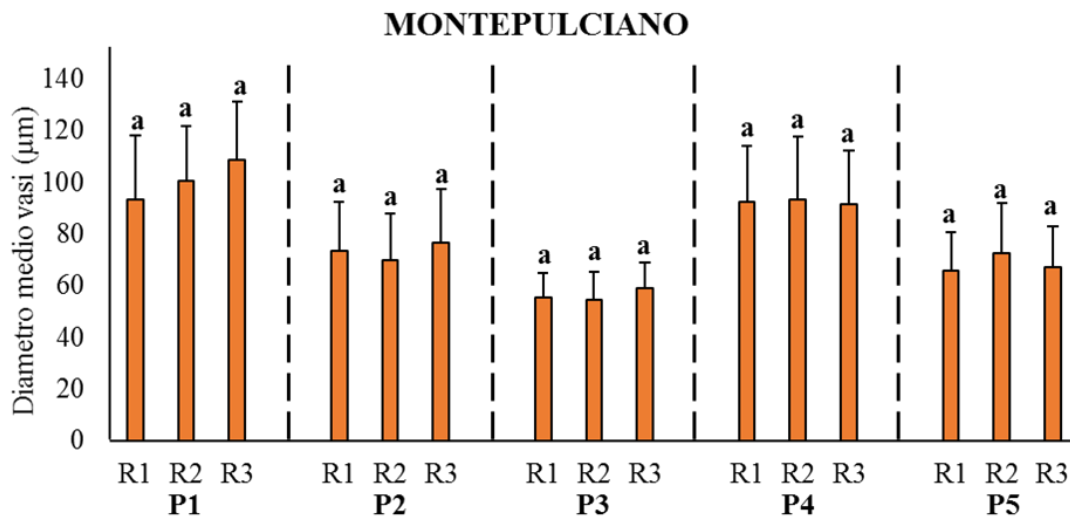


Fig. 5 - Diametro medio dei vasi xilematici per ogni tralcio (R) di ciascuna pianta (P) relativo alla cv. Montepulciano. Ogni colonna del grafico mostra il valore medio e la deviazione standard. Lettere uguali tra le colonne indicano che non ci sono differenze significative tra le ripetizioni di ciascuna pianta (Fisher's tests; $p \leq 0.05$).

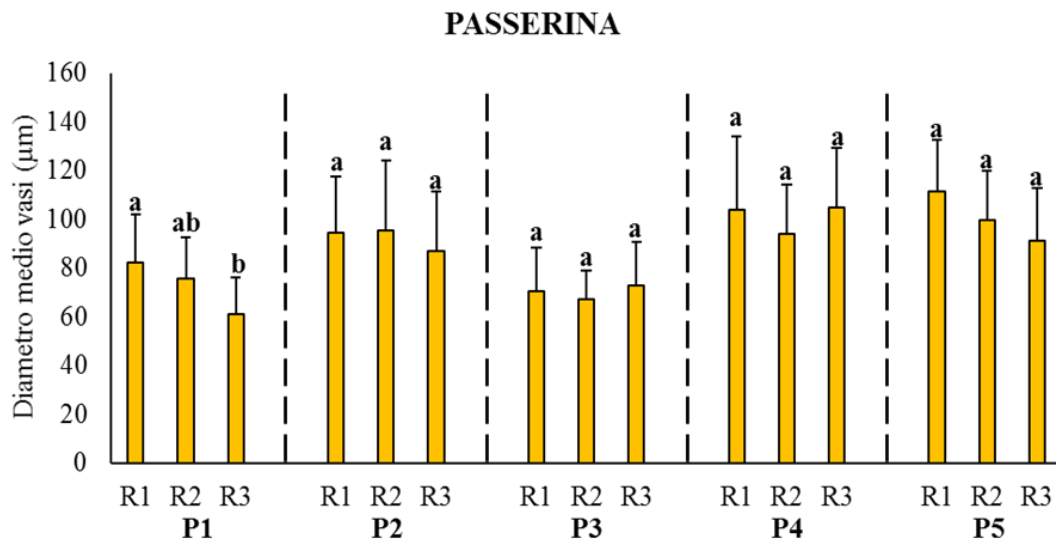


Fig. 6 - Diametro medio dei vasi xilematici per ogni tralcio (R) di ciascuna pianta (P) relativo alla cv. Passerina. Ogni colonna del grafico mostra il valore medio e la deviazione standard. Lettere differenti tra le colonne indicano differenze significative tra le ripetizioni di ciascuna pianta (Fisher's tests; $p \leq 0.05$).

Differenze si sono osservate tra le piante analizzate per entrambe le cv. (Fig. 7).

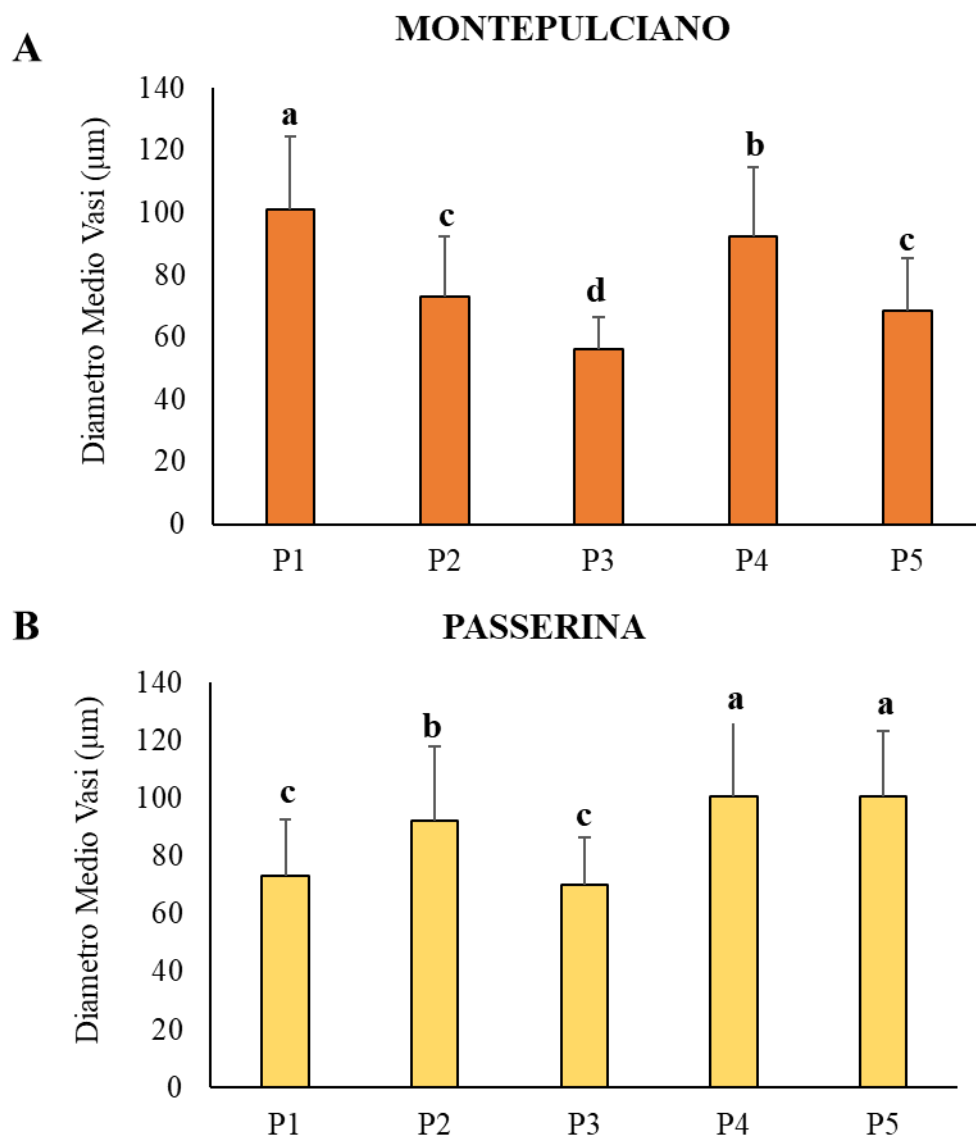


Fig. 7 - Diametro medio dei vasi xilematici relativo ad ogni pianta per la cv. Montepulciano (**A**), e Passerina (**B**). Ogni colonna del grafico mostra il valore medio e la deviazione standard. Lettere differenti tra le colonne indicano differenze significative le piante (Fisher's tests; $p \leq 0.05$).

4.2 *Diametro medio dei vasi xilematici*

In generale, l'analisi ha mostrato un'elevata variabilità nella dimensione dei vasi tra le diverse cv (Fig. 8).

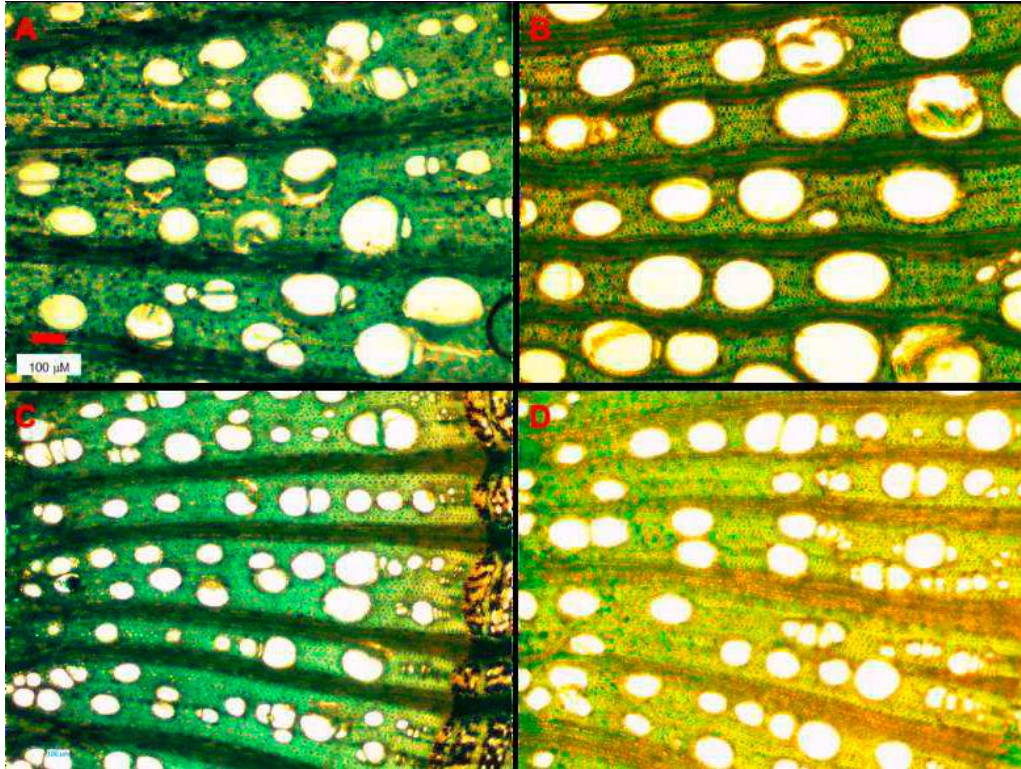


Fig. 8 - Sezioni dorso-ventrali osservate al microscopio ottico per le cv. Sauvignon Blanc R2 (A), Garofanata (B), Nebbiolo (C) e Montepulciano (D). (Ingrandimento 4×) Scala barra, 100 micron.

Cultivar a bacca nera – Per quanto riguarda il diametro dei vasi xilematici, la cv. Nebbiolo ha mostrato il diametro medio più grande (152,9 μm), seguito da Limberger (123,4 μm). Le cv. Balsamina e Montepulciano hanno evidenziato vasi con diametro medio minore, rispettivamente 75,4 μm e 70,6 μm . Tutte le altre cv. a bacca nera analizzate hanno evidenziato valori intermedi a quelli citati (Fig. 9).

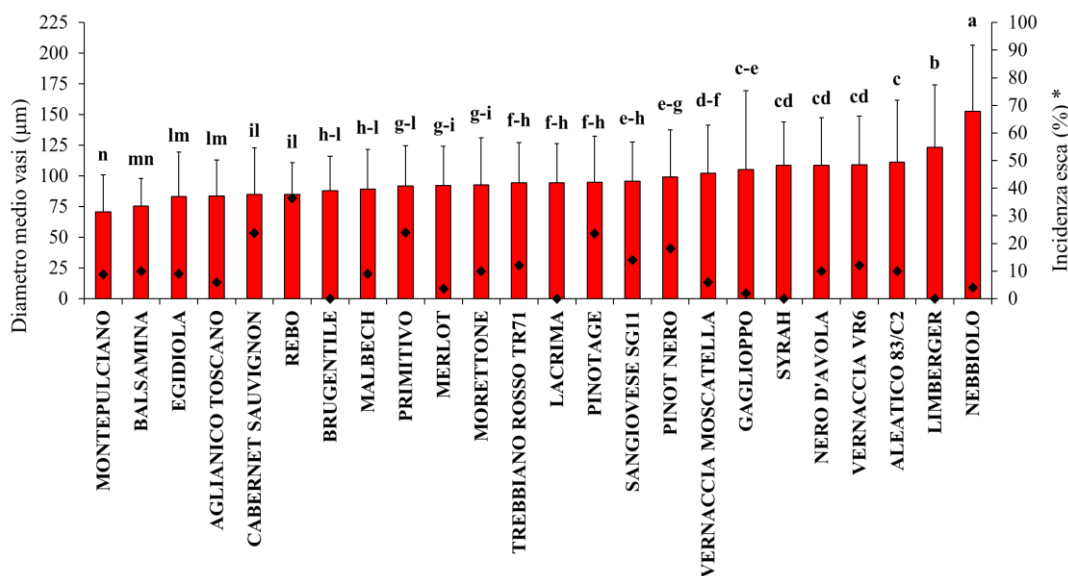


Fig. 9 - Diametro medio dei vasi xilematici (colonne), rilevato nelle 24 cv. di vite a bacca nera. Ogni colonna rappresenta la media e la deviazione standard ottenuta dalla misurazione di 120 vasi, 30 per ogni pianta, per ciascuna cv.. Lettere diverse sopra alle colonne, indicano differenze significative tra le cv. (test di Fisher; $p \leq 0.05$). *, Nel grafico è mostrata l'incidenza della malattia, (\blacklozenge) secondo Murolo e Romanazzi, (2014).

Cultivar a bacca bianca - In questo gruppo, il diametro medio dei vasi variava da 160,4 μm , per il Sauvignon Blanc R2, a 81,9 μm , per la Garofanata. Tutte le altre cv. hanno mostrato valori intermedi (Fig. 10).

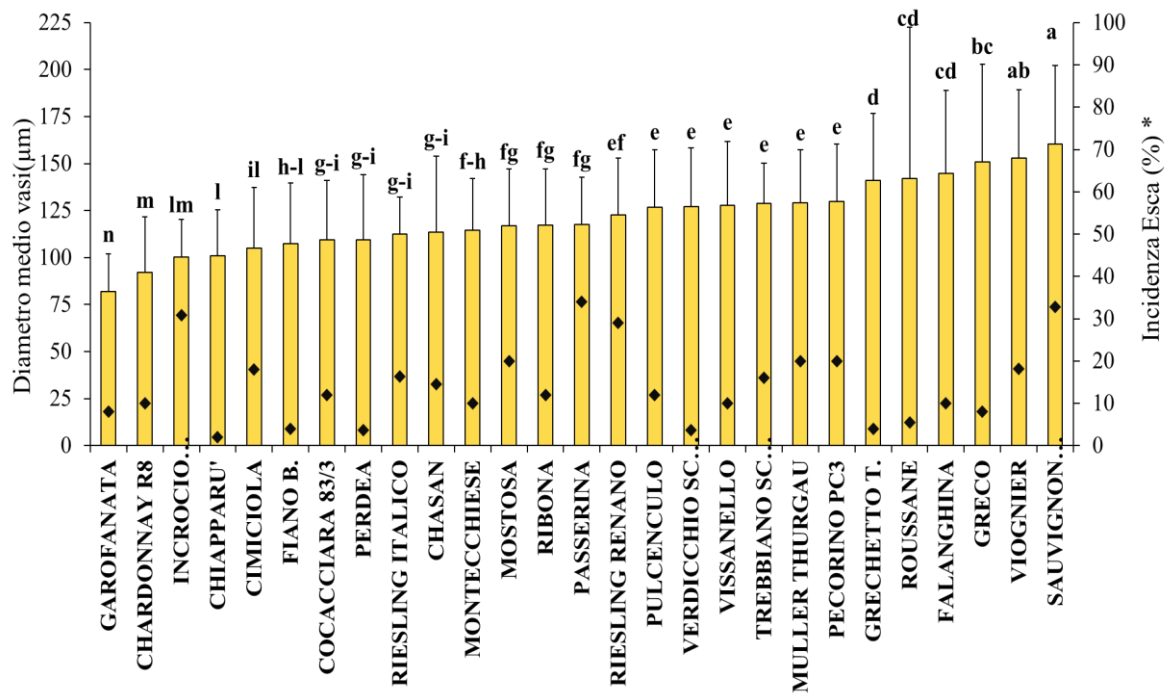


Fig. 10 - Diametro medio dei vasi xilematici (colonne), rilevata nelle 27 cv. di vite a bacca bianca. Ogni colonna rappresenta la media e la deviazione standard ottenuta dalla misurazione di 120 vasi, 30 per ogni pianta, per ciascuna cv.. Lettere diverse sopra le colonne, indicano differenze significative tra le cv. (test di Fisher; $p \leq 0.05$). *, Nel grafico è mostrata l'incidenza della malattia, (♦) secondo Murolo e Romanazzi, (2014).

4.3 Densità dei vasi xilematici

Cultivar a bacca nera - La densità e la frequenza delle classi relative alle dimensioni dei vasi xilematici differivano tra le cv.s. Relativamente alle cv.s a bacca nera, Montepulciano ha evidenziato una densità dei vasi più elevata (60,0 vasi mm²), mentre la cv. Aleatico 83/c2 ha mostrato la densità inferiore (28,7 vasi mm²). Valori intermedi si sono osservati per le altre cv. evidenziando una elevata variabilità (Fig. 11).

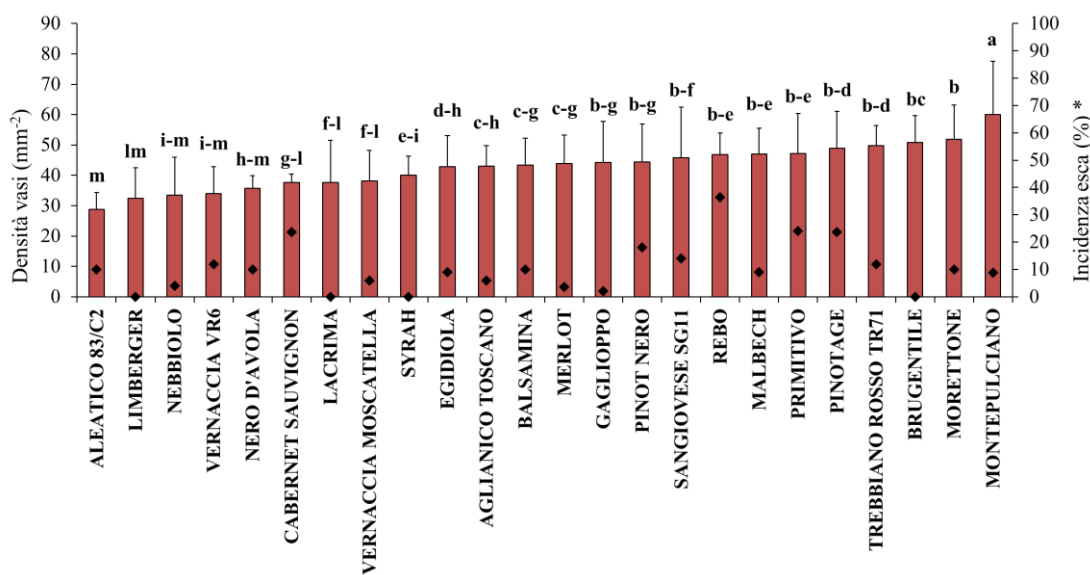


Fig. 11 - Densità dei vasi (colonne) relativa alle 24 cv. a bacca nera, quantificata contando la media del numero dei vasi presenti in 1 mm² in tre sezioni dorso-ventrali rilevata nelle 24 cv. di vite a bacca nera. Lettere diverse sopra le colonne, indicano differenze significative tra le cv. (test di Fisher; $p \leq 0.05$). *, Nel grafico è mostrata l'incidenza della malattia, (♦) secondo Murolo e Romanazzi, (2014).

Per quanto riguarda la frequenza del numero dei vasi suddivisa per classi in base alle dimensioni, nelle cv. a bacca nera, le classi di diametro più rappresentative sono state quelle più piccole comprese nel range tra 40-59 μm e 80-99 μm . In particolare, le cv. Montepulciano ed Egidola hanno evidenziato il numero di vasi maggiore nella classe 40-59 μm , con valori medi rispettivamente di 7,8 e 8,2 vasi. Alcune cv. hanno mostrato un numero di vasi massimo, associato alla classe intermedia, 100-119 μm , come cv. Sangiovese SG11 (7,3 vasi), cv. Trebbiano rosso TR71 (6,2 vasi), cv. Limberger (4,6 vasi) e cv. Syrah (5,8 vasi). Solo la cv. Nebbiolo ha evidenziato la maggior densità dei vasi (6,8 vasi), nella classe maggiore, >200 μm (Fig. 12).

CLASSI DI DIAMETRO (μm)

CULTIVAR	40-59	60-79	80-99	100-119	120-139	140-159	160-179	180-199	> 200	INCIDENZA ESCA
REBO	5,2	8,6	7,6	5,8	1,6	0,8	0,0	0,2	0,0	36,4
PRIMITIVO	4,0	6,2	8,2	6,0	2,2	0,6	1,0	0,4	0,2	24,0
CABERNET	6,3	6,0	4,8	3,8	2,8	1,5	1,0	0,5	0,0	23,6
PINOTAGE	5,2	5,2	5,2	4,0	3,8	3,0	1,2	0,2	0,0	23,6
PINOT NERO	4,8	4,8	4,6	4,0	5,2	3,6	1,2	0,0	0,2	18,2
SANGIOVESE SG11	4,3	4,5	5,8	7,3	3,8	2,0	0,5	0,3	0,0	14,0
TREBBIANO ROSSO	4,0	6,2	5,4	6,2	4,6	1,8	0,2	0,2	0,2	12,0
VERNACCIA VR6	1,4	4,2	8,2	5,4	4,2	2,0	1,8	0,4	1,2	12,0
ALEATICO 83/C2	3,0	8,0	4,2	3,2	3,0	1,4	2,8	1,4	2,4	10,0
BALSAMINA	7,2	8,6	8,4	2,6	0,4	0,4	0,0	0,0	0,0	10,0
MORETTONE	5,4	5,6	5,0	4,4	3,8	2,4	0,8	0,0	0,4	10,0
NERO D'AVOLA	3,2	2,8	5,4	6,0	3,4	4,8	1,6	0,8	0,0	10,0
EGIDIOLA	8,2	5,4	5,0	3,6	3,2	1,0	0,4	0,4	0,0	9,1
MALBECH	4,3	6,3	6,8	6,0	2,5	1,5	0,5	0,0	0,0	9,1
MONTEPULCIANO	7,8	5,2	3,8	5,4	1,4	0,4	0,0	0,0	0,0	8,9
AGLIANICO	6,0	7,6	6,8	4,2	2,4	1,2	0,2	0,0	0,0	6,0
VERNACCIA	3,5	4,3	6,8	6,0	4,3	1,8	0,8	1,8	0,3	6,0
NEBBIOLO	0,3	2,5	1,8	3,5	3,0	2,8	4,0	3,5	6,8	4,0
MERLOT	2,4	7,6	7,0	5,0	3,0	2,0	0,8	0,0	0,0	3,6
GAGLIOPPO	5,3	5,5	5,3	3,0	3,3	3,0	2,0	0,8	0,8	2,0
BRUGENTILE	4,5	8,5	7,0	5,3	2,5	0,8	0,8	0,0	0,0	0,0
LACRIMA	3,6	7,6	6,0	5,6	3,2	3,0	0,2	0,2	0,0	0,0
LIMBERGER	2,4	3,6	3,0	4,6	4,2	3,2	3,4	1,0	3,0	0,0
SYRAH	3,2	3,8	4,6	5,8	5,0	4,8	1,8	0,2	0,0	0,0

■ *Minimo*
■ *Massimo*

Fig. 12 – Il grafico illustra la distribuzione dei vasi per classe di diametro (vasi/ mm^2) per le 24 cv. a bacca nera. La differenziazione di colore definisce il minimo (verde chiaro) e massimo (rosso chiaro) numero di vasi per classe di ogni cv.. L'incidenza della malattia, secondo Murolo e Romanazzi, (2014).

Cultivar a bacca bianca - Nelle cv. a bacca bianca, la frequenza maggiore dei vasi è stata osservata per la cv. Garofanata (46.8 vasi mm²), seguita dalla cv. Chiapparù (43,0 vasi mm²), mentre il valore più basso è stato osservato per la cv. Sauvignon Blanc R2 (18.3 vasi mm²). Tutte le altre cv. hanno evidenziato valori intermedi (Fig. 13).

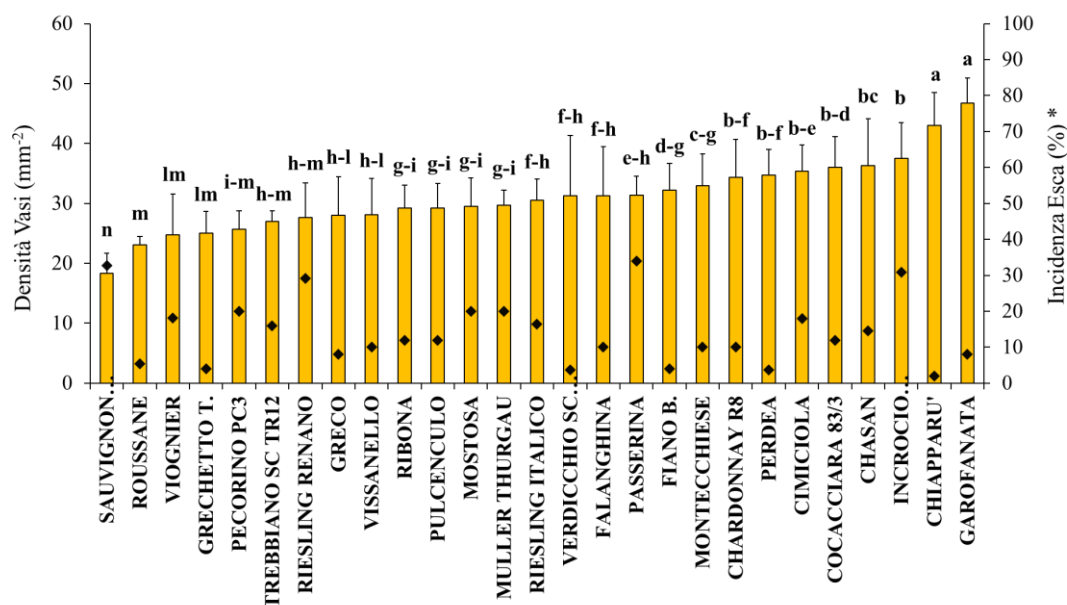


Fig. 13 - Densità dei vasi (colonne) rilevata nelle 27 cv. di vite a bacca bianca e quantificata contando la media del numero dei vasi presenti in 1 mm² in tre sezioni dorso-ventrali. Lettere diverse sopra le colonne, indicano differenze significative tra le cv. (test di Fisher; $p \leq 0.05$). *, Nel grafico è mostrata l'incidenza della malattia, (♦) secondo Murolo e Romanazzi, (2014).

Per quanto riguarda la distribuzione dei vasi xilematici in base alle dimensioni suddivise in classi, le più rappresentative sono quelle incluse tra da 80-99 μm a 120-139 μm . In particolare, le cv. Incrocio Manzoni B., Chiapparù, e Perdea hanno evidenziato la maggior frequenza nella classe 80-99 μm con un numero di 11,10,8 e 10,3 vasi rispettivamente. Nella classe appena superiore, 100-119 μm le cv. con maggiore frequenza dei vasi sono risultate Passerina (10,2 vasi), Riesling Renano e Riesling Italico (10,2 vasi). Nessuna delle cv. analizzate ha mostrato la maggiore densità nella classe dimensionale più bassa, 40-59 μm (Fig. 14).

CULTIVAR	CLASSI DIAMETRO (μm)									INCIDENZA ESCA (%)
	40-59	60-79	80-99	100-119	120-139	140-159	160-179	180-199	> 200	
PASSERINA	0,0	1,2	6,2	10,2	6,6	3,0	2,2	0,4	0,0	34,0
SAUVIGNON BLANC R2	0,0	0,0	0,8	4,8	5,4	5,4	4,6	3,6	5,4	32,7
INCROCIO MANZONI B.	0,0	4,3	11,0	9,0	4,5	1,0	0,0	0,0	0,0	30,9
RIESLING RENANO	0,0	0,7	6,3	10,3	4,0	2,3	3,7	1,3	0,3	29,1
PECORINO PC3	0,0	0,0	5,2	8,0	6,2	4,2	3,8	1,6	0,6	20,0
MOSTOSA	0,2	2,6	6,8	7,8	5,0	4,2	2,0	1,0	0,0	20,0
MULLER THURGAU	0,0	0,3	2,3	9,7	8,7	3,0	3,0	1,3	0,7	20,0
VIIGNIER	0,0	0,4	2,4	2,8	5,6	4,6	5,6	4,8	3,0	18,2
CIMICIOLA	0,8	5,5	8,0	6,3	3,8	2,0	1,8	0,5	0,0	18,0
RIESLING ITALICO	0,0	0,0	8,3	12,3	5,5	2,3	0,8	0,0	0,0	16,4
TREBBIANO SC TR12	0,0	0,3	2,7	7,0	10,3	8,0	1,3	0,0	0,3	16,0
CHASAN	1,4	4,2	6,8	5,2	4,6	3,4	0,6	1,0	1,6	14,5
RIBONA	0,0	2,2	6,2	8,4	6,6	3,6	0,4	1,2	0,6	12,0
PULCENCULO	0,0	0,8	5,4	7,8	5,0	6,4	2,2	1,8	0,2	12,0
COCACCIARA 83/3	0,3	4,8	8,0	7,0	3,3	2,8	2,8	0,5	0,0	12,0
VISSANELLO	0,0	2,2	3,6	7,8	6,2	4,6	2,6	1,8	0,6	10,0
FALANGHINA	0,0	2,0	3,8	5,0	2,6	4,2	5,2	2,8	4,0	10,0
MONTECCHIESE	0,0	2,8	6,8	9,0	4,8	3,0	2,8	0,3	0,0	10,0
CHARDONNAY R8	3,4	5,8	7,6	7,0	2,8	1,6	0,6	0,0	0,0	10,0
GRECO	0,0	1,5	4,5	4,8	3,8	3,3	2,3	1,8	8,3	8,0
GAROFANATA	4,0	10,3	8,8	5,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	8,0
ROUSSANE	0,0	0,0	1,8	7,5	6,5	9,0	2,5	2,0	0,3	5,5
GRECHETTO T.	0,0	0,6	3,6	5,0	5,0	6,2	4,4	2,4	2,2	4,0
FIANO B.	1,0	5,0	7,8	5,8	4,2	3,0	2,4	0,2	0,0	4,0
VERDICCHIO SC VE23	0,0	2,4	3,6	4,6	7,8	6,4	3,2	0,6	0,4	3,6
PERDEA	0,0	1,8	10,3	9,5	6,0	1,0	0,8	0,0	0,3	3,6
CHIAPPARU'	1,4	2,6	10,8	6,6	4,8	1,6	0,4	0,0	0,0	2,0

Minimo Massimo

Fig. 14 - Il grafico illustra la distribuzione dei vasi per classe di diametro (vasi/mm²) osservata per le 27 cv. a bacca bianca. La differenziazione di colore definisce il minimo (verde chiaro) e massimo (rosso chiaro) numero di vasi per classe di ogni cv.. *, L'incidenza della malattia, secondo Murolo e Romanazzi, (2014).

4.4 Correlazione tra dimensione dei vasi xilematici e incidenza della malattia in campo

La correlazione tra la dimensione e densità dei vasi e l'incidenza della malattia in campo valutata da Murolo e Romanazzi (2014) è stata analizzata mediante il coefficiente di correlazione lineare di Pearson.

Per le cv. a bacca nera, come atteso, è stato individuato un coefficiente di correlazione negativo tra il diametro del vaso e la densità del vaso ($r = -0,67$) (Fig. 15A). Tra il diametro del vaso e l'incidenza della malattia è stato evidenziato un coefficiente di correlazione negativo ($r = -0,31$), (Fig. 15B) e un coefficiente di correlazione positivo tra l'incidenza della malattia e la densità del vaso ($r = 0,22$) (Fig. 15C), tuttavia entrambi i dati non sono significativi.

Per le cv. a bacca bianca, come atteso, un coefficiente di correlazione negativo è stato osservato tra il diametro del vaso e la densità del vaso ($r = -0,86$) (Fig. 15D). Anche per questo gruppo il coefficiente di correlazione tra l'incidenza della malattia e il diametro medio dei vasi e la densità media dei vasi non ha mostrato valori significativi: $r = 0,14$ (Fig. 15E) e $r = -0,28$ (Fig. 15F) rispettivamente.

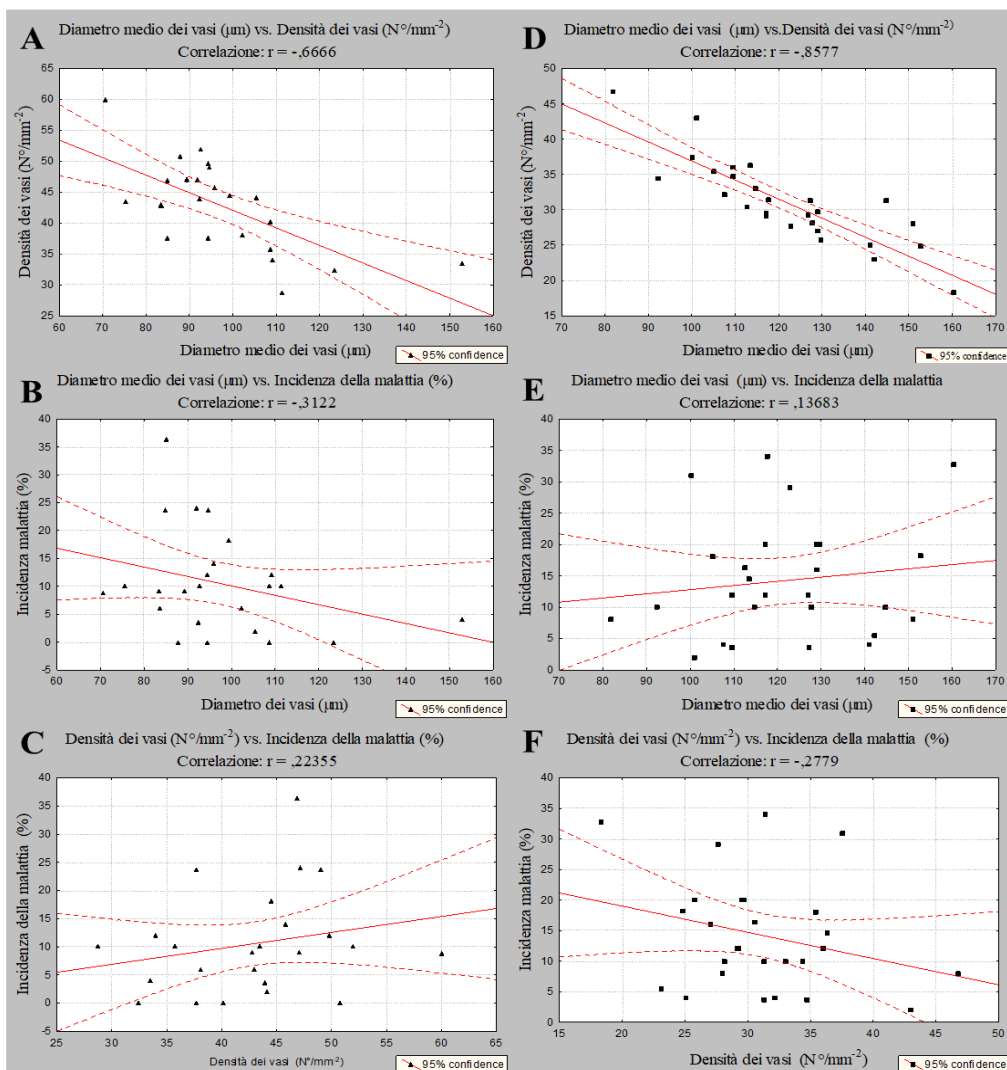


Fig. 15 - Correlazioni di Pearson tra i diametri dei vasi e la densità dei vasi (A, D), tra i diametri dei vasi e l'incidenza della malattia (B, E) e tra l'incidenza della malattia e la densità dei vasi (C, F) cv. a bacca rossa (A-C) e cv. a bacca bianca (D-F).

4.5 Analisi complessiva tra cv. a bacca nera e a bacca bianca

Il dato medio complessivo ottenuto confrontando le cv. a bacca nera con quelle a bacca bianca ha evidenziato differenze significative tra i due gruppi. Il valore medio del diametro dei vasi era di $121,9 \mu\text{m}$ per le cv. a bacca bianca e di $97,0 \mu\text{m}$ per le cv. a bacca nera (Fig. 16A). Inoltre, per quanto riguarda la densità dei vasi, le cv. a bacca

rossa hanno mostrato una maggiore densità rispetto alle cv. a bacca bianca, rispettivamente con 42.8 vasi mm^2 e 31,0 vasi mm^2 (Fig. 16B).

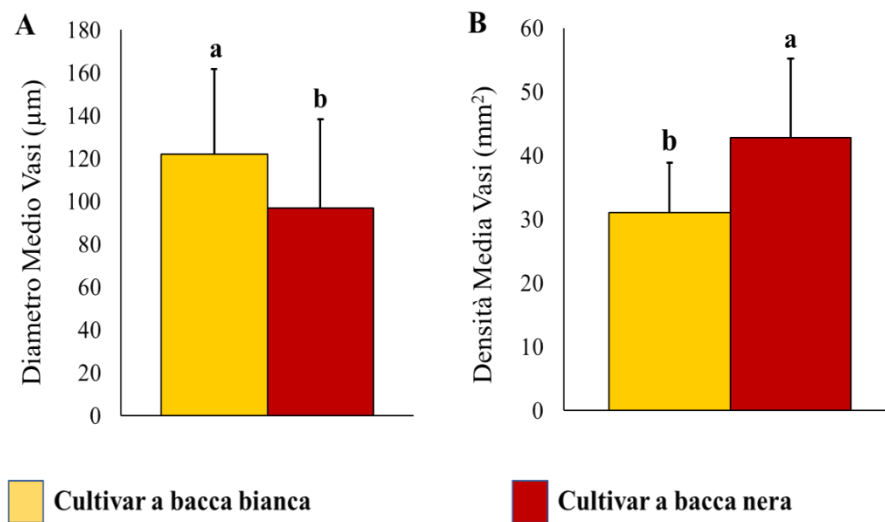


Fig. 16 - Confronti tra le caratteristiche dello xilema e il diametro dei vasi (A), la densità dei vasi (B). Le diverse lettere sopra alla colonna indicano le differenze significative tra le cv. (Test di Fisher; $p \leq 0,05$).

Allo stesso modo, valutando la media dell'incidenza della malattia (Murolo e Romanazzi, 2014), per i due gruppi (cv. a bacca bianca e nera), è stata osservata una maggiore incidenza nelle cv. a bacca bianca anche se non statisticamente significativa (Fig. 17).

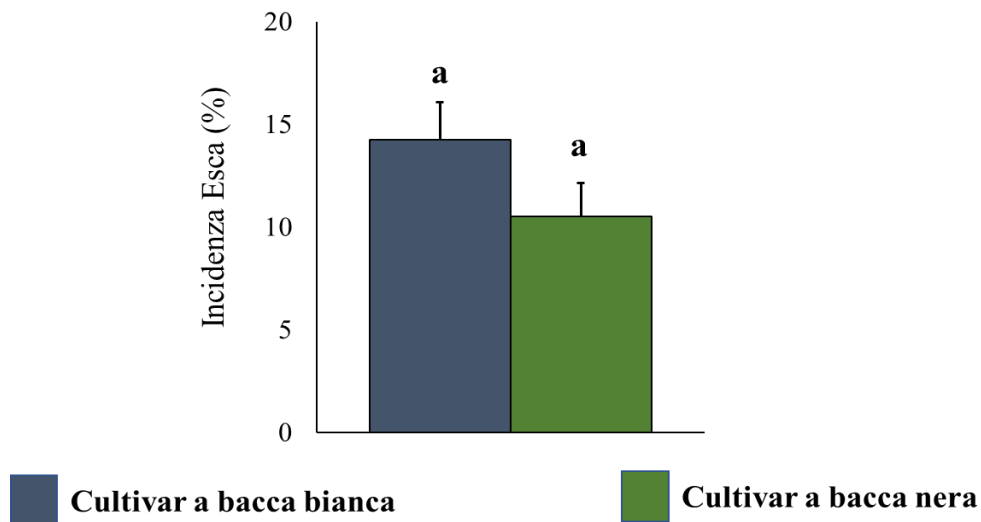


Fig. 17 - Incidenza della malattia nelle cv. a bacca bianca e a bacca nera (Murolo e Romanazzi, 2014). Le diverse lettere sopra alla colonna indicano le differenze significative tra le cv. (Test di Fisher; $p \leq 0,05$).

5. DISCUSSIONE

Il mal dell'esca insieme alle altre malattie del legno della vite rappresenta uno dei principali fattori che incidono negativamente nella produzione di uva in tutto il mondo (Mohammadi et al., 2013). La gravità della malattia va ricercata principalmente nell'assenza di un adeguato sistema di lotta a disposizione per gli agricoltori aggravato dal fatto che a tutt'oggi non sono note cv. di vite resistenti alla patologia. L'esca colpisce i tessuti vascolari della vite, quindi approfondire le conoscenze sulla morfologia dello xilema nelle cv., consentirebbe una migliore comprensione delle dinamiche che governano l'interazione tra pianta e agenti patogeni. In particolare, studi precedenti hanno suggerito che il diametro dei vasi xilematici differisce tra le cv. di vite e tali caratteristiche potrebbero influire sul grado di suscettibilità alle malattie vascolari (Pouzoulet et al., 2014, 2017). Tuttavia, questi studi hanno preso in considerazione un numero ridotto di cv. valutando lo sviluppo di un unico agente della malattia, *P. chlamidospora*, inoculato in ambiente controllato. In questo studio si è voluto indagare se le caratteristiche morfologiche dello xilema, in particolare la dimensione e la densità dei vasi può essere correlato con l'incidenza della malattia in campo. Applicando le metodologie utilizzate da Scholz et al. (2013), abbiamo inizialmente testato il metodo su due cv., una a bacca bianca, Passerina e una a bacca rossa, Montepulciano, valutando in 5 piante un numero elevato di vasi (525) da tre tralci. L'indagine preliminare ci ha consentito di verificare che quasi nulle sono le differenze tra repliche della stessa pianta mentre differenze significative sono state individuate tra le piante. Questo, se da una parte ci ha consentito di ridurre il numero delle repliche, dall'altro ci ha suggerito di includere almeno 5 piante per ogni varietà nell'esperimento. La prova è stata condotta su 24 cv. a bacca nera e 27 a bacca bianca, selezionate sia tra quelle autoctone che internazionali. Le informazioni acquisite con questo lavoro hanno incrementato le conoscenze sulle caratteristiche anatomiche del tessuto xilematico nelle cv. di vite. In particolare, i dati raccolti hanno rilevato un'alta variabilità sia del diametro che della densità dei vasi sia tra le cv. a bacca bianca che tra quelle a bacca nera.

In particolare, le dimensioni rilevate per le cv. Merlot, Chardonnay e Cabernet Sauvignon sono in accordo con i dati riportati in studi precedenti, (Pouzoulet et al.,

2014, 2017) anche se gli studi citati avevano coinvolto un numero ristretto di cv. allevate in serra.

La variabilità della dimensione dei vasi nello xilema oltre ad avere un'origine genetica è noto che può essere associata a variazioni di tipo ambientale o a stress di tipo abiotico. Diversi studi che hanno coinvolto specie differenti, hanno evidenziato che la variazione della dimensione dei vasi xilematici, all'interno dei genotipi cambiano a seconda del clima (Fisher et al., 2007; Choat et al., 2011; Schreiber et al., 2013; Medeiros e Pockman, 2014; Palliotti et al., 2014). Queste indagini hanno dimostrato che i vasi più piccoli sono vantaggiosi, per evitare l'embolia indotta dal congelamento e per minimizzare l'impatto della cavitazione indotta dalla siccità.

Altri studi effettuati su portainnesti del pesco, hanno evidenziato che le maggiori dimensioni dei vasi sono associate al portainnesto più vigoroso rispetto a quello meno vigoroso, e queste caratteristiche sono state associate alla diversa conduttanza idraulica stimata tra portainnesti (Tombesi et al., 2010). Questo lavoro ha coinvolto un gran numero di cv. coltivate nello stesso campo sperimentale, innestate sullo stesso portainnesto e allevate con lo stesso sistema. Per questo motivo, possiamo supporre che i fattori ambientali, come le pratiche agricole e le condizioni pedoclimatiche, non hanno influenzato le dimensioni dei vasi.

Sulla base dei risultati in merito alla densità dei vasi nelle diverse classi di diametro, come si poteva prevedere, una correlazione negativa si è rilevata tra i diametri e le densità dei vasi in entrambi i gruppi. Anche se il coefficiente di correlazione osservato è più basso per le cv. a bacca nera, il che suggerisce, per quanto riguarda le dimensioni dei vasi, la minore uniformità tra questo gruppo. Tuttavia, interessante è l'osservazione che le cv. a bacca bianca hanno una frequenza maggiore di vasi nelle classi a diametro maggiore rispetto alle cv. a bacca nera. Per quanto ne sappiamo, i dati relativi alle proprietà anatomiche dello xilema associate alle cv. a bacca nera e a bacca bianca, rappresentano delle nuove informazioni acquisite su cv. allevate in campo. Però, saranno necessari ulteriori studi per capire se questa caratteristica anatomica ha un ruolo importante nella fisiologia vegetale e nelle interazioni col patogeno. A questo proposito, si è esaminata la relazione tra dimensione dei vasi e l'incidenza dei sintomi dell'esca, come precedentemente valutato da Murolo e Romanazzi (2014) per le stesse cv. di vite. A questo proposito nessuna relazione

lineare è stata osservata tra incidenza dell'esca e dimensione dei vasi nell'ambito di ogni gruppo a bacca nera o a bacca bianca. Questi dati sembrano in disaccordo con le precedenti indagini, le quali hanno indicato che le cv. con vasi più grandi potrebbero essere più suscettibili all'inoculo di *P. chlamydospora* (Pouzoulet et al., 2017), uno degli agenti principalmente coinvolti nella malattia da esca. La ragione va ricercata analizzando diversi aspetti, nel presente studio, sono stati considerati i sintomi dell'esca osservati in campo, a cui concorrono più specie fungine (Bruno e Sparapano, 2007) coinvolte in stadi differenti della malattia. Inoltre, a volte la presenza degli agenti patogeni non è strettamente associata alla manifestazione dei sintomi, che nelle malattie del legno della vite hanno discontinuità imprevedibili nell'espressione su foglia variabile di anno, dovute a variazioni climatiche stagionali (Mugnai et al., 1999; Surico et al., 2000; Romanazzi et al., 2009; Wagschal et al., 2008; Bertsch et al., 2013). Questo lavoro, coinvolgendo un numero ampio di cv., ci ha consentito di mettere in luce un aspetto interessante, analizzando il valore medio complessivo del diametro dei vasi per le cv. a bacca nera e per quelle a bacca bianca, abbiamo rilevato che quest'ultime hanno dimensioni dei vasi più grandi rispetto a quelle a bacca nera. Una tendenza simile è stata osservata analizzando il dato medio dell'incidenza della malattia valutata da Murolo e Romanazzi (2014), dove l'incidenza media della malattia, è risultata più alta nelle cv. a bacca bianca (14,2%) rispetto alle cv. a bacca nera (10,5%). Questa osservazione è supportata da altre indagini simili svolte in particolare in Italia e riferite dall'Organizzazione Internazionale della Vigna e del Vino (OIV) che nel 2016 ha pubblicato che in Italia l'incidenza delle malattie del legno dipende dalla suscettibilità varietale. Infatti, nelle piante da 15 a 18 anni, l'incidenza media può fluttuare rispettivamente dal 12% al 19%, per le cv. bianche, e circa dall'8% al 10%, per le cv. a bacca nera (Borgo et al., 2016; Mondello et al., 2018). Ciò suggerisce che alcune relazioni tra dimensione dei vasi e l'incidenza dell'esca sono possibili.

6. CONCLUSIONI

Questa ricerca rappresenta un primo studio eseguito su un numero elevato di cv. sia autoctone che internazionali, nel quale è stato valutato il diametro dei vasi xilematici e la relazione con l'incidenza dell'esca in campo (Murolo e Romanazzi, 2014).

La ricerca ha rilevato che, le caratteristiche morfologiche dei vasi xilematici sono di difficile interazione con la sintomatologia in campo. Questo risultato può essere ricondotto al fatto che, il mal dell'esca è provocato da più patogeni fungini e in più i sintomi rilevabili in campo variano di anno in anno in base alle condizioni pedoclimatiche. Tuttavia, l'indagine ha rivelato che esiste, per quanto riguarda i diametri dei vasi xilematici, una variabilità elevata tra le cv., ma il dato medio calcolato per le cv. a bacca bianca e per quelle a bacca nera evidenzia che le prime possiedono vasi xilematici di maggiore ampiezza rispetto alle seconde. Questo, se relazionato a quanto stimato dall'OIV, che individua nelle cv. a bacca bianca una maggiore suscettibilità all'esca, suggerisce che una relazione tra incidenza della malattia e morfologia dello xilema è possibile.

I nostri dati rappresentano un primo passo utile per comprendere le caratteristiche anatomiche dello xilema in cv. di vite. Altri studi sono però necessari per correlare le peculiarità anatomiche delle cv. con l'incidenza in campo della malattia. Infatti, per il controllo della diffusione dei funghi patogeni associati all'esca, come per le altre malattie del legno, bisognerebbe impiantare cv. tolleranti, le quali potrebbero rappresentare una misura di controllo duratura ed economicamente efficace (Yadeta e Thomma, 2013). Per questo motivo, diventa sempre più importante, comprendere meglio i meccanismi di difesa delle piante e identificare i genotipi meno sensibili all'interno dei germoplasma esistenti.

7. BIBLIOGRAFIA

Beckman C. H., Roberts E. M. 1995. On the nature and genetic basis for resistance and tolerance to fungal wilt diseases of plants. *Advances in Botanical Research* 21, 35–77.

Belli G. 2011. *Elementi di Patologia Vegetale*, Piccin Nuova Libreria S.p.A, Padova

Bertsch C., Ramirez-Suero M., Magnin-Robert, M., Larignon, P., Chong, J., Abou-Mansour, E., et al. 2013. Grapevine trunk diseases : complex and still poorly understood. *Plant Pathology*. 62, 243–265.

Borgo M. 2019. Vitigni, tecniche culturali ed epidemie di mal dell'esca. *Vitenda*, 2019.

Borgo M., Pegoraro G., Sartori E. 2016. Susceptibility of grape varieties to esca disease. *39th World Congress of Vine and Wine*. BIO Web of Conferences.

Brasier, C. M. 1991. *Ophiostoma novo-ulmi* sp. nov., causative agent of current Dutch elm disease pandemics. *Mycopathologia* 115, 151–161.

Brodersen, C. R., and McElrone, A. J. 2013. Maintenance of xylem network transport capacity: a review of embolism repair in vascular plants. *Frontiers in Plant Science* 4, 108. doi:10.3389/fpls.2013.00108

Bruno, G., and Sparapano, L. 2007. Effects of three esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L.: V. Changes in the chemical and biological profile of xylem sap from diseased cv. Sangiovese vines. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 71, 210–229.

Choat B., Jansen S., Brodribb T. J., Cochard H., Delzon S., Bhaskar R., et al. 2012. Global convergence in the vulnerability of forests to drought. *Nature* 491, 752–755.

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.

De Micco V., Balzano A., Wheeler E. A., Baas P. 2016. Tyloses and gums: a review of structure, function and occurrence of vessel occlusions. *IAWA J.* 37 186–205.

Feliciano A.J., Eskalen A., Gubler W.D. 2004. Differential susceptibility of three grapevine cultivars to *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeoconiella chlamydospora* in California. *Phytopathologia Mediterranea*. 43, 66-69.

- Ferri F. 1985. I funghi: micologia, isolamento, coltivazione. Edagricole, Bologna.
- Fisher, J. B., Goldstein, G., Jones, T. J., Cordell, S. 2007. Wood vessel diameter is related to elevation and genotype in the Hawaiian tree *Metrosideros polymorpha* (Myrtaceae). *American Journal of Botany* 94, 709–715.
- Foglia R. 2019. Xylem vessel size and indigenous mycorrhizae on grapevine cultivars: relationship with incidence of esca. *Dottorato di Ricerca*. Università Politecnica delle Marche.
- Fradin E. F., Thomma B. P. H. J. 2006. Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. *Molecular Plant Pathology*. 7, 71–86.
- Frisullo S., Carlucci A., Lops F., Michelon L., Pellegrini C., Pertot I., et al. 2010. Forme di svernamento dei funghi dell'esca, fonti dell'inoculo, recettività delle ferite. In: Il Mal dell'Esca della Vite, Progetto MesVit, 104-118.
- Edwards J., Laukart N., Pascoe I.G. 2001. *In situ* sporulation of *Phaeoconiella chlamydospora* in the vineyard. *Phytopathologia Mediterranea* 40, 61-66
- Gramaje D., Armengol J. 2011. Fungal trunk pathogens in the grapevine propagation process: potential inoculum sources, detection, identification, and management strategies. *Plant Disease*. 95,1040-1055.
- Guerretta P. 2012. Risposta varietale della vite al mal dell'esca. Tesi di laurea, Università degli studi di Padova.
- Landi L., Murolo S., Romanazzi G. 2012. Colonization of *Vitis* spp. wood by sGFP-transformed *Phaeoconiella chlamydospora*, a tracheomycotic fungus involved in esca disease. *Phytopathology* 102, 290-7.
- Marchi G., Mugnai L., Surico G. 2010. Fattori di virulenza dei funghi dell'esca. Enzimi esocellulari e crescita dei funghi dell'esca in presenza di fenoli. In: Il Mal dell'Esca della Vite, Progetto MesVit, 207-218.
- Martinez-Vilalta J., Mencuccini M., Alvarez, X., Camacho J., Loepfe L., Pinol J. 2012. Spatial distribution and packing of xylem conduits. *American Journal of Botany* 99, 1189-1196.
- Medeiros J. S. Pockman, W. T. 2014. Freezing regime and trade-offs with water transport efficiency generate variation in xylem structure across diploid populations of *Larrea* sp. (Zygophyllaceae). *American Journal of Botany* 101, 598–607.

Michelon L., Pellegrini C. 2007. I funghi coinvolti nel mal dell'esca. In: Il mal dell'esca della vite, Safe Crop Centre.

Mohammadi, H., Banihashemi, Z., Gramaje, D., and Armengol, J. 2013. Fungal pathogens associated with grapevine trunk diseases in Iran. *Journal of Agricultural Science and Technology* 15, 137-150.

Mondello, V., Songy, A., Battiston, E., Pinto, C., Coppin, C., Trotel-Aziz, P., et al. 2018. Grapevine trunk diseases: a review of fifteen years of trials for their control with chemicals and biocontrol agents. *Plant Disease* 102, 1189–1217.

Mugnai L., Graniti A., Surico G. 1999. Esca (black measles) and brown wood-streaking: two old and elusive diseases of grapevines. *Plant Disease* 83, 404-414.

Mugnai L., Surico G., Marchi G. 2010. Verso una nuova definizione del concetto di Esca. In: Il Mal dell'Esca della Vite, Progetto MesVit, 59-60.

Mugnai L., Surico G., Sfalanga A. 1997. Produzione di enzimi esocellulari da parte di funghi del legno di viti colpite dal "mal dell'esca". *Micologia Italiana* 26, 11-22.

Murolo S., Romanazzi G. 2014. Effects of grapevine cultivar, rootstock and clone on Esca disease. *Australasian Plant Pathology* 43, 215-221.

Nerva L., Zanzotto A., Gardimana M., Gaiottia F., Chitarra W. 2019. Soil microbiome analysis in an esca diseased vineyard. *Soil Biology and Biochemistry* 135, 60-70.

Palliotti A., Tombesi S., Frioni T., Famiani F., Silvestroni O., Zamboni M., et al. 2014. Morpho-structural and physiological response of container-grown Sangiovese and Montepulciano cvv. (*Vitis vinifera*) to rewatering after a pre-veraison limiting water deficit. *Functional Plant Biology* 41, 634–647.

Petit E., Gubler W.D. 2006. Influence of *Glomus intraradices* on black foot disease caused by *Cylindrocarpon macrodidymum* on *Vitis rupestris* under controlled conditions. *Plant Disease* 90, 1481-1484.

Pockman W., Sperry J. 2000. Vulnerability to xylem cavitation and the distribution of sonoran desert vegetation. *American Journal of Botany* 87, 1287-1299.

Pouzoulet J., Pivovarovoff A. L., Santiago L. S., and Rolshausen P. E. 2014. Can vessel dimension explain tolerance toward fungal vascular wilt diseases in woody plants? Lessons from Dutch elm disease and esca disease in grapevine. *Frontiers in Plant Science* 5, 253.

Pouzoulet J., Scudiero E., Schiavon M., Rolshausen P. E. 2017. Xylem vessel diameter affects the compartmentalization of the vascular pathogen *Phaeoconiella chlamydospora* in grapevine. *Frontiers in Plant Science* 8, 1442.

Pouzoulet J., Scudiero E., Schiavon M., Santiago L.S. and Rolshausen P. E. 2019. Modeling of xylem vessel occlusion in grapevine. *Tree Physiology* 39, 1438-1445.

Rolshausen P. E., Urbez-Torres J. R., Rooney-Latham S., Eskalen A., Smith R. J., and Gubler, W. D. 2010. Evaluation of pruning wound susceptibility and protection against fungi associated with grapevine trunk diseases. *American Journal of Enology and Viticulture* 61, 113–119.

Romanazzi G., Murolo S., Pizzichini L., Nardi S. 2009. Esca in young and mature vineyards, and molecular diagnosis of the associated fungi. *European Journal Plant Pathology* 125, 277–290.

Rooney-Latham S., Eskalen A., Gubler W.D. 2005. Teleomorph formation of *Phaeoacremonium aleophilum*, cause of esca and grapevine decline in California. *Plant Disease* 89, 177-184.

Santiago L. S., Goldstein G., Meinzer F. C., Fisher J. B., Machado K., Woodruff D., Jones. T. 2004. Leaf photosynthetic traits scale with hydraulic conductivity and wood density in 380 Panamanian forest canopy trees. *Oecologia* 140, 543–550.

Scholz, A., Klepsch, M., Karimi, Z., and Jansen, S. 2013. How to quantify conduits in wood? *Frontiers in Plant Science* 4, 56.

Schreiber S. G., Hamann A., Hacke U. G., Thomas B. R. 2013. Sixteen years of winter stress: an assessment of cold hardiness, growth performance and survival of hybrid poplar clones at a boreal planting site. *Plant Cell Environmental* 36, 419–428.

Shigo A. L., Marx H. G. 1977. Compartmentalization of Decay in Trees. *U S Department of Agriculture Information Bulletin. Boll No 405.*

Simonit M., Sirch. P., 2014. Manuale di potatura della vite – Guyot. Edizioni Informatore Agrario, 38-45.

Solla A. Gil L. 2002. Xylem vessel diameter as a factor in resistance of *Ulmus minor* to *Ophiostoma novo-ulmi*. *Forest Pathology* 32, 123–134.

Sperry J. S., Tyree M. T. 1988. Mechanism of water stress-induced xylem embolism. *Plant Physiology* 88, 581-587.

Sun Q., Rost T. L., Reid M. S., Matthews M. A. 2007. Ethylene and not embolism is required for wound-induced tylose development in stems of grapevines. *Plant Physiology* 145, 1629-1636.

Surico G., Marchi G., Braccini P., Mugnai L. 2000. Epidemiology of esca in some vineyards in Tuscany (Italy). *Phytopathologia Mediterranea* 39, 190-205.

Talboys P. W. 1972. Resistance to vascular wilt fungi. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 181, 319–332.

Tombesi S., Johnson R. S., Day K. R., DeJong T. M. 2010. Relationships between xylem vessel characteristics, calculated axial hydraulic conductance and size-controlling capacity of peach rootstocks. *Annals Botany* 105, 327–331.

Venturas M., Lopez R., Martin J. A., Gasco A., Gil L. 2013. Heritability of *Ulmus minor* resistance to Dutch elm disease and its relationship to vessel size, but not to xylem vulnerability to drought. *Plant Pathology* 63, 500-509.

Wagschal I., Abou-Mansour E., Petit, A. N., Clément C., Fontaine, F. 2008. Wood diseases of grapevine: a review on *Eutypa* dieback and esca. In: Ait Barka E., Clément C., Eds. *Plant–Microbe Interactions*. Kerala, India: Research Signpost, 367–391.

Wheeler D., McKague, K., Thomson J., Davies R., Medalye J., Prada, M. 2005. Creating sustainable local enterprise networks. *Sloan Management Review*. 47, 33-40.

Yadeta K. Thomma B. P. H. J. 2013. The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. *Frontiers in Plant Science* 4, 97.

8. RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il Prof. Gianfranco Romanazzi, la Dott.ssa Lucia Landi e il Dott. Renzo Foglia, per avermi aiutato nell'elaborazione di questa Tesi.