



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E
AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN: SCIENZE AGRARIE E DEL
TERRITORIO

EFFETTO DEL TRATTAMENTO CON
MICROORGANISMI SULLA ESPRESSIONE DEI
SINTOMI DI MAL DELL'ESCA DELLA VITE

*EFFECT OF THE APPLICATION OF
MICROORGANISMS ON SYMPTOM
EXPRESSION OF ESCA DISEASE ON
GRAPEVINE*

Studente:
LUCEZARA VILCU

Relatore:
PROF. GIANFRANCO ROMANAZZI

Correlatore:
DOTT.SSA MARWA MOUMNI

ANNO ACCADEMICO 2022-2023

*Al Professor De Ales Luigi
che ha dedicato la sua vita alla ricerca.
A mia mamma
che mi è sempre stata vicino.*

Indice

	Pag.
RIASSUNTO	
ABSTRACT	
1	1
1.1	1
2	3
2.1	5
3	9
3.1	9
3.2	10
3.3	16
3.3.1	22
<i>3.3.1.1 Sintomi su foglie</i>	<i>22</i>
<i>3.3.1.2 Sintomi su grappoli</i>	<i>24</i>
<i>3.3.1.3 Sintomi su tralci e legno</i>	<i>25</i>
<i>3.3.1.4 Origine dei sintomi del mal dell'esca</i>	<i>27</i>
3.3.2	31
3.4	34
3.4.1	34
3.4.2	35
3.4.3	36
4	40
5	41
5.1	41
5.2	44
5.3	48
5.4	54
5.5	56
6	59
6.1	59

6.2	RISULTATI DEI RILIEVI RIGUARDANTI MAL DELL'ESCA	60
6.2.1	Risultati dei rilievi nel vigneto di Osimo	60
<i>6.2.1.1</i>	<i>Rilievo 1 del 6 luglio 2023 nel vigneto di Osimo</i>	60
<i>6.2.1.2</i>	<i>Rilievo 2 del 19 luglio 2023 nel vigneto di Osimo</i>	61
<i>6.2.1.3</i>	<i>Rilievo 3 del 2 agosto 2023 nel vigneto di Osimo</i>	62
<i>6.2.1.4</i>	<i>Rilievo 4 del 21 agosto 2023 nel vigneto di Osimo</i>	63
6.2.2	Risultati dei rilievi nel vigneto di Castelplanio	64
<i>6.2.2.1</i>	<i>Rilievo 1 del 6 luglio 2023 nel vigneto di Castelplanio</i>	64
<i>6.2.2.2</i>	<i>Rilievo 2 del 19 luglio 2023 nel vigneto di Castelplanio</i>	65
<i>6.2.2.3</i>	<i>Rilievo 3 del 2 agosto 2023 nel vigneto di Castelplanio</i>	66
<i>6.2.2.4</i>	<i>Rilievo 4 del 23 agosto 2023 nel vigneto di Castelplanio</i>	67
6.2.3	Considerazioni rispetto alla situazione registrata nel 2021 nei due vigneti sperimentali	68
<i>6.2.3.1</i>	<i>Effetto dei trattamenti sulle piante sintomatiche nei rilievi del 2021 nel vigneto di Osimo</i>	69
<i>6.2.3.2</i>	<i>Effetto dei trattamenti sulle nuove piante sintomatiche rispetto ai rilievi del 2021 nel vigneto di Osimo</i>	69
<i>6.2.3.3</i>	<i>Effetto dei trattamenti sulle piante sintomatiche nei rilievi del 2021 nel vigneto di Castelplanio</i>	70
<i>6.2.3.4</i>	<i>Effetto dei trattamenti sulle nuove piante sintomatiche rispetto ai rilievi del 2021 nel vigneto di Castelplanio</i>	70
6.3	RISULTATI DEI RILIEVI RIGUARDANTI PERONOSPORA	71
6.3.1	Risultati dei rilievi nel vigneto di Osimo	71
<i>6.3.1.1</i>	<i>Risultati foglie</i>	71
<i>6.3.1.2</i>	<i>Risultati grappoli</i>	71
6.3.2	Risultati dei rilievi nel vigneto di Castelplanio	73
<i>6.3.2.1</i>	<i>Risultati foglie</i>	73
<i>6.3.2.2</i>	<i>Risultati grappoli</i>	74
7	DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	76
8	BIBLIOGRAFIA	81
9	SITOGRAFIA	91
10	RINGRAZIAMENTI	92

RIASSUNTO

Il mal dell'esca è una ampelopatia complessa, molto distruttiva e ampiamente diffusa in tutto il mondo, che provoca gravi danni economici all'intero settore vitivinicolo a causa dell'alta incidenza e gravità dell'espressione dei sintomi. Il mal dell'esca è causato da diverse specie fungine, e l'eziologia della malattia è ancora poco conosciuta. Ad oggi, non è ancora stata individuata una soluzione efficace contro i funghi associati al mal dell'esca. Lo scopo di questa tesi è stato saggiare una strategia proposta dall'azienda B.E.A. (Biotecnologie per l'Ecologia e l'Agricoltura) basata sull'applicazione di microrganismi, enzimi e catalizzatori minerali per la riduzione dei sintomi del mal dell'esca. I trattamenti, tre applicazioni radicali e dieci applicazioni fogliari, sono stati effettuati nel corso della stagione 2023. La prova è stata condotta su due vigneti, uno situato a Osimo (*cv* Chardonnay) e l'altro a Castelplanio (*cv* Verdicchio). L'efficacia dei trattamenti, in termini di diffusione, gravità e Indice di McKinney, è stata confrontata con un controllo non trattato. Per ciascun campo sperimentale sono state effettuati quattro rilievi (due a luglio e due ad agosto). I risultati ottenuti hanno mostrato che il trattamento applicato su *cv* Chardonnay ha leggermente ridotto l'Indice di McKinney ma non è stata riscontrata alcuna differenza significativa rispetto alla parte non trattata. Su *cv* Verdicchio, i risultati dei due rilievi di luglio hanno mostrato una riduzione significativa dell'Indice McKinney, che si è annullata in quelli di agosto, dove la pressione della malattia è risultata più elevata. Confrontando i risultati ottenuti in questo studio con quelli effettuati nel corso del 2021, i trattamenti di quest'anno non hanno avuto alcun effetto nel ridurre la percentuale di piante precedentemente sintomatiche o la percentuale di nuove manifestazioni sintomatiche sulle piante non sintomatiche nel 2021. Inoltre, vista la stagione particolarmente favorevole alla peronospora, è stato dedicato un rilievo anche all'eventuale effetto collaterale sulla peronospora della vite. La strategia sperimentata per il mal dell'esca non ha registrato alcun effetto nel controllo della peronospora. In base ai risultati ottenuti, è possibile affermare che la strategia applicata per la riduzione dell'incidenza dei sintomi di mal dell'esca ha indotto un ritardo nell'insorgenza dei sintomi sulle piante trattate rispetto a quelle non trattate. Ad ogni modo, considerata la complessità, l'eziologia multipla della malattia e la sua evoluzione nel tempo, per avere un quadro più chiaro sono necessari ulteriori studi, incluse applicazioni pluriennali, per verificare l'eventuale efficacia dei trattamenti con i microrganismi applicati.

ABSTRACT

Esca of grapevine is a complex, destructive and widely spread disease. This disease causes yield losses correlated with incidence and severity symptom expression, which can create serious economic damage to the entire wine sector. Esca has been associated with fungal species and the etiology of the disease, still poorly understood. So far, no effective alternative control methods are available for winegrowers against the fungi associated with esca disease. The main objective of this study is to apply a strategy proposed by the company B.E.A. (Biotechnologies for Ecology and Agriculture) based on the application of microorganisms, enzymes and mineral catalysts to control esca disease. The treatments, which were carried out during the 2023 season, consists in three radical applications and ten foliar applications. The trial was conducted on two vineyards in Osimo (cv Chardonnay) and Castelplanio (cv Verdicchio). The effectiveness of the treatments, in terms of incidence, severity and McKinney index, was compared with an untreated control. Four disease assessments (two in July and two in August) were carried out for each experimental field. Our results showed that the treatment applied on cv Chardonnay slightly reduced the McKinney index of the disease, with no significant difference compared to the untreated plot. On cv Verdicchio, the results of the two assessments in July showed a significant reduction of McKinney index of esca disease, although these differences become mild in the two assessments in August, with a higher disease pressure. Comparing the results obtained in this study with those carried out during the year 2021, the treatments of this year did not have any effect in reduction of the percentage of plants that were symptomatic in 2021, or in the percentage of new symptomatic plants. Given the favorable season for the high pressure of downy mildew in the two experimental sites, an assessment for this disease was run, and the strategy tested for esca disease did not affect downy mildew. According to the obtained results, considering the complex etiology of the disease and the long term between infections and disease symptoms appearance, we can assume that one year application is not enough to affect the number of symptomatic plants, so further studies are needed to clarify an eventual effects of tested strategy toward esca disease.

1. INTRODUZIONE

1.1 VITICOLTURA E SUA IMPORTANZA IN ITALIA E NELLE MARCHE

L'Italia è il paese dove la viticoltura rappresenta un'attività di notevole importanza, dato l'impatto economico che ha sull'economia del Paese. La nascita della viticoltura può essere posizionata nel Vicino Oriente (Anatolia centrale, Siria, Mesopotamia settentrionale) attorno al 5500 a.C. Il successivo sviluppo della viticoltura andò poi ad interessare zone del Mediterraneo, quali la Valle del Giordano, dove si hanno delle testimonianze che risalgono al 4000 a.C., nonché l'Egitto, la Grecia e l'Italia. Nella nostra penisola, la viticoltura ha iniziato a diffondersi dal Sud, in modo particolare dalla Sicilia per opera di colonizzatori greci intorno al 1500 d.C., dove questa coltivazione si espanse, tanto che nel 700 a.C. la vite era diffusamente praticata in tutta l'Italia meridionale tanto che venne soprannominata dai colonizzatori greci "Enotria" (Palliotti *et al.*, 2018). Oggi, la viticoltura riveste un ruolo economico e sociale di primaria importanza. La superficie vitata totale in Italia è di circa 732.115 ettari (ISTAT, 2022) di cui 528.218 ettari sono superfici per uva da vino dedicati alla produzione di vini DOP (Denominazione di Origine Protetta) e IGP (Indicazione Geografica Protetta). La suddivisione della superficie totale tra vitigni a bacca bianca e nera è circa equivalente (49/51%). Il primo vitigno per ettari coltivati è il Sangiovese (10% del totale), seguito dal Trebbiano (9,6%, incluse le sue varietà abruzzese, romagnolo e toscano). Sorprende che il Catarratto sia al terzo posto (8,7%), molto vicino ai primi due e con superficie coltivata di gran lunga maggiore del Montepulciano, che segue al quarto posto (Quattrocali, 2022). Le Marche sono un territorio molto variegato, le sue caratteristiche pedoclimatiche la rendono una regione particolarmente vocata alla coltivazione della vite, soprattutto per uva da vino. La coltivazione di uva da tavola è quasi del tutto assente. Pertanto, la vite da vino rappresenta la prima coltura arborea coltivata nelle Marche. I suoi 19000 ettari (Quattrocali, 2022) vitati sono quasi totalmente in zone collinari che assicurano una produzione superiore al milione di ettolitri di vino all'anno. Nella regione esiste un'ampia variabilità genetica, con 206 varietà censite, ma i vitigni principalmente coltivati sono Sangiovese, Montepulciano, Verdicchio e Trebbiano Toscano, i quali interessano più del 70% della superficie vitata, seguiti da Pecorino, Passerina, Biancame e Maceratino o Ribona (a bacca bianca), Vernaccia nera e Lacrima (a bacca

nera). Inoltre, la viticoltura marchigiana presenta delle superfici vitate investite in vitigni internazionali (Chardonnay, Merlot, Sauvignon, Cabernet Sauvignon, Sirah, ecc.), coltivati con successo e inseriti in alcuni disciplinari di produzione. I vini marchigiani hanno raggiunto degli ottimi standard qualitativi, con il riconoscimento della Denominazione di Origine Controllata e Garantita (DOCG) cinque vini: Vernaccia di Serrapetrona, Rosso Conero Riserva, Verdicchio dei Castelli di Jesi Riserva, Verdicchio di Matelica Riserva e l'Offida. Oltre alle cinque DOCG, quasi tutto il territorio regionale è interessato da una o più delle 15 aree definite a Denominazione di Origine Controllata (DOC), consultabili in (Figura 1). Fra queste le più importanti per numero di iscritti e dimensione territoriale risultano il Rosso Piceno e il Verdicchio dei Castelli di Jesi. Altrettanto significativi anche se con aree di diffusione più limitate sono: il Verdicchio di Matelica, il Falerio dei Colli Ascolani, i Colli Maceratesi, l'Esino, i Colli Pesaresi e il Bianchello del Metauro. Vanno citate, infine, le DOC Lacrima di Morro d'Alba e la Vernaccia di Serrapetrona che, se pure limitate a territori comunali, stanno riscontrando un ottimo successo di mercato. Tra le aree DOC troviamo inoltre i Terreni di San Severino, Offida, e di recente quelli di Pergola e San Ginesio.



Figura 1. Areali di produzione di vini DOC e DOCG della regione Marche (www.prever.edu.it).

2. LE PRINCIPALI MALATTIE DEL LEGNO DELLA VITE

In letteratura, il termine “malattie del legno della vite”, *Grapevine Trunk Disease* (GTD) si riferisce a diverse malattie causate da funghi patogeni che penetrano nel legno attraverso le ferite e deteriorano gli organi perenni della vite (Hofstetter *et al.*, 2012). Le GTD sono attualmente considerate una delle sfide più rilevanti per la viticoltura. Queste malattie distruttive causano ogni anno numerosi danni ai vigneti in tutto il mondo e sono una preoccupazione in rapida crescita in tutti i paesi produttori di vino (Fontaine *et al.*, 2016). Si stima che il costo economico mondiale per la sostituzione delle viti morte superi circa 1,5 miliardi di dollari all’anno (Hofstetter *et al.*, 2012). Le GTD sono principalmente causate da funghi ascomiceti tassonomicamente non correlati e, in misura minore, da diversi basidiomiceti che sono principalmente associati al complesso del mal dell’esca. I funghi responsabili causano una serie di sintomi nelle piante ospiti e sono dei lenti colonizzatori del legno in quanto sono dei patogeni potenzialmente latenti.

Per quanto riguarda i danni che le malattie del legno possono causare, nei giovani impianti, la presenza di infezioni vascolari o degli agenti del cancro al punto di innesto può portare a deperimenti e a elevata mortalità già nei primi anni di vita del vigneto. Nei vigneti già formati, i danni sono invece dovuti alla diminuzione di quantità e di qualità del raccolto (per produzioni di qualità, la produzione di piante sintomatiche va sempre scartata), e alla mortalità delle piante, spesso intorno al 2% ogni anno (Mugnai, 2021). Le più distruttive tra queste malattie sono il mal dell’esca e l’esca giovane “*young esca*” che si sviluppano rispettivamente sia nei vigneti in produzione che nei vigneti giovani (Halleen *et al.*, 2003; Larignon e Dubos 1997; Martin e Cobos 2007; Mugnai *et al.*, 1999). Un’ampelopatia alquanto grave, presente in Europa e nel resto del mondo è l’eutipiosi causata dall’agente fungino *Eutypa lata*, ampiamente diffuso in natura, potendo parassitizzare varie specie arboree. Su vite è in grado di infettare il legno di due e più anni a partire dai tagli e dalle ferite prodotte sul cordone permanente con le potature. Le piante sintomatiche mostrano uno sviluppo vegetativo stentato, caratterizzato dalla presenza di tralci esili e corti, internodi molto ravvicinati, tali da indurre uno sviluppo vegetativo di tipo cespuglioso e la formazione di scopazzi (Borgo, 2016). A questo elenco si aggiungono la malattia di Petri e la malattia del piede nero (*Campylocarpon*, *Cylindrocladiella*, *Dactylonectria*, *Ilyonectria radicularis*)

e *Neonectria* spp.) che comportano una riduzione della produttività e della longevità delle viti causando notevoli perdite economiche per il settore (Gramaje e Armengol, 2011). Un'altra malattia del tronco della vite, che ha preso interesse solo in epoca più recente, è il cancro delle branche (*Black Dead Arm*, BDA). È una fitopatia altrettanto complessa, attribuita ad infezioni causate da *Botryosphaeriaceae* spp., che includono varie specie di funghi in grado di provocare sintomi su foglie e su legno, in parte diversi da quelli causati dal mal dell'esca. Test biomolecolari su campioni di viti sintomatiche sono utili, per una corretta diagnosi dei funghi potenzialmente coinvolti nell'espressione delle malattie. Le piante colpite da *Botryosphaeriaceae* spp. presentano una riduzione della crescita, nanismo fogliare, defogliazione dei tralci, che si presentano biancastri e con completo o parziale disseccamento, nonché necrosi e cancri settoriali sul legno del tronco e della branca. Le foglie inizialmente presentano tacche di colore giallo-vivo sui vitigni ad uva bianca e rosso-vinoso su quelli ad uva nera; successivamente possono assumere sintomi simili a quelli del mal dell'esca. Le macchie fogliari appaiono delimitate da un alone giallo o rosso-violaceo; risultano distribuite sulla lamina o, più abbondantemente, possono essere concentrate lungo i margini. Inoltre, le foglie possono perdere improvvisamente il turgore, formando macchie di colore grigio-verdastro o grigio-arancio. Con lo scortecciamento del legno è possibile notare la presenza di bande brune, di colore giallo-aranciato, che si estendono in profondità per alcuni millimetri e in senso longitudinale, fino a raggiungere il punto d'innesto (Borgo, 2016). Altre infezioni fungine dovute a specie appartenenti al genere *Neofusicoccum* provocano invece decolorazioni fogliari di tipo rossastro o giallo scuro, che si estendono tra le nervature principali; possono inoltre causare forme gravi di disseccamento della vegetazione e del legno, su cui compaiono bande necrotiche sottocorticali e imbrunimenti nei tessuti più interni, soprattutto in corrispondenza del punto d'innesto e nella parte basale della marza.

Tabella 1 - Principali malattie del legno della vite.

Malattia fungina	Agente causale
Mal dell'esca	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i> <i>Phaeoacremonium minimum</i> <i>Fomitipora mediterranea</i>
Eutipiosi	<i>Eutypa lata</i>
Cancro delle branche (BDA)	<i>Botryosphaeriaceae</i> spp. <i>Neofusicoccum</i> spp.
Verticilloso	<i>Verticillium dahliae</i>
Piede nero	<i>Campylocarpon</i> , <i>Cylindrocladiella</i> , <i>Dactylonectria</i> , <i>Ilyonectria radicola</i> e <i>Neonectria</i> spp.

Considerata la complessità delle GTD, risulta di fondamentale importanza fare il più possibile ricorso ad analisi di laboratorio per una corretta diagnosi fitopatologica (Borgo, 2016), utile per studiare e comprendere meglio l'eziologia e l'epidemiologia di queste malattie così complesse.

2.1 DIFFUSIONE DELLE MALATTIE DEL TRONCO DELLA VITE NEL MONDO

Le malattie del legno della vite sono presenti in tutto il mondo ma in Europa la principale è certamente il complesso del mal dell'esca, seguito dai cancri o morie da *Eutypa lata* e dai cancri o morie da *Botryosphaeriaceae* (Mugnai, 2021). Di seguito, alcuni dati con riferimento all'impatto di queste malattie in diversi paesi a livello mondiale (Figura 2), tratti dal report del OIV (*International Organisation of Vine and Wine*) del 2016:

- **Spagna:** Dal 2003 (anno della proibizione dell'arsenito di sodio in Spagna), l'impatto delle malattie del tronco nei vigneti è cresciuto dall'1,8% al 10,5% nel 2007 (Rubio e Garzón, 2011).
- **Francia:** Secondo l'indagine condotta dalla Direzione Generale per l'Alimentazione (DGAL) nel 2012, quasi il 13% dei vigneti francesi è attualmente affetto da malattie del legno (Grosman e Doublet, 2012). Si tratta quindi di una grande preoccupazione per i viticoltori da quando, nel 2001, è

stato vietato l'arsenito di sodio che era l'unica molecola efficace contro il mal dell'esca. Secondo il Ministero dell'Agricoltura e l'Istituto francese del vino (IFV), le malattie note come mal dell'esca, cancro delle branche ed eutipiosi, hanno ridotto il potenziale di produzione di vino del 13% in Francia nel 2014. È stato studiato l'aumento dei sintomi nei vigneti francesi e la loro incidenza ha raggiunto valori superiori al 10% per il deperimento da *Botryosphaeria* e al 25% per il deperimento da *Eutypa* (Bruez *et al.*, 2013). Queste malattie costano alla Francia l'equivalente di 1 miliardo di euro (1,14 miliardi di dollari) all'anno in perdita di produzione di vino, ha affermato l'IFV, e ciò significa che più di 100.000 ettari di vigneti sono andati perduti nel 2014. Inoltre, tra il 10 e il 15% della produzione potenziale è andata perduta lo scorso anno. *InterLoire* stima che almeno il 5% dei vigneti europei siano colpiti da GTD.

- **Italia:** Le GTD rappresentano un problema crescente per molti vigneti in tutte le regioni italiane. Di solito i sintomi si manifestano tra gli 8 e i 10 anni di età; solo occasionalmente sono evidenti sulle viti più giovani. Si precisa che l'incidenza delle diverse malattie dipende dalla suscettibilità varietale: su piante di 15-18 anni l'incidenza media può oscillare rispettivamente intorno al 12-19% per vitigni a bacca bianca, intorno all'8-10% per vitigni a bacca nera. In alcune regioni dell'Italia centrale e meridionale dove sono stati condotti studi epidemiologici (come Toscana, Marche, Abruzzo, Puglia e Sicilia), in condizioni estreme l'incidenza del mal dell'esca ha raggiunto il 60%-80% in alcuni vecchi vigneti (Romanazzi *et al.*, 2009). In molte aree la malattia è presente nel 90-100% dei vigneti con un'incidenza annuale variabile, nei vigneti di 15-25 anni, dall'1 al 50% e un incremento medio annuo valutato fra il 4 e il 5%. La percentuale annua di viti colpite da apoplezia si colloca invece intorno al 2% (Parrini e Pandolfo, 1990; Minervini *et al.*, 1997).
- **Portogallo:** Le GTD sono ampiamente diffuse in tutte le regioni produttrici di uva, in particolare nelle regioni di Vinhos Verdes, Douro, Dão e Alentejo. Il deperimento da *Botryosphaeria* spp. e mal dell'esca sono le principali malattie che colpiscono le viti adulte e provocano ingenti danni e perdite economiche. L'incidenza del deperimento di *Eutypa lata* risulta bassa rispetto ad altri paesi vicini. Le indagini sul declino delle viti giovani, condotte da Rego *et al.* (2005),

hanno mostrato che, a livello del portainnesto, sono predominanti la malattia del piede nero e la malattia di Petri, ma sono presenti anche altre malattie del legno come il deperimento da *Botryosphaeria* spp. Nei tessuti sopra il punto d'innesto prevale la *Botryosphaeria* spp., tuttavia sono stati osservati anche sintomi del piede nero e la malattia di Petri.

- **USA:** In California le perdite annuali dovute al deperimento da *Eutypa lata* e da *Botryosphaeria* spp., due malattie del tronco molto diffuse nella regione, rappresentano il 14% del valore lordo della produzione delle uve da vino della California. In California, alle malattie del tronco sono state attribuite perdite economiche pari ad almeno 260 milioni di dollari all'anno (Siebert, 2001) e alcuni studi indicano che è necessario un intervento precoce per limitare la diffusione della malattia e la perdita di reddito (Smart, 2015). L'esca provoca una perdita di circa 2000-3000 dollari per ettaro all'anno per viticoltore californiano (Rubio e Garzón, 2011).
- **Australia:** L'eutipiosi è una delle principali malattie della vite che causa notevoli perdite economiche (circa 8,3 miliardi di dollari) all'industria vinicola australiana (Ridgway *et al.*, 2014). In Australia, sono state segnalate perdite di rendimento fino a 1500 kg/ha per i vigneti di Shiraz (Sosnowski *et al.*, 2013).
- **Argentina:** Nel 30% dei vigneti adulti (più di 10 anni e che rappresentano l'81% della superficie vitata totale) la “*hoja de malvón*” (una malattia con sintomi diversi ma solitamente paragonabile all'esca in Europa) è stata rilevata durante uno studio nazionale nel 2008 (Van den Bosch *et al.*, 2011).
- **Turchia:** Il tasso di esca è molto basso nelle regioni turche. Ad esempio, è stato determinato pari al 2,61% nei vigneti di Tekirdag, nella regione di Marmara (Ari, 2000).
- **Nuova Zelanda:** Un'indagine nazionale effettuata sul materiale sintomatico proveniente da 43 vigneti ha mostrato che l'88% presentava un certo grado di infezione da *Botryosphaeria* spp. (Ridgway *et al.*, 2014).

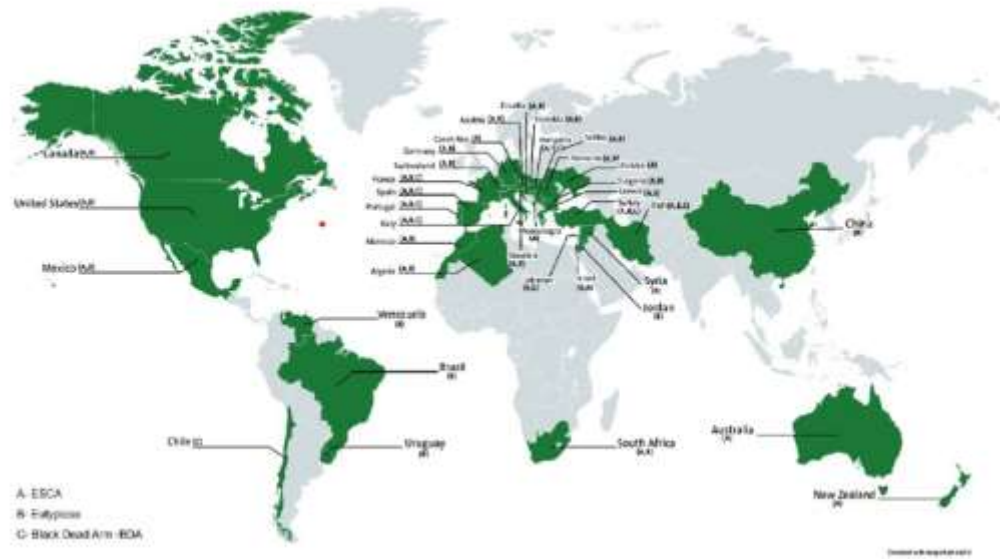


Figura 2: Distribuzione globale delle principali malattie del tronco della vite: esca, eutipiosi e cancro delle branche (BDA) (Kenfaoui *et al.*, 2022).

3. IL COMPLESSO DEL MAL DELL'ESCA

3.1 STORIA DELLA MALATTIA

Fin dal tempo dei Greci e dei Romani (come riportato da Plinio il Vecchio) era in uso il nome “iska” o “esca” per indicare il legno cariato, decomposto, inconsistente, spugnoso, ma non necessariamente formatosi per effetto di malattie. Accenni a sintomi in qualche modo riferibili a questa fitopatìa sono infatti rintracciabili in opere di alcuni autori classici, ad esempio Teofrasto (ca. 370 - 285 a.C.) e Plinio il Vecchio (23-79 d.C.) (Mugnai, 1999). Solo a partire dai primi anni del Novecento si iniziò a parlare di una nuova vera e propria forma di malattia, in seguito meglio identificata come mal dell'esca che, a livello mondiale, venne classificata come una delle più importanti e temute ampelopatie per le sue gravi epidemie e per gli ingenti danni economici alla viticoltura mondiale. Gli studi, che permisero di fare luce e chiarezza sulla eziologia del mal dell'esca, vennero affrontati con maggiore interesse agli inizi del XX secolo, poiché, intorno alla metà degli anni 1850, in vigneti del Sud-Est della Francia si andava diffondendo una malattia responsabile di improvvisi avvizzimenti e deperimenti della vegetazione (chiamati *folletage*), e accompagnati da legno cariato. Qui, dopo varie segnalazioni fatte da Luis Ravaz tra fine secolo XIX e inizio Novecento, solo nel 1926 il professor Pierre Viala, specialista di patologia viticola dell'*Institut National Agronomique de Versailles*, descriveva e illustrava i sintomi fogliari, che si caratterizzavano per la formazione di tigrature internervali e disseccamenti della lamina. Recrudescenze sempre più intense, se non anche cruente e inarrestabili, si susseguirono poi nei vari territori viticoli dell'area mediterranea, tra cui anche l'Italia. Qui, infatti, oltre alle segnalazioni di viti con tigrature osservate in vigneti della Puglia, intorno agli anni '30 vennero evidenziati accentuati deperimenti e morie anche in vitigni del Nord, in particolare a seguito delle intense gelate che, negli stessi anni, avevano colpito viti giovani e vecchie sia di varietà da vino che di ibridi, allora molto diffusi. Con il passare degli anni le recrudescenze delle epidemie si estesero in tutto il territorio nazionale e trovarono facile enfasi, sia in concomitanza di ripetute gelate invernali negli anni '80, sia in relazione a differenti fattori agronomici e colturali, quali la suscettibilità delle principali varietà che si andavano affermando, le forzature vegetative finalizzate ad aumentare le rese produttive e le nuove forme di potatura a cordone rinnovabile (Borgo, 2016). I ricercatori dell'Università di Firenze sono stati i

primi ad isolare 200 funghi ritenuti responsabili del mal dell'esca nelle barbatelle (Cinquemani, 2020).

3.2 GLI AGENTI CAUSALI DEL MAL DELL'ESCA ED IL LORO CICLO VITALE

Al mal dell'esca della vite è associato un complesso di agenti causali che agiscono singolarmente, in successione o contemporaneamente. Oggi si ritiene che i principali agenti associati al mal dell'esca in Italia siano *P. chlamydospora*, *P. minimum* e altre specie di *Phaeoacremonium*, nonché *F. mediterranea*. Inoltre, sembrano coinvolte a vario titolo diverse specie di *Botryosphaeriaceae* (Romanazzi *et al.*, 2016).

- *Phaeomoniella chlamydospora* è un fungo mitosporico *Ascomycota*, il più importante organismo fungino associato alla malattia di Petri (una delle sindromi incluse nel complesso del mal dell'esca), che si riproduce tramite conidi formati direttamente lungo le ife del micelio vegetativo tramite particolari cellule modificate (fialidi) (Figura 3). In coltura forma caratteristiche colonie di colore verde scuro, inizialmente lucide e biancastre. Forma, inoltre, particolari strutture di conservazione, le clamidospore, atte solitamente a facilitare e prolungare la conservazione dei funghi nel terreno. Non ne è nota la forma perfetta. Il fungo è in grado di propagarsi durante tutto l'anno tramite la diffusione aerea dei conidi prodotti dal micelio presente come saprofita anche sulla stessa corteccia della vite (Larignon, 1999).

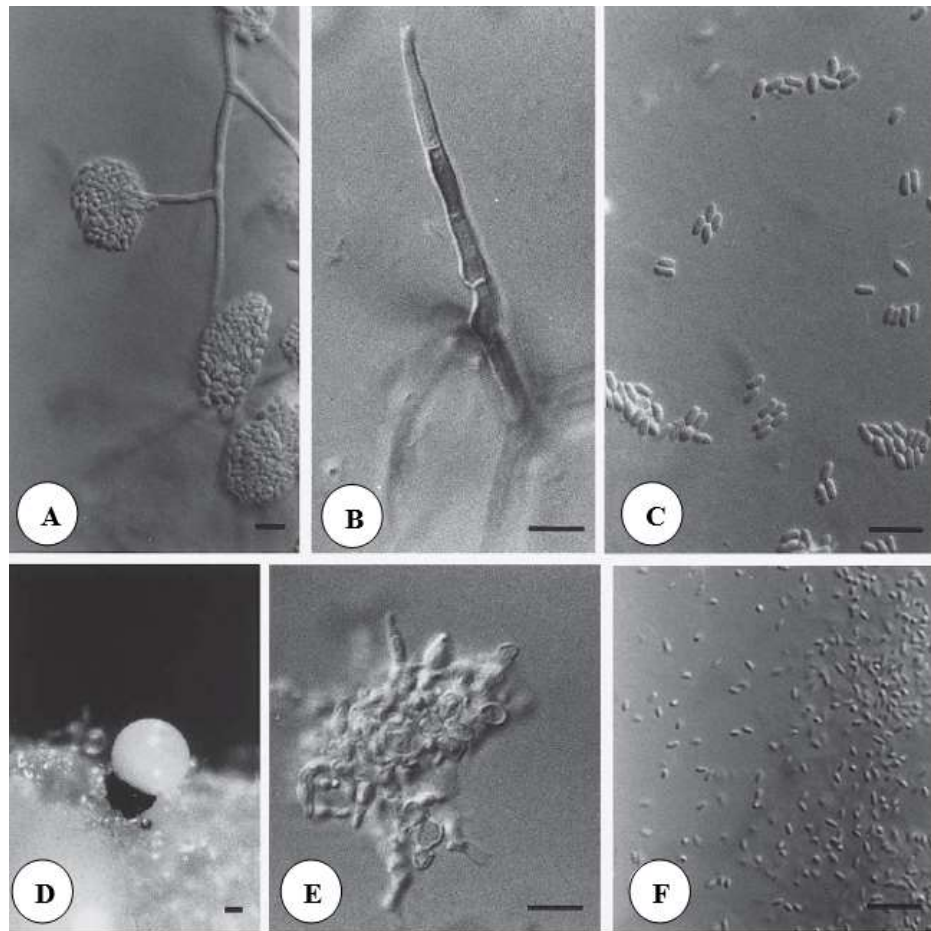


Figura 3: Osservazione al microscopio di *Phaeomoniella chlamydospora* e il suo sinanamorfo (tutte le barre =10 mm, eccetto **D** = 20 mm): **A.** Conidiofori e conidi che si formano sul micelio aereo; **B.** Conidioforo solitario con cellula conidiogena subialina; **C.** Conidi; **D-F.** Sinanamorfo; **D.** Picnidio; **E.** Ammasso denso di conidiofori con cellule conidiogene; **F.** Conidi (Gams *et al.*, 2000).

- *Phaeoacremonium minimum* (ex *P. aleophilum*) è una specie simile a *P. chlamydospora* anche questo un *Ascomycota*, da cui però si differenzia principalmente per l'assenza di clamidospore, per alcuni caratteri morfologici dei conidi e delle cellule conidiogene e per l'aspetto della colonia in coltura artificiale, di colore da grigio cenere a nocciola con frequente produzione di un pigmento giallo nel substrato (Figura 4). Alcuni studi suggeriscono che la sua capacità di diffondere le spore per via aerea sia inferiore a quella di *P. chlamydospora* (Larignon *et. al.*, 1999).

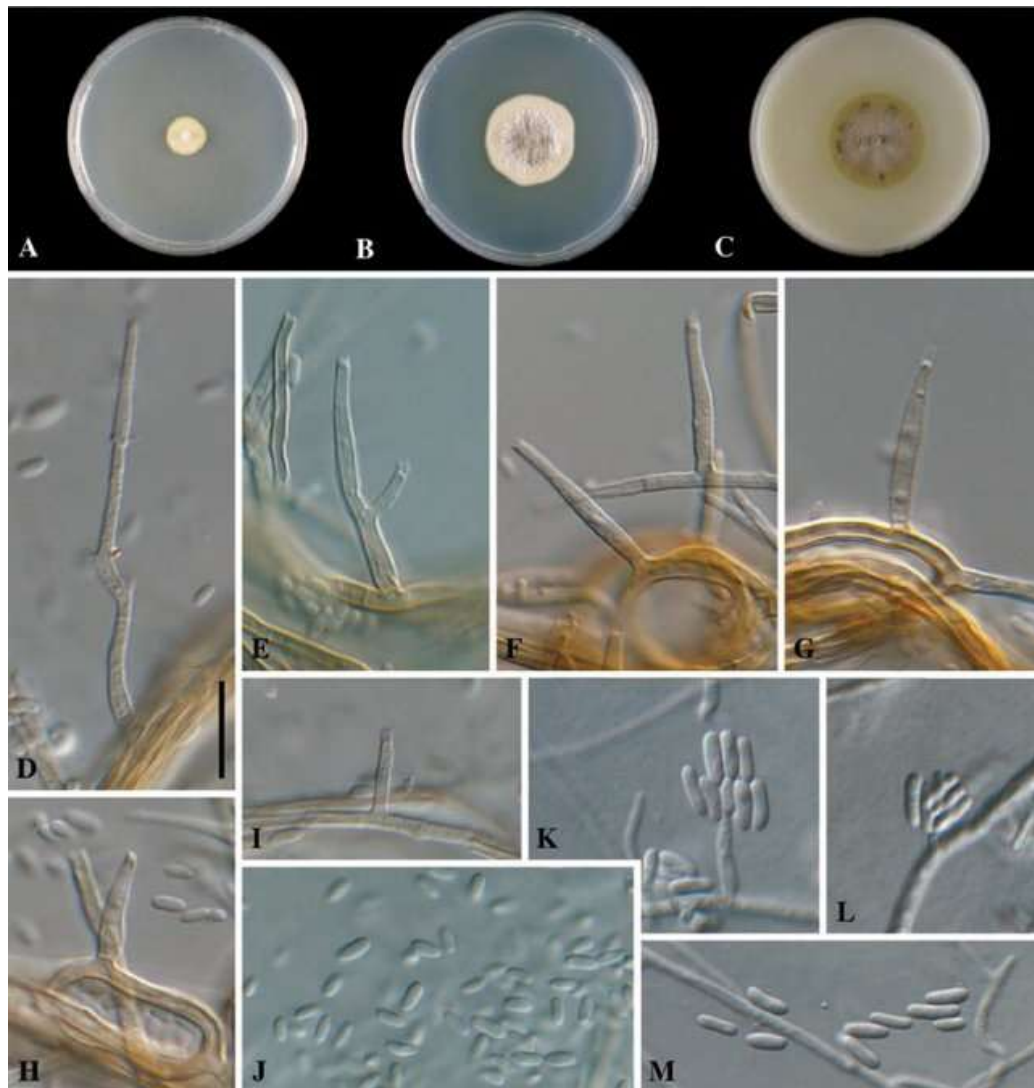


Figura 4: Osservazione al microscopio di *Phaeoacremonium minimum* (ex *P. aleophilum*) (Mostert *et al.*, 2006): **A-C.** Colonie di sedici giorni cresciuta su *malt extract agar* (MEA); **D-J.** Strutture aeree su MEA; **D-E.** Conidiofori; **F-I.** Fialidi; **J.** Conidi ;**K-L.** Adelofialide con conidi; **M.** Conidi; **N-P.** Conidiofori (Mostert *et al.*, 2006).

- *Fomitiporia mediterranea* M. Fisch. è un basidiomicete descritto nel 2002, fino ad allora considerato parte di *Fomitiporia punctata* (P. Karst) Murrill. Questo fungo può degradare la biomassa lignocellulosica, causando marciume bianco e lasciando residui fibrosi bianchi nell'ospite. In Europa è considerato il principale agente del marciume legnoso della vite all'interno del complesso della malattia dell'esca. I corpi fruttiferi di *F. mediterranea* (Figure 5 e 6) color cannella sono legnosi resupinati, inseparabili, duri,

spessi fino a 15 mm con margini stretti bruno-giallastri, contenenti basidiospore da sub-globose a ovali. Il sistema ifale è dimitico, con ife generative e scheletriche (Moretti *et al.*, 2021). L'inoculo, più spesso, proviene per via aerea da altri ospiti (specie spontanee, specie forestali, olivo ecc.).

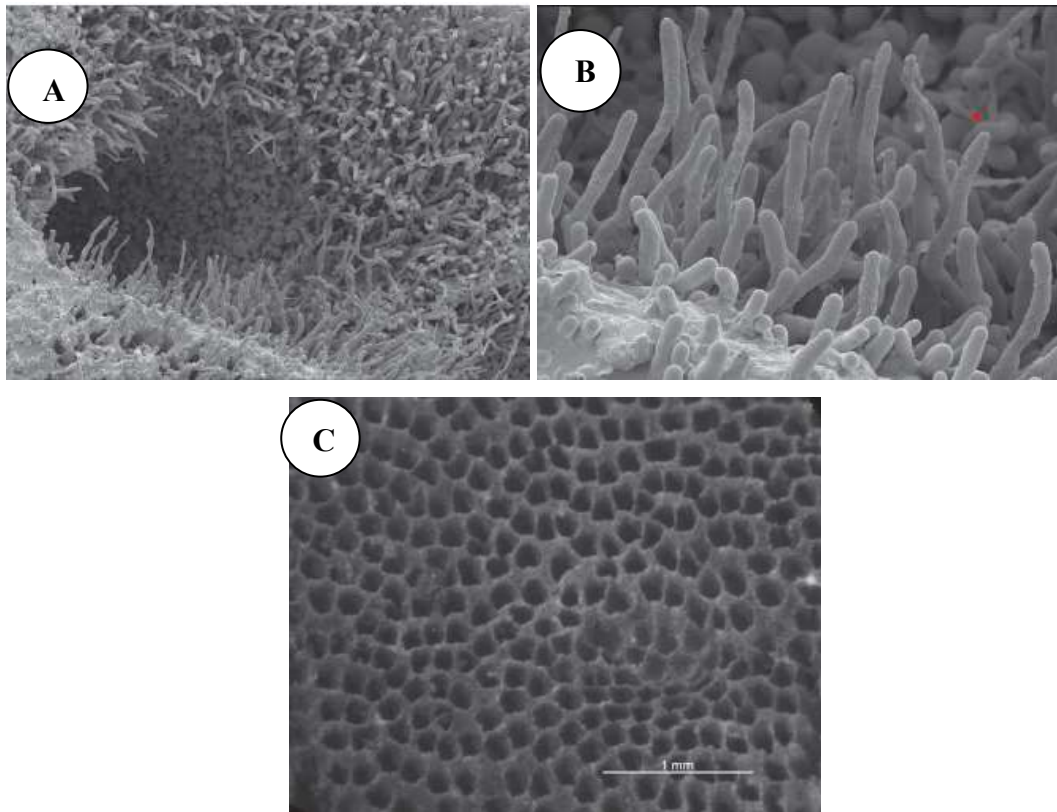


Figura 5: **A.** micrografia al microscopio elettronico a scansione Cryo-SEM (ingrandimento 500x) che mostra la crescita delle ife vegetative di *F. mediterranea*; **B.** micrografia Cryo-SEM (2.000x) di ife in una sezione trasversale di un tronco di vite naturalmente affetto da carie bianca; **C.** stereo-micrografia della superficie di un corpo fruttifero di *F. mediterranea* (50x). I pori hanno un diametro di 5-8 mm. Il campione di vite malata è stato raccolto in un vigneto a Pfaffenweiler, nel sud-ovest della Germania (Moretti *et al.*, 2021).



Figura 6: Corpi fruttiferi di *Fomitiporia mediterranea* su un tronco di vite. Fotografia scattata nel luglio 2018, cv ‘Sauvignon Blanc’, in un vigneto a Ehrenkirchen, in Germania (Moretti *et al.*, 2021).

Gli agenti delle infezioni vascolari e dei cancri (*P. chlamydospora*, specie di *Phaeoacremonium*), si riproducono tramite picnidi o, in alcuni casi, forme ifali (forma asessuata) e/o periteci (forma sessuata), che si formano negli anfratti della corteccia, sulle vecchie ferite di potatura, ma anche sui tralci, dove restano attivi anche per 3-4 anni (Crous e Gams, 1996). Da qui, in seguito alle piogge che provocano la liberazione delle spore (conidi o ascospore), parte l’inoculo che, quando raggiunge ferite sul legno (p.e. di potatura, di scacchiatura), provoca le infezioni. La dispersione delle spore avviene principalmente per via aerea (Larignon *et al.*, 2008) per tutto l’anno. Le ferite da potatura rimangono suscettibili all’ingresso delle spore fino a 4 mesi dopo la potatura e la diffusione avviene anche durante il periodo vegetativo (Eskalen *et al.*, 2007; Serra *et al.*, 2008; Luque *et al.*, 2014; Elena e Luque, 2016). Le varie ferite

dovute a defogliazione, cimatura e potatura verde rappresentano potenziali vie di penetrazione di *P. chlamydospora*, come dimostrato nei test di inoculazione (Larignon *et al.*, 2009). È anche possibile la propagazione del fungo da parte di artropodi, in particolare millepiedi (*Ommatoiulus moreleti* Lucas) e formiche (*Crematogaster peringueyi* Emery) (Moyo *et al.*, 2014). Alcuni studi hanno dimostrato che *P. chlamydospora* invade anche i vasi xilematici e che, una volta stabilitasi nel lume e nelle fibre dello xilema, è in grado di svilupparsi anche in altri tessuti, come il parenchima o i raggi, (Valtaud *et al.*, 2009; Pouzoulet *et al.*, 2013), e quindi il principale apporto di nutrienti è fornito dalla linfa dello xilema. Considerato un potenziale patogeno del suolo, a causa della sua capacità di produrre strutture simili a clamidospore in coltura (Crous e Gams, 2000), è stato rilevato con metodi molecolari nei terreni dei vigneti della Nuova Zelanda (Whiteman *et al.*, 2002) e del Sud Africa (Damm e Fourie, 2005; Retief *et al.*, 2006). Si ritiene che le clamidospore formino conidi in grado di penetrare nelle radici illese delle viti nei vivaio o nei vigneti (Bertelli *et al.*, 1998; Feliciano e Gubler, 2001). Halleen *et al.* (2003) hanno campionato la presenza di *P. chlamydospora* in talee di vite in vivaio, diversi mesi dopo la semina, scoprendo che, sebbene presente come endofita, nel materiale sano del portinnesto questa specie raramente si trovava nelle radici, suggerendo che non fosse un patogeno principalmente trasmesso dal suolo (Sofia, 2018).

Tutti gli agenti fungini di malattie del legno infettano il legno tramite ferite e tutti producono le proprie strutture riproduttive sui tessuti che hanno colonizzato e poi condotto a morte (Figura 7).

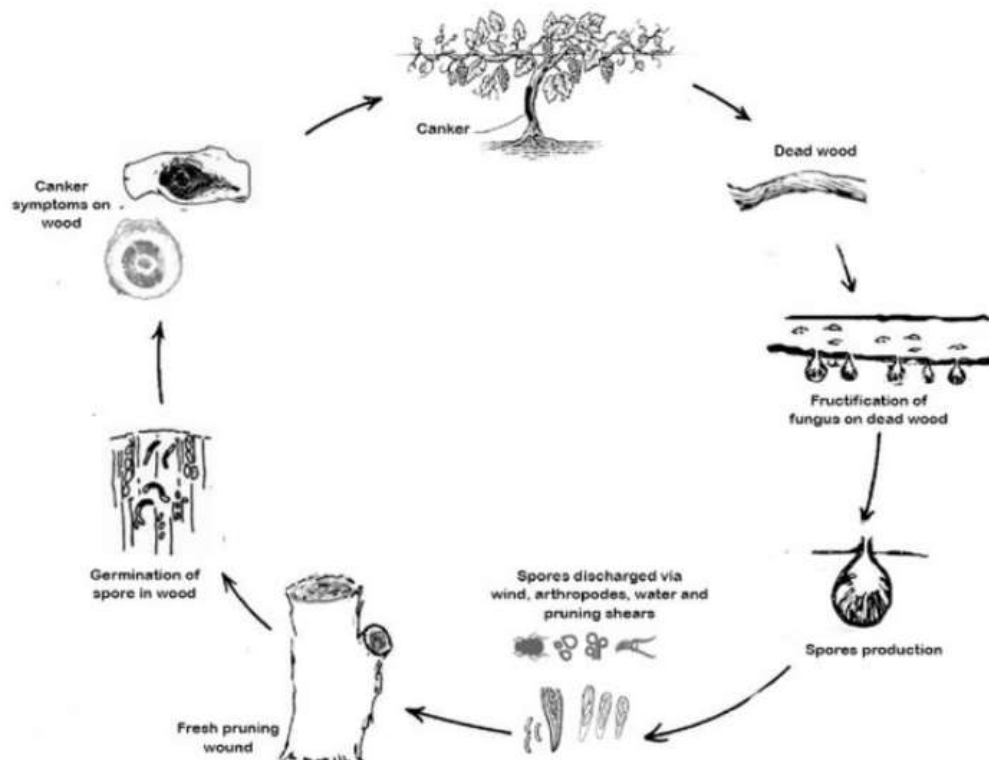


Figura 7: Il ciclo vitale dei funghi che causano il mal dell'esca della vite (Kenfaoui *et al.*, 2022).

3.3 LE MALATTIE INCLUSE NEL COMPLESSO DELL'ESCA

Recenti studi hanno portato ad includere nel complesso del mal dell'esca diversi quadri sintomatologici, associati inizialmente a malattie GTD, che si caratterizzano sia per i sintomi sia per il ruolo esercitato da vari funghi coinvolti:

- **Malattia delle venature brune delle barbatelle e delle viti giovani:** sintomi specifici possono essere osservati sui tessuti del legno, mentre il fogliame può risultare indenne o mostrare anomalie di non facile interpretazione. Sezioni trasversali e longitudinali vanno fatte sul legno del portinnesto e della marza in barbatelle e/o in viti ancora giovani. Servono per accertare l'eventuale presenza combinata di punteggiature e di striature bruno-nerastre, localizzate intorno al midollo o distribuite sullo xilema, e della fuoriuscita di un essudato mucillaginoso, gommoso e scuro, prodotto dall'attività dei funghi *P. chlamydospora* e/o *P. minimum*. Questa peculiarità sintomatologica è utile per

discriminare la presenza di malattie fungine rispetto ad imbrunimenti di tipo ossidativo, che normalmente si formano sulle barbatelle innestate e che interessano maggiormente i tessuti del tallone, quelli prossimi al midollo e la zona dell'innesto, senza comunque generare essudati con mucillagine scura (Figura 8).



Figura 8: Infezioni fungine del legno possono aver luogo anche durante le operazioni di allestimento delle barbatelle in vivaio, e sono testimoniate da imbrunimenti e striature soprattutto nel portainnesto visibili sulla barbatella pronta per l'impianto (malattia delle venature brune) (Mugnai, 2021).

- **Malattia di Petri (*black goo*):** può essere riscontrata su viti di 2-4 anni e rappresenta l'evoluzione della precedente malattia. Le viti ammalate, in prevalenza infettate dalle suddette specie fungine, presentano foglie clorotiche, una crescita stentata, un rapido declino vegetativo e la mancata produzione di uva; nei casi più gravi si può avere la morte della pianta. Sezioni trasversali del tronco, soprattutto a livello del portainnesto, mostrano il midollo centrale di colore scuro, circondato da un anello bruno-scuro e da macchie nerastre sparse in maniera irregolare dalle quali fuoriesce la mucillagine gommosa e scura sopra indicata (Figura 9); le sezioni longitudinali confermano la presenza di intense striature e di venature bruno-nerastre (Figura 10). L'apparato radicale non mostra particolari anomalie.



Figura 9: Fuoriuscita di un essudato mucillaginoso scuro prodotto dall'attività dei funghi *Phaeomoniella chlamydospora* e/o *Phaeoacremonium minimum* in corrispondenza dei tagli di potatura. Foto vigneto sperimentale di Castelplanio (AN) del 21 marzo 2023.

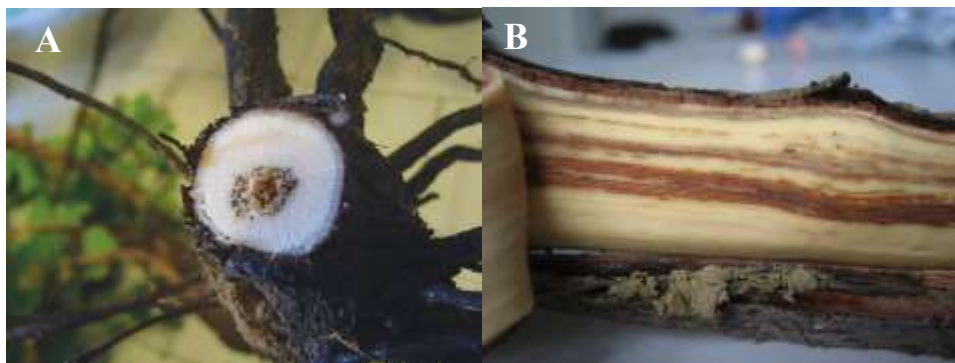


Figura 10: **A** Vasi colonizzati da patogeni vascolari (per lo più *Phaeomoniella chlamydospora* e *Phaeoacremonium minimum*) che si presentano, in sezione trasversale, come punteggiature nere, e in sezione longitudinale **B**, come striature brune o nere (Mugnai, 2021).

- **Esca o esca giovane:** costituisce l'evoluzione delle tracheomicosi sulle viti in età giovanile; essa si caratterizza per la presenza dei classici sintomi fogliari di mal dell'esca (Figura 11), accompagnati da alterazioni brune sul legno del tronco e delle branche (Figura 12). Nella maggioranza dei vitigni coltivati in Italia i primi sintomi fogliari associati a mal dell'esca compaiono intorno all'ottavo-decimo anno; tuttavia possono essere anticipati intorno al quarto-quinto anno di vita nel caso di varietà altamente sensibili alla malattia e/o di avverse condizioni edafiche e pedoclimatiche.



Figura 11: Tigratura fogliare, tipico sintomo del mal dell'esca su Verdicchio - zone internervali clorotiche, che evolvono successivamente in necrosi. Foto vigneto sperimentale di Castelplanio (AN) del 6 luglio 2023.



Figura 12: Punteggiature nere, legno bruno-rosso e carie: molto spesso nella stessa pianta si trovano contemporaneamente diverse alterazioni del legno dovute alla colonizzazione dei tessuti a partire da ferite in tempi e posizioni diverse, da parte di diversi patogeni (Mugnai, 2021).

- **Carie bianca:** associa la tipica carie del legno, che si viene a formare a seguito di infezioni da *Fomitiporia* (*F. australiensis*, *F. polymorpha*, ecc.). In Europa, la specie in assoluto più presente nel legno di vite cariato è *F. mediterranea*, fungo responsabile della degradazione dei tessuti legnosi deteriorati. La carie (Figura 13) costituisce una particolare forma di marciume del legno, la cui

lignina viene decomposta dagli enzimi prodotti dai funghi. Il legno ammalato si trasforma in un ammasso spugnoso, molle, friabile, di colore bianco-giallastro e, seccandosi, si spacca longitudinalmente. La parte cariata è delimitata da un alone scuro che separa i tessuti alterati da quelli non ancora intaccati; si estende a partire da vecchie ferite presenti sul tronco e sulle branche e si espande progressivamente in senso acropeto e basipeto fino al portinnesto.



Figura 13: Carie bianca sul tronco e sulla branca di una pianta di Chardonnay colpita da *Fomitiporia mediterranea*. Si può notare molto bene il tessuto spugnoso di colore bianco-giallastro nel quale la lignina è stata degradata. Foto vigneto sperimentale di Osimo (AN) del 21 agosto 2023.

L'esca propria: costituisce l'epilogo del complesso patologico con la sovrapposizione dell'esca giovane e della carie. Questa sindrome è associata alla contemporanea presenza di tre funghi principali: *P. chlamydospora*, *P. minimum* e *F. mediterranea*. I sintomi esterni dell'esca sono uguali a quelli dell'esca giovane, mentre quelli interni sono costituiti da venature brune e carie bianca. Generalmente, l'esca propria si manifesta su viti mature, ma non è affatto rara anche in piante giovani, e può rappresentare l'ultima evoluzione delle sindromi precedentemente descritte (Surico e Mugnai, 2001).

- **Colpi apoplettici:** coincidono con forme di avvizzimento e di defogliazione della chioma e possono essere il risultato della sovrapposizione di uno o più quadri sintomatologici. Colpiscono anche viti mediamente giovani e apparentemente sane. Nel periodo compreso tra fine primavera e inizio estate, le piante con apoplezia soggiacciono ad un improvviso avvizzimento del fogliame, che comporta il completo disseccamento della vegetazione e la totale perdita dell'uva (Figura 14). In poche ore le foglie perdono turgore, avvizziscono completamente o su ampi settori ad iniziare dai bordi; successivamente diventano di colore verde-grigio e poi si seccano. I tralci si disidratano a partire dalle punte e gli internodi si disseccano parzialmente. Dopo lo choc, la pianta può manifestare segni di parziale ripresa vegetativa, anche se limitata ad alcuni tralci, con possibile formazione di nuovi ricacci a partire da gemme secondarie del tronco o degli speroni. Togliendo qualche porzione della corteccia, è possibile osservare ampie striature di colore giallo-bruno, alternate a bande più chiare, che si estendono lungo il fusto e il cordone permanente oppure che restano limitate ad un settore del tronco. Le cause della sindrome non sono ancora ben definite in quanto gli accertamenti sanitari su campioni di vite ammalate hanno portato ad isolare una ampia popolazione fungina, spesso diversa da quella finora presa in esame (Borgo, 2016).



Figura 14: colpo apoplettico su una pianta di Verdicchio. Tutti gli organi della pianta risultano secchi ed irrecuperabili. Foto vigneto sperimentale di Montecarotto (AN) del 23 agosto 2023.

3.3.1 Sintomatologia

Il mal dell'esca è una malattia latente che, in genere, può essere identificata solo quando si manifestano i sintomi fogliari. Questa identificazione è complicata poiché i sintomi dell'esca presentano somiglianze con quelli del cancro delle branche; quindi, sono stati confusi fino al 2000 ma in seguito sono stati identificati più chiaramente sulle cultivar a bacca nera (Larignon *et al.*, 2001). I sintomi fogliari del mal dell'esca, a parte occasionali ritardi nel germogliamento delle viti colpite, si manifesta, grosso modo, tra giugno e settembre con sintomi su tutta la chioma o anche su singole branche, quando aumentano i tassi di traspirazione e la richiesta di acqua (Mugnai, 1999).

Il mal dell'esca può mostrare due diverse evoluzioni: di tipo cronico o di tipo acuto. Nel primo caso, piante sintomatiche possono riprendere a vegetare regolarmente nell'annata successiva e non manifestare sintomi anche negli anni successivi. La forma acuta (apoplezia) si manifesta in luglio-agosto e si caratterizza per il fatto che in pochi giorni, su piante all'apparenza sane, disseccano completamente tralci, foglie e frutti (Romanazzi *et al.*, 2016).

3.3.1.1 Sintomi su foglie

Il sintomo più immediato e che permette di diagnosticare la presenza del mal dell'esca sulla vite è la comparsa delle alterazioni cromatiche sulle foglie (Figura 15). Generalmente è bene evidente durante l'estate e raggiunge la massima espressione in prossimità della maturazione dell'uva. Tuttavia, su piante affette da forme croniche di mal dell'esca i primi sintomi possono comparire fin dalla ripresa vegetativa; essi rappresentano la conseguenza di infezioni croniche e gli effetti delle tossine prodotte dai funghi e accumulate nei tessuti del legno, poi traslocate attraverso il flusso linfatico alle foglie. Innanzitutto, le viti ammalate accusano un grave ritardo nel germogliamento, mostrano germogli con gemme appena schiuse rispetto ai germogli regolarmente sviluppati, come è possibile invece osservare su altre parti della stessa pianta e sulle viti vicine, apparentemente sane. Le foglie basali ancora giovani iniziano a manifestare strane anomalie, che sono il preludio della classica espressione del mal dell'esca: la lamina fogliare porta bordi lievemente ripiegati ed è cosparsa di numerose tacche di colore verde pallido, di tipo irregolare e grandi circa un centimetro. Con

l'invecchiamento della lamina fogliare, le tacche intensificano la colorazione che vira verso il bruno; esse si ingrandiscono in modo da confluire tra loro, dando forma alle tipiche tigrature internervali (Figura 16). Si vengono quindi a formare estese macchie decolorate con vistose aree clorotiche o rossastre, spesso necrotizzate e secche, maggiormente localizzate lungo i bordi e tra le nervature principali. Le foglie, con il loro invecchiamento e con l'aggravarsi della malattia, perdono progressivamente il turgore e la funzionalità e poi cadono anticipatamente. Questa peculiarità sintomatologica viene progressivamente ad interessare anche le foglie in posizione mediana, fino a colpire quelle apicali per poi culminare sulle foglie delle femminelle, a meno che la vite non cada in anticipata apoplessia. I sintomi dell'apoplessia appaiono improvvisamente nel mezzo dell'estate quando un'intera pianta o singole branche avvizziscono completamente: le foglie acquistano un colore meno verde, poi grigiastro e infine, in pochi giorni, avvizziscono (Figura 17). La stessa sorte può toccare ai grappoli. Generalmente sono colpite da apoplessia piante che avevano manifestato, nello stesso anno o in anni precedenti, i sintomi della forma cronica, inclusi ovviamente quelli interni del fusto (Mugnai, 1999).



Figura 15: Sintomi fogliari tipici delle manifestazioni del mal dell'esca a luglio su Trebbiano romagnolo, colorazioni gialle internervali con conseguente disseccamento delle foglie; foto scattata a luglio in un vigneto situato nella Repubblica di San Marino.



Figura 16: tipica tigratura dovuta al mal dell'esca su cv. Verdicchio; foglie più vecchie virano di colore verso il bruno. Foto vigneto sperimentale di Castelplanio (AN) del 23 agosto 2023.



Figura 17: colpo apoplettico su Verdicchio ad agosto; le piante sono totalmente secche in quanto non avviene più il passaggio della linfa a livello del tronco colpito dai funghi. Foto vigneto sperimentale di Castelplanio (AN) del 23 agosto 2023.

3.3.1.2 Sintomi su grappoli

I sintomi sui grappoli e sugli acini si manifestano all'invasatura o poco prima con numerose macchie puntiformi, brune o bruno-violacee isolate o confluenti, irregolarmente sparse sulla superficie della bacca oppure aggregate, intorno all'attaccatura del peduncolo o alla base dell'acino o anche in fasce che corrono lungo

l'asse maggiore della bacca (Figura 18). La maculatura interessa solo la buccia del frutto e, generalmente, solo pochi frutti per grappolo. In casi più gravi la macchiatura è però più estesa, gli acini si spaccano e si svuotano della polpa o diventano preda di insetti e di marciumi (Mugnai, 1999).



Figura 18: Caratteristica maculatura degli acini che si sviluppa più frequentemente e con maggiore evidenza in cultivar di uva da tavola. Le macchie violacee o brune possono essere sparse sull'epicarpo o riunite in fasci lungo i meridiani dell'acino.

3.3.1.3 Sintomi su tralci e legno

In presenza di accentuati sintomi fogliari, i tralci lignificano in modo irregolare, diventano bruni con un disseccamento localizzato o totale degli internodi; il sintomo può essere esteso ai tralci di tutta la pianta, oppure può rimanere circoscritto ad una parte del cordone permanente (Borgo, 2016).

Si possono notare anche i sintomi sul legno del fusto principale. Su piante adulte (oltre gli 8-10 anni dall'impianto) il sintomo più noto è la carie del legno. Il tessuto legnoso assume una consistenza spugnosa, friabile e un colore bianco giallastro (Figura 19). Di solito la zona cariata, che è spesso delimitata da una linea scura o nera, si sviluppa a partire da una ferita, in particolare da quelle dovute ai grossi tagli di potatura, e da qui si estende o lungo un settore del tronco o verso la zona centrale, sviluppandosi in questo caso intorno al midollo. In sezione trasversale, quindi, il tronco può presentare carie centrali o settoriali. Quando poi la carie si estende fino alla corteccia il tessuto cariato, ormai morto, può dar luogo alla formazione di spaccature longitudinali (mal dello spacco). La carie raramente si sviluppa oltre il punto di innesto

anche se la vite americana si è dimostrata ugualmente suscettibile alla malattia. Lo sviluppo della carie appare, nella stragrande maggioranza dei casi, chiaramente preceduto dall'instaurarsi di altre alterazioni del legno. Nel legno sano il primo sintomo che compare è la formazione di venature nere (punteggiature nere in sezione trasversale), isolate o riunite in piccoli gruppi, costituite da vasi completamente ostruiti dalla formazione di gomme bruno scure o nere (Figura 20). A questo segue e/o si accompagna la formazione di legno bruno-rosso o rosato, spesso presente al centro del tronco, lungo il midollo e, in seguito, anche al margine delle zone cariate. Insieme a queste alterazioni principali possono svilupparsi vari imbrunimenti del legno (settori bruno scuri o bruno chiari, con legno più o meno duro). Il legno, una volta cariato, perde ogni sua funzionalità; tuttavia, è sufficiente che 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 continuino a vegetare e produrre, almeno fino a quando non interviene anche la tracheomicosi o un colpo apoplettico (Mugnai, 2010).

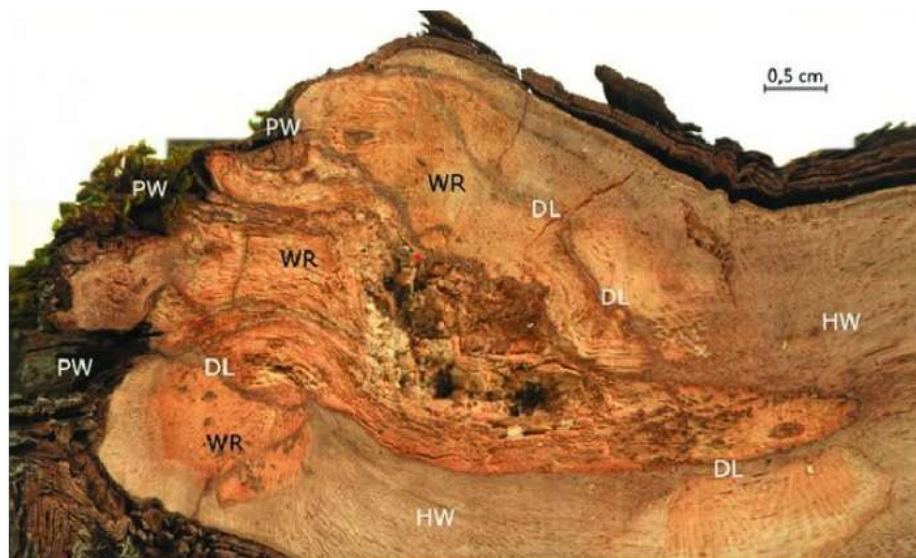


Figura 19: Osservazione macroscopica mediante stereomicroscopia (ingrandimento $\times 12$) di una sezione trasversale (1 cm di spessore) della testa di un fusto di vite con un'ampia area di marciume bianco (WR) che si diffonde dalle ferite di potatura (PW) nel legno sano (HW). Le zone necrotiche sono separate dal legno sano da linee di demarcazione (DL). Esempio raccolto nel maggio 2021 da una pianta di 'Sauvignon Blanc' di 28 anni, da un vigneto a Pfaffenweiler, nel sud-ovest della Germania (Moretti *et al.*, 2021).

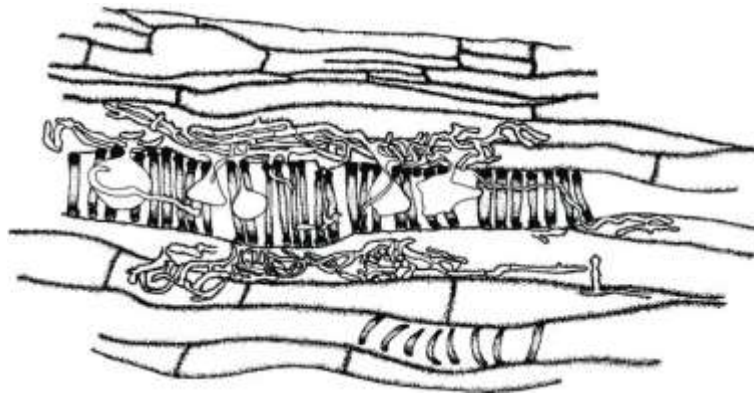


Figura 20: *Phaeomoniella chlamydospora* - micelio e tilosi nelle cellule del parenchima dello xilema e nei vasi linfatici di una pianta di Chardonnay coltivata con tessuto inoculato artificialmente (Cottral e Pascoe, 2000).

3.3.1.4 Origine dei sintomi del mal dell'esca

Le alterazioni del legno associate alla presenza dei funghi, che danno luogo ai sintomi interni, descritti in precedenza, in piante naturalmente infette o inoculate artificialmente, sono soprattutto conseguenza delle molteplici azioni patogene di questi organismi i quali, principalmente con la produzione di enzimi ossidativi e degradativi, alterano e degradano in vario modo il legno. La necrosi del legno di vite causata dagli ascomiceti è simile per certi aspetti alla decomposizione del legno causata dai basidiomiceti. L'attacco avviato dai funghi del marciume bruno produce un tipo di degradazione del legno in cui sia l'olocellulosa sia la lignina vengono depolimerizzate da un meccanismo chiamato *Chelator-Mediated Fenton* (CMF) altamente ossidativo e non enzimatico (Xu and Goodell, 2001; Arantes *et al.*, 2012; Goodell, 2020; Hess *et al.*, 2021). Il glucosio e lo xilosio delle emicellulose del legno vengono preferenzialmente degradati e impoveriti dal legno mentre la lignina viene degradata molto più lentamente (Rolshausen *et al.*, 2008). La lignina residua, sia nel legno marcio che nel legno necrotico attaccato dai funghi, è di colorazione marrone a causa della lignina residua ossidata e modificata. Il meccanismo di degradazione della lignina proposto da Perez-Gonzalez *et al.* (2022) è presentato nella Figura 21.

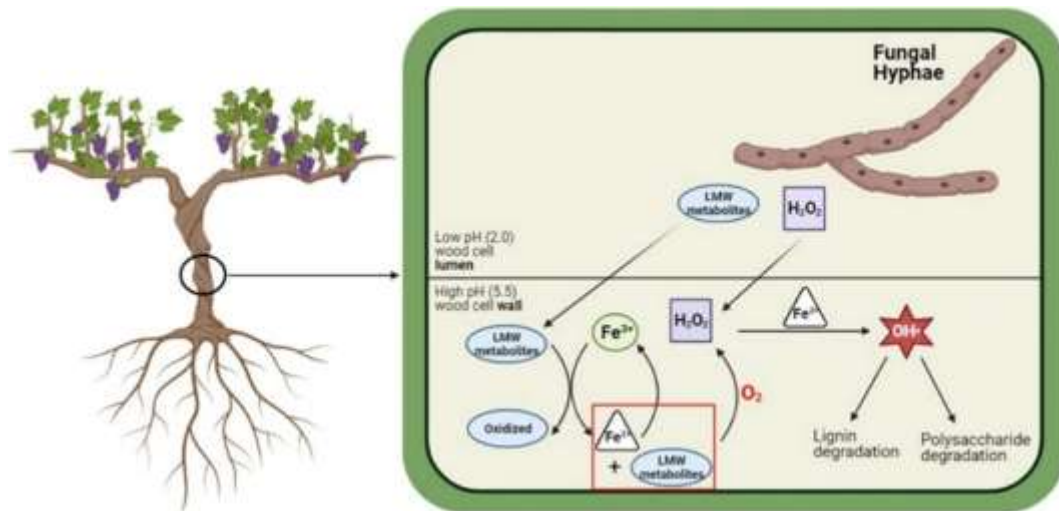


Figura 21: Meccanismo proposto per la generazione in situ di Fe^{2+} e H_2O_2 e la degradazione della lignina e delle macromolecole della parete cellulare da parte dei funghi GTD. I metaboliti a basso peso molecolare LMW e H_2O_2 , generati dai funghi GTD, si diffondono nella parete cellulare, dove i metaboliti LMW sequestrano Fe^{3+} dalla parete cellulare e riducono Fe^{3+} a Fe^{2+} . Fe^{2+} e H_2O_2 reagiscono e generano radicali idrossilici ($\text{OH}\cdot$) attraverso una sorta di reazione mediata CMF. I radicali idrossilici, a loro volta, degradano la lignina ed i polisaccaridi della parete cellulare del legno della vite (Perez-Gonzalez *et al.*, 2022).

Ci sarebbero poi da aggiungere gli esiti delle azioni di fattori esterni (ingresso di aria nello xilema, penetrazione di acqua piovana) e quelli di eventuali colonizzazioni di microrganismi non patogeni e dei processi che si svolgono nei tessuti della pianta in conseguenza ad esempio a delle ferite (ossidazione e degradazione di componenti del legno e relativo imbrunimento del tessuto, necrosi cellulari, gommosi dello xilema) e della sua riparazione (zone cicatriziali, formazione di legno anomalo o di sughero). Lo sviluppo dei sintomi fogliari è legato all'andamento meteorologico (abbondanti piogge nel periodo primaverile estivo causano una maggiore comparsa di sintomi sulle foglie), all'ostruzione del normale flusso linfatico a causa delle necrosi del legno, ai metaboliti fitotossici prodotti dagli agenti vascolari e dagli agenti di cancro, e, presumibilmente, anche ai metaboliti fitotossici prodotti durante la degradazione del legno. Tutti questi aspetti sono però ancora oggetto di studi e approfondimenti.

I sintomi fogliari invece, e la stessa apoplessia sono dovuti all'azione di sostanze fitotossiche escrete dai funghi che colonizzano i tessuti legnosi del fusto traslocate fino alla chioma con la corrente traspiratoria. Nel caso particolare dell'apoplessia, le estati molto calde e l'incostanza del clima possono determinare il verificarsi di condizioni

che causano l'insorgenza della sindrome acuta, forse connessa a un rapido aumento della concentrazione e dell'attività di metaboliti tossici nella chioma in condizioni di elevata traspirazione (Mugnai, 1999). Diversi metaboliti, appartenenti a differenti classi di composti naturali, sono stati isolati da colture di *P. chlamydospora* e *P. minimum*. In particolare, dai liquidi di accrescimento di *P. minimum* sono stati isolati: lo scitalone, l'isosclerone e la 4-idrossibenzaldeide (Evidente *et al.*, 2000, Tabacchi *et al.*, 2000), il cis-4-idrossi-scitalone, 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) (Figura 22).

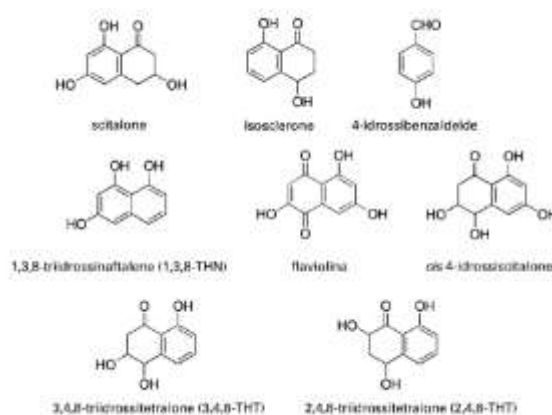


Figura 22: Struttura chimica dei metaboliti prodotti ed identificati da colonie di *Phaeoacremonium minimum* (Evidente *et al.*, 2000; Tabacchi *et al.*, 2000).

Da colture liquide di *P. chlamydospora* sono stati invece isolati, oltre a tre dei metaboliti già identificati per *P. minimum* (scitalone, isosclerone e 4-idrossibenzaldeide), il tirosolo, l'1-O-metilemodina, il 3-idrossi-5-decanolide, l'acido (S)-4-idrossifenillattico e l'acido 3-(3-metil-2-butenilossi)-4-idrossibenzoico (Tabacchi *et al.*, 2000) (Figura 23).

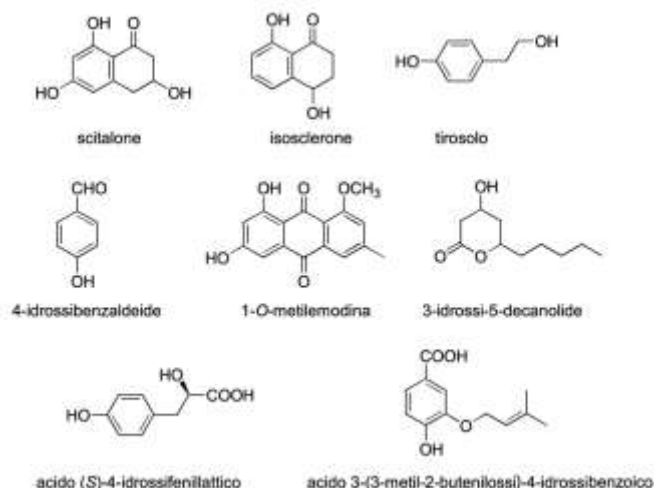


Figura 23: Struttura chimica dei metaboliti prodotti ed identificati da colonie di *Phaeomoniella chlamydospora* (Tabacchi *et al.*, 2000).

Studi preliminari su *F. mediterranea* hanno evidenziato la presenza nei suoi filtrati colturali 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) (Figura 24).

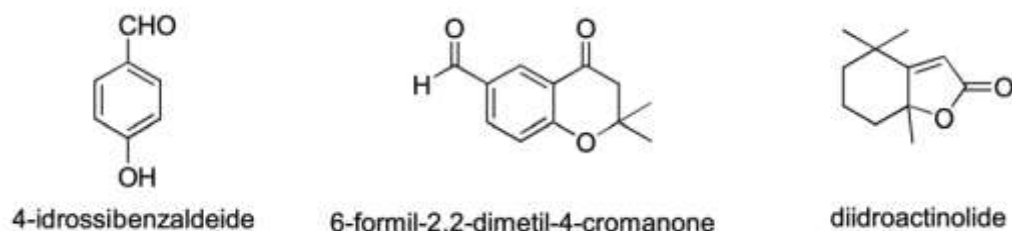


Figura 24: Struttura chimica dei metaboliti prodotti ed identificati da colonie di *Fomitiporia mediterranea* (Tabacchi *et al.*, 2000).

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 saggiato 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 necrotiche, cui si è accompagnata la distorsione della lamina fogliare (Evidente *et al.*, 2000; Sparapano *et al.*, 2000, 2001; Bruno *et al.*, 2006). Alcune osservazioni sperimentali hanno evidenziato che *P. chlamydospora* e *P. minimum*, coltivati in substrati liquidi nutritivi contenenti glucosio e alcuni fattori di crescita,

sono in grado di produrre esopolisaccaridi (EPSs) (Sparapano *et al.*, 2000). 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). 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 α (1→4) e α (1→6) glucosidici. Risultano essere pertanto molto flessibili e dotati di singolari proprietà reologiche (Leathers, 2002). Assorbiti in minime concentrazioni (20-50 $\mu\text{g/mL}$) 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 internervali inizialmente clorotiche, brune o rossicce, poi necrotiche, ricordanti le manifestazioni del mal dell'esca sulle foglie (Sparapano *et al.*, 2000; Bruno e Sparapano, 2006; Evidente *et al.*, 2010).

Le maculature brune dei frutti potrebbero essere causate dalla diffusione, attraverso le terminazioni vascolari, di enzimi capaci di ossidare o polimerizzare sostanze fenoliche dell'epicarpo o di dare origine a prodotti tossici; analogamente, necrosi cellulari potrebbero essere causate in presenza di luce da tossine fotodinamiche trasportate per la stessa via fino ai frutti.

3.3.2 Fattori che incidono sull'insorgenza della malattia

Sono diversi i fattori che potrebbero influire sull'incidenza della malattia; uno di questi è la forma di allevamento. Nelle forme con cordone permanente l'impatto finale è minore che nelle branche con forme brevi. In genere, i danni su Guyot semplice risultano sempre piuttosto gravi rispetto ad altre forme di allevamento. Tutte le pratiche agronomiche, in particolare la potatura, svolgono un ruolo importante nell'incidenza della malattia. Potature meno drastiche e ben eseguite possono limitare

la gravità dei sintomi e dei danni. Uno studio decennale effettuato in diversi vigneti in Francia ha confermato che i sintomi fogliari rivelano la presenza della malattia, ma non possono essere considerati un indicatore affidabile dell'impatto della malattia in tutte le situazioni. Questo studio ha anche confermato: i) che le forme di allevamento e potatura della vite possono influenzare notevolmente la gravità del mal dell'esca, ii) che l'aumento della lunghezza dei cordoni può ridurre al minimo le conseguenze delle necrosi del legno e iii) che le semplificazioni della struttura legnosa della vite (derivante dall'adozione di moderne forme di allevamento) possono favorire lo sviluppo del mal dell'esca (Lecomte *et al.*, 2018).

È noto che quando le piante sono esposte a diversi stress ambientali, viene sollecitata l'espressione di più geni che codificano per la produzione di enzimi e ormoni con molteplici funzioni biologiche. Pertanto, la tossicità derivante dall'azione degli agenti patogeni, la risposta di difesa dell'ospite e le condizioni ambientali compongono il triangolo della malattia (Fischer e Peighami-Ashnaei, 2019) (Figura 25). Le estati fresche e piovose sono favorevoli all'insorgenza dei sintomi sulle foglie, probabilmente a causa dell'aumento dei processi fisiologici nelle piante, forse in seguito al movimento delle tossine fungine verso le foglie (Di Marco e Osti, 2009; Surico *et al.*, 2000, 2009, 2010). Anche le elevate temperature, soprattutto nel mese di luglio (nell'emisfero settentrionale), svolgono un ruolo importante nell'espressione dei sintomi del mal dell'esca (Calzarano *et al.*, 2018). I colpi apoplettici, invece, sono generalmente più frequenti in vigneti che soffrono lo stress idrico (in periodi caratterizzati da alte temperature e scarse precipitazioni), successivamente ad eventi piovosi che riattivano il flusso xilematico e di conseguenza facilitano il trasporto delle tossine. Tuttavia, è difficile fare una correlazione tra l'andamento meteorologico e la manifestazione dei sintomi come dimostrato nello studio pluriennale di Calzarano *et al.* (2018).

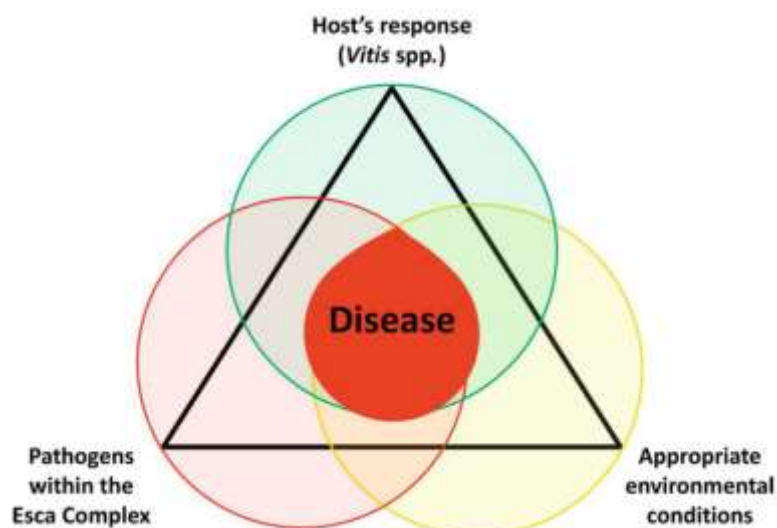


Figura 25: Rappresentazione del triangolo della malattia (combinazione dei diversi fattori che causano il mal dell'esca: patogeni, risposta della vite, condizioni ambientali favorevoli allo sviluppo dei funghi patogeni) (Fischer e Peighami-Ashnaei, 2019).

Ancor più problematica è l'interpretazione dell'incostanza della comparsa dei sintomi sulla chioma in anni successivi. Da un'indagine condotta per quattro anni consecutivi, dal 1992 al 1995, su un campione di filari di un vigneto (circa 2.000 viti) di Sangiovese, in provincia di Firenze, è stato accertato che solo il 3% delle piante ammalate ha presentato sintomi fogliari in tutti e quattro gli anni, l'11,5% in tre anni su due, il 23% in due anni su quattro e il 53% in un solo anno. Risultati analoghi sono emersi da un rilievo che si è protratto dal 1995 al 1998 in vigneti della provincia di Siena. È quindi evidente che fattori per lo più estrinseci (quantità di acqua disponibile nel terreno e/o la temperatura nei mesi estivi), e difficili da realizzarsi tutti contemporaneamente, influiscono sia sulla comparsa che sull'intensità della malattia. Dati analoghi sono stati registrati su Verdicchio nelle Marche, dove la malattia si è manifestata per tre anni consecutivi su circa un terzo delle piante, due anni su tre su un secondo terzo e un anno su tre nel terzo restante (Romanazzi *et al.*, 2009). Ne deriva anche che l'incidenza e l'intensità della malattia per poter essere valutate correttamente dovrebbero comprendere osservazioni condotte per almeno tre-quattro anni consecutivi. In effetti, sondaggi effettuati sul legno del tronco in occasione dell'estirpazione di vigneti hanno dimostrato che la percentuale di viti con legno cariato era molto più alta di quanto i sintomi fogliari avevano consentito di valutare prima dell'estirpazione (Mugnai, 1999).

3.4 IL CONTROLLO DEL MAL DELL'ESCA

In passato, l'unico metodo usato per contrastare la malattia consisteva nell'incisione ed eliminazione meccanica del legno cariato (dendrochirurgia) con l'intento di risanare le piante colpite o, almeno, di rallentare il decorso (www.ersa.fvg). A partire dagli anni '20 fino agli anni 2000, si riusciva a combattere i funghi responsabili del mal dell'esca grazie ai prodotti a base di arsenito di sodio, che venivano ampiamente utilizzati come insetticidi sulla vite e che poi sono risultati altamente tossici per la salute umana e per l'ambiente e, di conseguenza vietati. Attualmente, la strategia migliore per il controllo del mal dell'esca è la prevenzione in vivaio ed in campo.

3.4.1 Prevenzione in vivaio ed in campo

La protezione della vite dal mal dell'esca è tutt'ora basata esclusivamente sull'adozione di opportune misure di tipo preventivo. Per gestire al meglio la malattia è importante, come prima cosa, applicare la prevenzione partendo dalle barbatelle in vivaio che sono soggette agli attacchi dei funghi lignicoli a causa dei tagli che vengono effettuati per prelevare il materiale di propagazione per l'innesto. Pertanto, è fondamentale disinfettare tutte le attrezzature usate in vivaio ed il materiale di propagazione. Le malattie del tronco della vite possono infettare le piante in vivaio durante il processo di innesto, in particolare durante l'idratazione (Di Marco *et al.*, 2019). Un prodotto disinfettante che ha registrato buoni risultati in vivaio è l'acqua acida o l'acqua elettrolizzata (EAW). Le infezioni dovute ai funghi *P. chlamydospora* e *P. minimum* vengono ridotte in quanto EAW ha effetto sui conidi ed è in grado di controllare l'infezione fungina sistemica dovuta all'idratazione lungo il tronco (Di Marco *et al.*, 2019). Anche l'applicazione dei funghi del genere *Trichoderma* (*Trichoderma harzianum* T39 e *Trichoderma longibrachiatum* ceppo 6) in vivaio su talee di viti e sulle ferite da potature ha fornito un ottimo risultato nel controllo dei funghi patogeni del legno (Di Marco *et al.*, 2004). Inoltre, il trattamento con acqua calda a 50°C (HWT) viene utilizzato nei vivai per controllare i funghi patogeni coinvolti nelle malattie del tronco della vite, così come altri agenti patogeni, come i fitoplasmi (Bruez *et al.*, 2017).

È molto importante che i nuovi impianti siano fatti con materiale sano, esente da patogeni come i funghi del mal dell'esca, in quanto, una volta insediatisi è in grado di

manifestarsi non solo in piante adulte (> 11 anni) ma anche in piante giovani (<7 anni) (Romanazzi *et al.*, 2009).

In vigneti in cui è presente il mal dell'esca, per cercare di limitarne la diffusione, è opportuno decontaminare gli attrezzi di potatura (ad esempio con ipoclorito di sodio o cloruro di benzalconio). In tali vigneti, inoltre, potrebbe essere utile contrassegnare in agosto-settembre le piante che manifestano sintomi, in modo da poterle riconoscere durante l'inverno e potarle separatamente dalle viti sane. Durante la potatura, è anche opportuno evitare di causare grosse ferite, difficilmente rimarginabili e, comunque, proteggerle con mastici addizionati di fungicidi ad ampio spettro di azione (Romanazzi *et al.*, 2016).

3.4.2 Prodotti di sintesi

Attualmente non sono disponibili mezzi tecnici diretti, quali fungicidi, efficaci nei confronti della malattia. Dal 2000 al 2018 sono stati studiati più di 90 principi attivi contro il mal dell'esca, il cancro delle branche e l'eutipiosi. La maggior parte dei principi attivi testati sono composti organici sintetici che vengono utilizzati singolarmente o in miscele. I gruppi chimici più comunemente testati includono benzimidazoli, triazoli e strobilurine. Tra i benzimidazoli, il benomil, carbendazim e tiofanatometile, sono risultati i più efficaci, sia in laboratorio che in campo, nella protezione delle ferite di potatura. La loro efficacia contro le principali malattie del tronco era principalmente attribuibile alla loro azione fungicida ad ampio spettro, alla persistenza e all'attività sistemica. Fatta eccezione per *E. lata*, hanno dimostrato durante i test in vitro un'elevata capacità di ridurre, sia la crescita ifale, che la germinazione dei conidi degli altri funghi sopraccitati. I benzimidazoli sono utilizzati per proteggere le ferite da potatura, principalmente come trattamenti preventivi e, in misura limitata, come trattamenti curativi. Nei vivai, i benzimidazoli hanno ridotto efficacemente la presenza degli agenti tracheomicotici del mal dell'esca. Uno svantaggio dei benzimidazoli è che i funghi possono acquisire resistenza, come dimostrato dalla resistenza acquisita dal fungo *P. minimum* al carbendazim (Martín *et al.*, 2013). I triazoli, invece, sono il gruppo più comune tra le sostanze chimiche di sintesi utilizzato per prevenire diverse malattie nelle viti (oidio, marciume dei grappoli, botrite, ecc.). I test in vitro hanno dimostrato che sono molto efficaci nell'inibire la

germinazione dei conidi e nel ridurre la crescita miceliale degli agenti causali delle malattie del tronco della vite (Gramaje *et al.*, 2009). Alcuni di questi effetti positivi in vitro sono stati verificati anche sulle piante in campo. Anche le strobilurine vengono utilizzate per il controllo della peronospora e l'oidio nei vigneti. Sono stati effettuati degli studi per provare la loro efficacia sugli agenti causali del mal dell'esca. Sia negli studi in vitro che in campo sulla protezione delle ferite, il piraclostrobin ha dimostrato di essere il più efficace contro i patogeni del mal dell'esca (Kenfaoui *et al.*, 2022). Di recente è stato registrato un prodotto commerciale a base di una miscela di boscalid e pyraclostrobin (Tessor, BASF) da applicare sulle ferite di potatura.

3.4.3 Prodotti naturali

Dato che attualmente sono pochi i prodotti registrati per combattere i funghi responsabili del mal dell'esca e che i fungicidi di sintesi studiati possono indurre resistenza, è stata intrapresa una nuova strada, quella più sostenibile da un punto di vista ambientale. Le preoccupazioni legate all'uso massiccio di prodotti chimici e l'attenzione verso modelli produttivi rispettosi dell'ambiente hanno dato impulso allo studio dei principi attivi naturali in viticoltura. Di conseguenza, diversi composti naturali sono stati valutati per gestire le malattie del tronco. Ad oggi sono state studiate 14 sostanze naturali, organiche o inorganiche, che vanno da molecole semplici come il perossido di idrogeno (Fourie e Halleen 2006; Sosnowski *et al.*, 2013) a miscele complesse come la propoli (Cobos *et al.*, 2015). In commercio esistono alcuni prodotti registrati, tutti basati su un preparato microbiologico contenente funghi del genere *Trichoderma* (*T. asperellum* e *T. gamsii*) che in alcuni lavori sperimentali hanno dimostrato una buona attività di contenimento della malattia (Reggiori *et al.*, 2014), specialmente se applicato in impianti giovani o con bassa diffusione della malattia.

Uno studio effettuato da Lambert *et al.* (2012) sull'effetto dei composti fenolici sul cancro delle branche ha dimostrato che l'applicazione del resveratrolo ha un effetto antifungino diretto inibendo la crescita *in vitro* di *E. lata*, *Stereum hirsutum* e *F. mediterranea*. I polifenoli stilbenici (composti prodotti dalle piante in risposta alle infezioni fungine) sono anche in grado di eliminare le specie reattive dell'ossigeno (ROS) e quindi proteggere le cellule vegetali dallo stress ossidativo dopo l'attacco dei patogeni. Tuttavia, solo alcuni stilbeni specifici come il *trans*-pterostilbene o

isohopcapphenol sono efficaci contro molti agenti patogeni del deperimento *E. lata*, *F. mediterranea*, *P. chlamydospora*.

Bisogna considerare che le viti, come tutte le altre piante, possiedono dei meccanismi di difesa, attivi e passivi, contro gli attacchi fungini. Una volta che il sistema di difesa passivo (barriere naturali precostituite) è stato superato da parte del fungo, viene attivato il sistema di difesa attivo che riguarda tutti i meccanismi metabolici in grado di contrastare l'infezione, quali: il sistema ossidante, la sintesi dei fenilpropanoidi, le proteine legate alla patogenesi (PR) e la sintesi delle fitoalessine (sostanze fungitossiche). Le proteine PR sono un gruppo di proteine non correlate tra loro facenti parte del sistema difensivo della pianta. Si accumulano sia nei tessuti non infetti, sia nei tessuti danneggiati e quelli adiacenti. Inoltre, concorrono nella risposta ipersensibile (HR) e nella resistenza acquisita sistemica (SAR) alle infezioni. Durante le interazioni tra ospite e patogeno, le risposte difensive della pianta limitano il danno causato dal patogeno. Le chitinasi e le 1,3-glucanasi sono due enzimi idrolitici essenziali, facenti parte delle proteine PR, che si accumulano in diverse specie vegetali in seguito all'attacco da parte di vari agenti patogeni. Le chitinasi, ad esempio, sono ampiamente diffuse nei regni delle piante, degli animali, dei funghi e dei batteri. Questi enzimi idrolitici scindono il legame glucosidico C1-C4 tra le unità di N-acetil-D-glucosamina della chitina, che si trova nelle pareti cellulari dei funghi e nei gusci degli artropodi. Le chitinasi vegetali sono solitamente endochitinasi che possono degradare la chitina e sopprimere la crescita dei funghi patogeni. Anche le glucanasi vegetali idrolizzano i legami 1,3-glucosidici nel 1,3-glucano, un altro componente strutturale delle pareti cellulari di molti funghi patogeni. Ad esempio, Camps *et al.* (2010) hanno scoperto una sovraregolazione di diversi geni che codificano per proteine PR (taumatina e osmotina, chitinasi e 1,3-glucanasi) nelle foglie di talee radicate (Carbernet Sauvignon) infettate artificialmente con *E. lata*.

Il chitosano, la forma deacetilata della chitina, è un composto naturale derivato dai gusci dei crostacei. Martín *et al.* (2023) hanno studiato in vitro gli effetti di una formulazione commerciale di chitosano cloridrato (MW 47–65 KDa) approvata (dal 2014) come sostanza di base, sulla crescita ifale dei patogeni del mal dell'esca (*P. chlamydospora* e *P. minimum*). È stato determinato che, la concentrazione di 0,5% (v/v) di chitosano inibisce totalmente la crescita di *P. minimum* e la concentrazione del

2,5% (v/v), ovvero 0,625 mg/mL, di chitosano inibisce totalmente la crescita di *P. chlamydospora*. Questo studio ha dimostrato il potenziale del chitosano nel controllare i patogeni dell'esca; oltre alla sua attività antifungina diretta, induce una serie di reazioni di difesa nella pianta. Grazie alla sua capacità di formare un film semipermeabile in superficie, potrebbe essere utilizzato dopo le potature per coprire le ferite. Sono necessari ulteriori studi per determinare l'efficacia del chitosano sul mal dell'esca in campo.

Estratti di *Allium sativum* sono stati testati contro i patogeni delle malattie del tronco, dando buoni risultati sia in vitro che in campo nella protezione delle ferite (Sosonowski *et al.*, 2013; Cobos *et al.*, 2015). Se combinato con chitosano e vanillina, è risultato più efficace nel ridurre le infezioni di *Diplodia seriata* e *P. chlamydospora* inoculate artificialmente su ferite di potatura trattate (Cobos *et al.*, 2015). Inoltre, il minor tasso di mortalità delle viti e le basse percentuali di reisolamento dei patogeni, registrati durante le prove in campo, potrebbero essere correlati ad un presunto sinergismo tra i diversi meccanismi d'azione dei tre composti.

Sono stati fatti numerosi studi su una miscela di nutrienti ed estratto di alghe marine che riduce significativamente l'incidenza della tigratura fogliare nelle viti infette (Calzarano *et al.*, 2014; Calzarano e Di Marco, 2018; Calzarano *et al.*, 2021). Questa miscela brevettata, a base di CaCl_2 , $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ ed estratto di alghe Fucales, è stata sviluppata in seguito all'osservazione di un elevato contenuto di calcio nelle foglie di vite malate ma asintomatiche rispetto al contenuto di calcio nelle piante sintomatiche e non sintomatiche (Calzarano *et al.*, 2009). Alla miscela è stato aggiunto magnesio per evitare possibili squilibri in seguito ad applicazioni di calcio, mentre l'estratto di alghe agisce come trasportatore di calcio e magnesio, migliorandone così l'attività sulla riduzione dei sintomi della tigratura fogliare, confermato dall'aumento delle druse nelle cellule fogliari delle piante trattate (Calzarano *et al.*, 2014).

Dal 2000 ad oggi, più di 40 agenti di controllo biologico sono stati testati contro i patogeni del complesso dell'esca, del cancro delle branche e dell'eutipiosi. Tra questi troviamo i funghi: *Aureobasidium* spp., *Epicoccup* spp., *Fusarium* spp., *Pythium* spp., *Trichoderma* spp.; i batteri: *Acinetobacter radioresistens*, *Bacillus* spp., *Brevicacillus* spp., *Burkholderia phytofirmans*, ecc. Tra i batteri, *Bacillus subtilis* è stato il più testato nei confronti delle GTD. La sua accertata efficacia in vitro contro i patogeni GTD è

stata confermata anche sulle ferite in vivo (Halleen *et al.*, 2010; Kotze *et al.*, 2011; Schmidt *et al.*, 2011). Inoltre, l'uso di *Bacillus subtilis* ha ridotto la presenza dei patogeni vascolari del complesso dell'esca in vivaio, ma la gravità dei sintomi è aumentata (Fourie e Halleen, 2004a). Per quanto riguarda i funghi, la maggior parte degli studi sono stati condotti su *Trichoderma* spp. (Di Marco e Osti, 2007; Di Marco *et al.*, 2004; Fourie e Halleen, 2004a, 2006; Fourie *et al.*, 2001; Pertot *et al.*, 2016). Le diverse specie e ceppi di *Trichoderma* presenti nei prodotti in commercio apportano effettivamente una netta riduzione dei sintomi di tigratura fogliare, oltre ad essere attualmente l'unica soluzione valida per la riduzione del complesso dell'esca in campo (Mounier *et al.*, 2016). Anche l'applicazione del fungo oomicete *Pythium oligandrum* ha registrato risultati soddisfacenti grazie al potenziamento della difesa delle viti contro i patogeni del mal dell'esca e ha dimostrato una significativa persistenza nell'apparato radicale (Mondello *et al.*, 2018). *P. oligandrum*, secondo Yacoub *et al.* (2016), induce uno stato fisiologico noto come *priming*, che consente alla pianta di dispiegare i suoi meccanismi di difesa in modo più vigoroso in seguito all'infezione da parte dei patogeni del complesso dell'esca.

Tutte queste ricerche mostrano inequivocabilmente che ad oggi esistono numerose soluzioni potenziali, anche se nessuna di queste può ancora essere considerata uno strumento valido da aggiungere facilmente alle attuali strategie di gestione delle malattie dell'esca.

4. OBIETTIVI DELLA RICERCA

L'alta incidenza del mal dell'esca in tutto il mondo, e soprattutto in Italia, crea gravi perdite economiche agli agricoltori che, in tanti casi, sono costretti a piantare nuovi vigneti oppure a cambiare coltura. A causa della mancanza di soluzioni efficaci, è necessario studiare nuove strategie di gestione in grado di abbassare l'incidenza del mal dell'esca per ridurre i danni economici e favorire una viticoltura economicamente sostenibile e a basso impatto ambientale. La complessità di tutte le malattie sopradescritte rende difficoltosa la protezione dai rispettivi agenti causali, in particolare dai funghi patogeni del complesso dell'esca. L'obiettivo di questa ricerca è stato quello di valutare l'efficacia di strategie innovative basate sull'impiego di consorzi di microrganismi utili (funghi, lieviti e batteri), enzimi e catalizzatori minerali sull'espressione dei sintomi di mal dell'esca. I prodotti, oggetto di indagine, sono stati saggiati a livello aziendale in due campi distinti secondo un programma di intervento fornito dall'azienda produttrice B.E.A. (Biotecnologie per l'Ecologia e l'Agricoltura) Srl. Il protocollo fornito è stato ideato in base alle diverse ricerche scientifiche effettuate negli ultimi anni sull'applicazione di consorzi di microrganismi nel contrasto ai funghi patogeni del mal dell'esca ed in base alle conoscenze acquisite sull'interazione di questi funghi con le piante. Attraverso l'impiego di questi prodotti, si è cercato di contenere l'espressione dei sintomi di mal dell'esca attraverso l'esclusione competitiva nei confronti degli agenti causali della malattia.

5. MATERIALI E METODI

5.1 Localizzazione dei vigneti oggetto di indagine

Sono stati selezionati due vigneti commerciali ben noti per l'alta incidenza della malattia grazie a degli studi già effettuati in precedenza sul mal dell'esca. Entrambi sono ubicati nella Regione Marche in provincia di Ancona. Ai due vigneti presi in considerazione è stato attribuito un codice di riferimento, che richiama la località in cui questi sono ubicati (Figura 26). Inoltre, sono state analizzate le condizioni meteorologiche, secondo i dati meteo forniti dall'Agenzia per l'Innovazione nel Settore Agroalimentare e della Pesca "Marche Agricoltura Pesca" (AMAP), così da rapportare il livello di infezione in base all'andamento meteorologico. I dati climatici sono stati raccolti attraverso il Bollettino Agrometeorologico che elabora settimanalmente il Servizio Agrometeo Regionale dell'AMAP. Sono stati raccolti i dati di temperatura, umidità, e precipitazioni dalle stazioni meteorologiche di Castelplanio (AN) e di Osimo (AN), le più vicine ai due campi sperimentali.

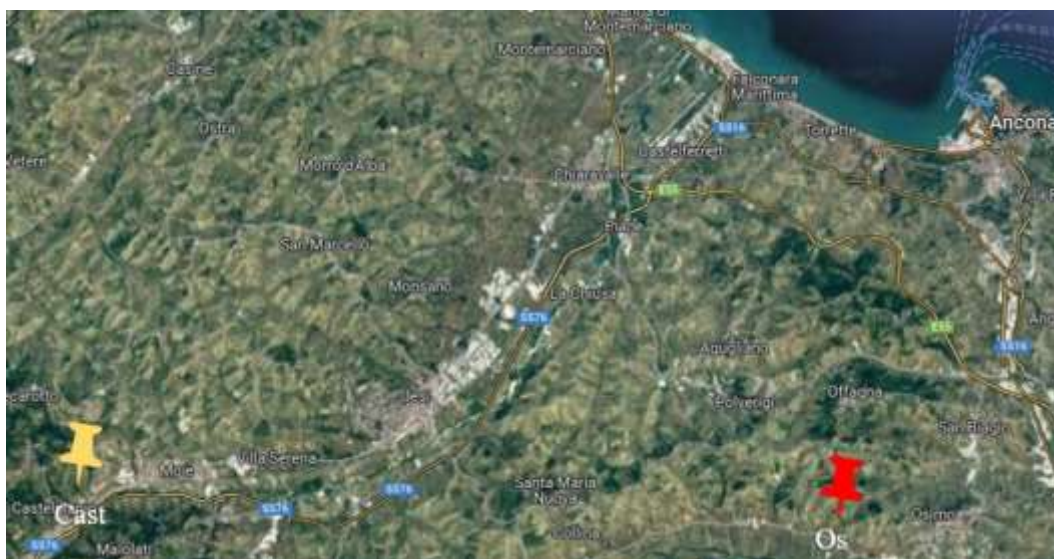


Figura 26: Localizzazione geografica dei vigneti oggetto della presente ricerca. Os (vigneto sperimentale situato a Osimo) e Cast (vigneto sperimentale situato a Castelplanio).

Di seguito sono state riportate in Tabella 2, per ciascun vigneto, le principali caratteristiche stazionali (ubicazione del vigneto, provincia, proprietà, superficie vigneto indagata, latitudine, longitudine, altitudine, cultivar, portainnesto, sesto di impianto, sistema di allevamento).

Tabella 2: Principali caratteristiche dei vigneti in cui è stata studiata l'efficacia dei prodotti sul mal dell'esca.

Caratteristiche del sito	Vigneti	
	Os	Cast
Posizione	Osimo (AN)	Castelplanio (AN)
Proprietà	Moncaro Terre Cortesi	Moncaro Terre Cortesi
Area dei vigneti (ha)	0,7	1,4
Latitudine	43°29'0.81"N	43°30'13.4"N
Longitudine	13°26'12.83"E	13°05'43.4"E
Altitudine (m s.l.m.)	44	334
Cultivar	Chardonnay	Verdicchio
Portainnesto	Kober 5BB	Kober 5BB
Sesto d'impianto (m)	2,5 x 1,5	2,5 x 1,5
Sistema di allevamento	Controspalliera	Controspalliera

- **Vigneto di Osimo**

Il vigneto di proprietà dell'Azienda Vitivinicola "Moncaro Terre Cortesi" è sito nel Comune di Osimo, in via Gaiano (fraz. Casenuove) in provincia di Ancona (43°29'81"N – 13°26'12,83"E) a circa 44 m s.l.m. Il vigneto (Figura 26) è stato impiantato nel 2002 su una superficie di 0,7 ettari. La varietà coltivata è Chardonnay su portainnesto Kober 5BB (*Vitis berlandieri* × *V. riparia*). Il sesto d'impianto è di 2,5 m tra le file e 1,5 m sulla fila ed il sistema di allevamento utilizzato è a controspalliera (Figura 27).



Figura 26: Aerofotogrammetria del vigneto di Osimo (Via Gaiano, frazione Casenuove, Azienda Agricola Moncaro “Terre Cortesi”) nel riquadro la superficie considerata per la prova sperimentale, foto aerea ottenuta tramite Google Earth.



Figura 27: Vigneto di Osimo: sistema di allevamento a controspalliera con un sesto d’impianto di 2,5 m x 1,5 m.

- **Vigneto di Castelplanio**

Il vigneto di proprietà dell’Azienda Vitivinicola “Moncaro Terre Cortesi” è sito nel comune di Castelplanio, in Via Piagge in Provincia di Ancona (43°50’30’’N - 13°09’50,3’’E) a circa 334 m s.l.m. Il vigneto (Figura 28) è stato impiantato nel 2004 su una superficie di circa 1,4 ettari. La varietà coltivata è Verdicchio su portinnesto Kober 5BB (*Vitis berlandieri* × *V. riparia*). Il sesto d’impianto è di 2,5 m tra le file e 1,5 m sulla fila ed il sistema di allevamento utilizzato è a controspalliera (Figura 29).



Figura 28: Aerofotogrammetria del vigneto di Castelplanio (Via Piagge, Azienda Agricola Moncaro “Terre Cortesi”); nel riquadro la superficie considerata per la prova sperimentale, foto aerea ottenuta tramite Google Earth.



Figura 29: Vigneto di Castelplanio: sistema di allevamento a controspalliera con un sesto d’impianto di 2,5 m x 1,5 m.

5.2 Strategie saggiate e schema sperimentale

Durante l’anno colturale 2023 è stata testata in campo l’efficacia di prodotti a base microbiologica, forniti dall’azienda B.E.A. Srl, sull’espressione dei sintomi del mal dell’esca. I prodotti, di origine naturale, che sono stati utilizzati sono riportati nella tabella sottostante. Inoltre, sono stati effettuati dei trattamenti al terreno con zolfo 80% (Microthiol disperss, UPL Italia) e urea (YaraVera, YARA). I prodotti sono stati utilizzati a dosi differenti ad ogni trattamento.

Tabella 3: Prodotti saggiati nella prova sperimentale e relativa composizione.

Nome commerciale	Composizione
Ergofert Start Plus Bio	Azoto organico 1%, carbonio organico di origine biologica 18%, sostanza organica con peso molecolare nominale <50 KDa minimo 30%, batteri della rizosfera, funghi saprofiti e simbionti, catalizzatori minerali, estratto di lievito, carbone attivo, enzimi estratti da brodi di fermentazione, acidi umici ed acidi fulvici.
Ergofert Cu/Zn	Azoto totale 8%, azoto organico 1%, azoto ureico 7%, zinco solubile in acqua 0,95%, rame solubile in acqua 0,8%, ferro totale 0,5%, ferro chelato con EDTA 0,4% (stabile nell'intervallo di pH 2-6,5), ferro chelato con EDDHSA 0,1% (stabile nell'intervallo di pH 4-9), carbonio organico di origine biologica 5%, batteri, funghi, estratto di lievito ed emoglobina solubile, carbone attivo, enzimi estratti da brodi di fermentazione (cellulasi, proteasi, amilasi, lipasi), betaina, zuccheri, acidi policarbossilici.
Ergofert Nemacontrol	Carbonio organico di origine biologica 10%, sostanza organica con peso molecolare nominale <50 kDa 30%, azoto tot. 1%, azoto organico 1%, ferro totale 0,3%, ferro chelato con EDTA P 0,2%, ferro chelato con EDDHSA 0,09% (stabile nell'intervallo di pH 4-9), batteri, funghi, estratto di lievito, carbone attivo e aggiunta di enzimi estratti da brodi di fermentazione (cellulasi, proteasi, amilasi, lipasi), betaina, zuccheri, acidi policarbossilici.
Ergofert Calcio/Magnesio	Azoto totale 9%, azoto organico 1%, azoto nitrico 8,5%, ossido di calcio solubile in acqua 9%, ossido di magnesio solubile in acqua 4,5%, carbonio organico di origine biologica 3%, batteri, funghi, estratto di lievito, carbone attivo e aggiunta di enzimi estratti da brodi di fermentazione (cellulasi, proteasi, amilasi, lipasi), betaina, zuccheri acidi, acidi policarbossilici.
Ergofert Shark	Azoto organico 1%, carbonio organico di origine biologica 10%, fitormoni di origine naturale derivati da <i>Ecklonia maxima</i> e <i>Ascophillum nodosum</i> , sostanza organica con peso molecolare nominale <50 kDa 30%, proteine di origine vegetale, acidi umici ed acidi fulvici, aminoacidi essenziali e non essenziali, sali minerali (Mo, B, Cu, Zn, Mn, Mg, K), enzimi estratti da brodi di fermentazione (cellulasi, proteasi, amilasi, lipasi) e catalizzatori minerali.
Ergofert Boro	Azoto totale 8%, azoto organico 1%, azoto ureico 7%, boro 2%, ferro chelato con EDDHSA 0,09% (stabile nell'intervallo di pH 4 - 9), ferro 0,28%, molibdeno 0,20%, carbonio organico di origine biologica 8%, batteri, funghi, estratto di lievito, emoglobina solubile, carbone attivo, enzimi estratti da brodi di fermentazione (cellulasi, proteasi, amilasi, lipasi), betaina, zuccheri acidi, acidi policarbossilici.
Ergofert Stim Plus	Azoto organico 1%, carbonio organico di origine biologica 15%, sostanza organica con peso molecolare nominale <50 KDa minimo 30%, batteri, funghi, estratto di lievito, Alghe, enzimi, aminoacidi, acidi umici, acidi fulvici, estratti di origine vegetale provenienti dall'industria agroalimentare, enzimi estratti da brodi di fermentazione (cellulasi, proteasi, amilasi, lipasi), betaina, zuccheri, acidi policarbossilici.
Ergofert Glucogenesi	Azoto totale 3%, azoto organico 1%, azoto ureico 2%, fosforo 4%, potassio 6%, ferro totale 0,29%, ferro chelato con EDTA 0,2% (stabile nell'intervallo di pH 4-7,5), ferro chelato con EDDHSA 0,09% (stabile nell'intervallo di pH 2 - 6,5), carbonio organico di origine biologica 5 %, batteri, funghi, estratto di lievito, emoglobina solubile, carbone attivo, enzimi estratti da brodi di fermentazione (cellulasi, proteasi, amilasi, lipasi), betaina, zuccheri, acidi policarbossilici.

Ogni prodotto contiene consorzi di microrganismi utili alle piante ed antagonisti a quelli patogeni. Tra questi troviamo funghi come: *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma lignorum*, *Clonostachys rosea f. rosea*, *Aureobasidium pullulans*, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Lecanicillium lecanii*, *Pochonia chlamydosporia*, *Arthrobotrys oligospora*, *Glomus intraradices*. Inoltre, ci sono anche diversi batteri come: *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Streptomyces griseus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Streptomyces lydicus*, *Streptomyces avermitilis*, *Cytobacillus firmus*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Bacillus megaterium*, *Azotobacter vinelandii*, *Azotobacter chroococcum*, *Azospirillum brasilense*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Frankia* spp. Lo zolfo colloidale è stato utilizzato con lo scopo di abbassare leggermente il pH del suolo che risulta in entrambi i casi tendenzialmente alcalino. Il terreno di Osimo presenta in origine un $\text{pH} = 8,24 \pm 0,04$ mentre il terreno di Castelplanio presenta in origine un $\text{pH} = 8,78 \pm 0,02$.

L'urea è stata somministrata con lo scopo di fornire azoto ai microrganismi per permettere loro di utilizzare il carbonio organico dalle diverse fonti (essudati radicali, residui vegetali) con lo scopo di trarre energia e per moltiplicarsi. Il rapporto carbonio-azoto (rapporto C/N) è di primaria importanza in quanto ha un impatto diretto sulla decomposizione della sostanza organica e sul ciclo dell'azoto nel terreno. Il valore del rapporto C/N che i microrganismi decompositori necessitano per sostenere le loro funzioni metaboliche e svolgere un'ottimale decomposizione della sostanza organica nel terreno è di 24:1. Su 24 unità di carbonio consumato dal microrganismo, circa 16 saranno utilizzate a scopo energetico e 8 verranno immagazzinate per mantenere la propria struttura cellulare.

Nel vigneto di Osimo, la strategia è stata applicata su sedici filari, equivalenti ad una superficie di 4000 m², mentre undici filari, equivalenti a 3000 m², sono stati segnati come testimone non trattato (Figura 30). Il campo è stato suddiviso secondo un disegno sperimentale a blocchi randomizzati con due ripetizioni.



Figura 30: Suddivisione del campo sperimentale di Osimo in sedici filari trattati (azzurro) e undici filari non trattati (bianco).

Nel vigneto di Castelplanio, la strategia è stata applicata su trentuno filari equivalenti ad una superficie di 8000 m², mentre sedici filari, equivalenti a 6000 m², sono stati segnati come testimone non trattato (Figura 31). Anche in questo caso è stato adottato un disegno sperimentale a blocchi randomizzati con due ripetizioni.

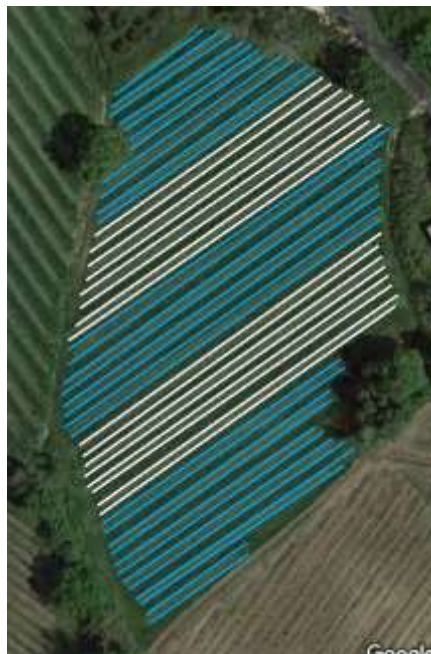


Figura 31: Suddivisione del campo sperimentale di Castelplanio in trentuno filari trattati (azzurro) e sedici filari non trattati (bianco).

Dopo l'impostazione dello schema sperimentale, le singole parcelle sono state delimitate con dei nastri adesivi colorati, in modo da agevolare gli operatori durante l'esecuzione dei trattamenti. Inoltre, ad ogni trattamento sono stati effettuati dei monitoraggi sulla vegetazione per la determinazione delle fasi fenologiche e l'individuazione dei primi sintomi di malattia.

5.3 Trattamenti

Nel vigneto di Osimo, i trattamenti sono stati eseguiti nel periodo compreso dal 30 marzo al 3 agosto secondo un calendario di interventi fornito dall'azienda B.E.A. Srl. In totale sono stati eseguiti tre trattamenti a livello radicale (Tabella 4) e dieci trattamenti a livello fogliare (Tabella 5) con un atomizzatore portato ad aspirazione anteriore dell'azienda Rosati (Figura 32) e trainato da un trattore Claas, lavorando ad una velocità costante di 4 km/h e con pressioni regolate in base alla fase fenologica del germoglio. Tutti i trattamenti sono stati effettuati con un volume d'irrorazione di 300 L/4000 m², ovvero circa 750 L/ha. Gli ugelli venivano regolati in base al tipo di trattamento, fogliare o radicale.



Figura 32: Preparazione della miscela per i trattamenti nel vigneto di Osimo con l'atomizzatore trainato Rosati.

Tabella 4: Prodotti, dosi e tempistiche di intervento per i trattamenti radicali applicati nel vigneto di Osimo.

Nr.	Nome prodotto	Dose saggiata (Kg/ 4000m²)	Data trattamento e fase fenologica (scala BBCH, Lorenz <i>et al.</i>, 1994)
1	Ergofert Start Plus Bio	50	30 marzo 2023, BBCH 08 (Rottura delle gemme: le punte verdi dei germogli sono chiaramente visibili)
	Zolfo colloidale in polvere	45	
	Urea	10	
2	Ergofert Start Plus Bio	10	22 maggio 2023, BBCH 57 (Le infiorescenze sono pienamente sviluppate e i fiori tra di loro separati)
	Zolfo colloidale in polvere	8	
	Urea	2	
3	Ergofert Start Plus Bio	10	9 giugno 2023, BBCH 73 (Acini delle dimensioni di un granello di pepe (mignolatura))
	Zolfo colloidale in polvere	8	
	Urea	2	

Tabella 5: Prodotti, dosi e tempistiche di intervento per i trattamenti fogliari applicati nel vigneto di Osimo.

Nr.	Nome prodotto	Dose saggiata (Kg/ 4000m ²)	Data trattamento e fase fenologica (scala BBCH, Lorenz <i>et al.</i> , 1994)
1	Ergofert Cu/Zn	1,2	30 marzo 2023, BBCH 08 (Rottura delle gemme: le punte verdi dei germogli sono chiaramente visibili)
	Ergofert Start Plus Bio	2	
	Ergofert Nemacontrol	1,2	
2	Ergofert Cu/Zn	0,9	13 aprile 2023, BBCH 08 (Rottura delle gemme: le punte verdi dei germogli sono chiaramente visibili)
	Ergofert Calcio/Magnesio	1,8	
	Ergofert Nemacontrol	0,9	
3	Ergofert Cu/Zn	0,9	20 aprile 2023, BBCH 13 (Terza foglia distesa)
	Ergofert Calcio/Magnesio	1,8	
	Ergofert Nemacontrol	0,9	
4	Ergofert Cu/Zn	0,9	22 maggio 2023, BBCH 57 (Le infiorescenze sono pienamente sviluppate e i fiori tra di loro separati)
	Ergofert Calcio/Magnesio	1,8	
	Ergofert Nemacontrol	0,9	
5	Ergofert Shark	0,9	22 maggio 2023, BBCH 57 (Le infiorescenze sono pienamente sviluppate e i fiori tra di loro separati)
	Ergofert Boro	0,9	
6	Ergofert Shark	1,2	9 giugno 2023, BBCH 73 (Acini delle dimensioni di un granello di pepe (mignolatura))
	Ergofert Calcio/Magnesio	2,4	
	Ergofert Boro	1,2	
	Ergofert Stim Plus	0,4	
7	Ergofert Shark	1,2	5 luglio 2023, BBCH 79 (La maggior parte degli acini si tocca)
	Ergofert Calcio/Magnesio	2,4	
	Ergofert Stim Plus	0,4	
	Ergofert Nemacontrol	1,2	
8	Ergofert Shark	1,2	14 luglio 2023, BBCH 81 (Inizio della maturazione: le bacche iniziano a manifestare il colore tipico della cultivar)
	Ergofert Nemacontrol	1,2	
	Ergofert Calcio/Magnesio	2,4	
9	Ergofert Cu/Zn	1,2	19 luglio 2023, BBCH 81 (Inizio della maturazione: le bacche iniziano a manifestare il colore tipico della cultivar)
	Ergofert Glucogenesi	2,4	
10	Ergofert Shark	1,2	25 agosto 2023, BBCH 85 (“Addolcimento” degli acini)
	Ergofert Glucogenesi	2,4	

Nel vigneto di Castelplanio, i trattamenti riguardanti le strategie in prova sono stati eseguiti nel periodo compreso dal 5 aprile al 25 agosto secondo un calendario di interventi proposto dall'azienda B.E.A. Srl. In questo vigneto è stato necessario eseguire il decimo intervento fogliare più tardi rispetto a quello effettuato a Osimo a causa del diverso periodo di raccolta della varietà Verdicchio, più tardiva, rispetto allo Chardonnay, più precoce. Il Verdicchio è stato raccolto il 5 settembre mentre lo Chardonnay è stato raccolto il 28 agosto. In totale sono stati eseguiti tre trattamenti a livello radicale e dieci trattamenti a livello fogliare con un atomizzatore portato ad aspirazione anteriore dell'azienda Nobili (Figura 33) e trainato da un trattore Fiat 8066, lavorando ad una velocità costante di 4 km/h e con una pressione di 8 bar. Tutti i trattamenti sono stati effettuati con un volume d'irrorazione di 300 L/8000 m², ovvero di circa 400 L/ha. Gli ugelli venivano regolati in base al tipo di trattamento, fogliare o radicale.



Figura 33: Distribuzione della soluzione per i trattamenti nel vigneto di Castelplanio con l'atomizzatore trainato Nobili.

Tabella 6: Prodotti, dosi e tempistiche di intervento per i trattamenti radicali applicati nel vigneto di Castelplanio.

Nr.	Nome prodotto	Dose saggiata (Kg/ 8000m²)	Data trattamento e fase fenologica (scala BBCH, Lorenz <i>et al.</i>, 1994)
1	Ergofert Start Plus Bio	80	5 aprile 2023, BBCH 08 (Rottura delle gemme: le punte verdi dei germogli sono chiaramente visibili)
	Zolfo colloidale in polvere	80	
	Urea	20	
2	Ergofert Start Plus Bio	20	22 maggio 2023, BBCH 57 (Le infiorescenze sono pienamente sviluppate e i fiori tra di loro separati)
	Zolfo colloidale in polvere	16	
	Urea	4	
3	Ergofert Start Plus Bio	20	9 giugno 2023, BBCH 69 (Fine della fioritura)
	Zolfo colloidale in polvere	16	
	Urea	4	

Tabella 7: Prodotti, dosi e tempistiche di intervento per i trattamenti fogliari applicati nel vigneto di Castelplanio.

Nr.	Nome prodotto	Dose saggiata (Kg/4000m ²)	Data intervento e fase fenologica (scala BBCH, Lorenz <i>et al.</i> , 1994)
1	Ergofert Cu/Zn	2,4	5 aprile 2023, BBCH 08 (Rottura delle gemme: le punte verdi dei germogli sono chiaramente visibili)
	Ergofert Start Plus Bio	4	
	Ergofert Nemacontrol	2,4	
2	Ergofert Cu/Zn	1,8	12 aprile 2023, BBCH 12 (Seconda foglia distesa)
	Ergofert Calcio/Magnesio	3,6	
	Ergofert Nemacontrol	1,8	
3	Ergofert Cu/Zn	1,8	20 aprile 2023, BBCH 13 (Terza foglia distesa)
	Ergofert Calcio/Magnesio	3,6	
	Ergofert Nemacontrol	1,8	
4	Ergofert Cu/Zn	1,8	9 maggio 2023, BBCH 53 (Le infiorescenze sono chiaramente visibili)
	Ergofert Calcio/Magnesio	3,6	
	Ergofert Nemacontrol	1,8	
5	Ergofert Shark	1,8	22 maggio 2023, BBCH 57 (Le infiorescenze sono pienamente sviluppate e i fiori tra di loro separati)
	Ergofert Boro	1,8	
6	Ergofert Shark	2,4	9 giugno 2023, BBCH 69 (Fine della fioritura)
	Ergofert Calcio/Magnesio	4,8	
	Ergofert Boro	2,4	
	Ergofert Stim Plus	0,8	
7	Ergofert Shark	2,4	5 luglio 2023, BBCH 75 (Acini delle dimensioni di un pisello (sviluppo del grappolo))
	Ergofert Calcio/Magnesio	4,8	
	Ergofert Stim Plus	0,8	
	Ergofert Nemacontrol	2,4	
8	Ergofert Shark	2,4	14 luglio 2023, BBCH 77 (Gli acini cominciano a toccarsi (chiusura grappolo))
	Ergofert Nemacontrol	2,4	
	Ergofert Calcio/Magnesio	4,8	
9	Ergofert Cu/Zn	2,4	19 luglio 2023, BBCH 77 (Gli acini cominciano a toccarsi (chiusura grappolo))
	Ergofert Glucogenesi	4,8	
10	Ergofert Shark	2,4	25 agosto 2023, BBCH 81 (Inizio della maturazione: le bacche iniziano a manifestare il colore tipico della cultivar)
	Ergofert Glucogenesi	4,8	

5.4 Rilievi sul mal dell'esca

Oggetto della tesi sono state le valutazioni d'efficacia dei trattamenti svolti durante l'anno sull'insorgenza dei sintomi fogliari del mal dell'esca, considerando un livello di malattia omogeneo nelle porzioni di vigneto individuate. Tra il mese di giugno ed il mese di agosto 2023 sono stati effettuati rilievi visivi nei suddetti vigneti commerciali per verificare la presenza di sintomi di mal dell'esca. Nel rilievo è stata registrata non solo la presenza/assenza dei sintomi, ma è stato anche attribuito a ciascuna pianta un valore da 1 a 5 (Figura 34) secondo una scala empirica, proposta da Martin *et al.* (2023), che descrive l'entità dei sintomi riscontrati sulla pianta.

Tabella 8: Scala empirica utilizzata per il rilievo dei sintomi sulle piante.

Classe di malattia	Superficie fogliare infetta (%)
0	Foglie sane
1	1-10%
2	10-25%
3	26-50%
4	51-100%
5	apoplezia

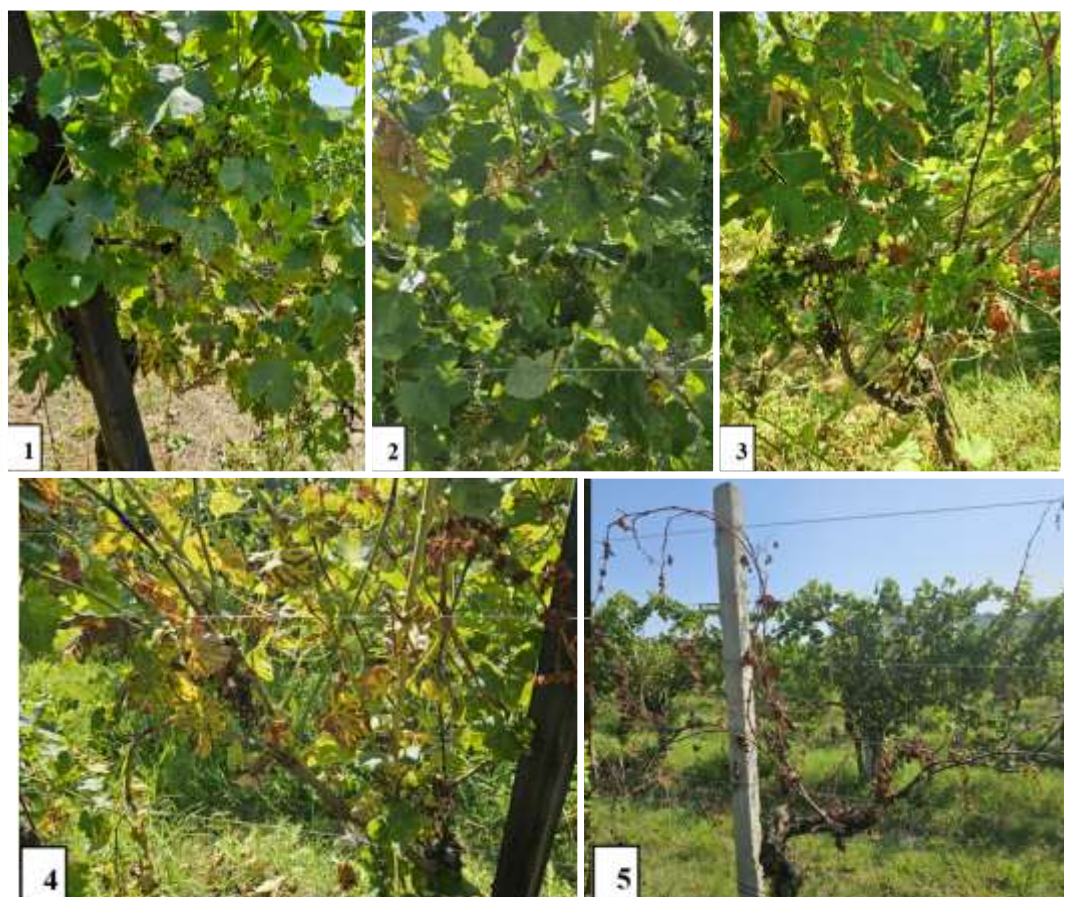


Figura 34: Scala numerica utilizzata sul campo per determinare il tasso di malattia necessario per successivi calcoli della gravità dell'esca e dell'indice di McKinney. Vengono analizzate le foglie con sintomi di tigratura tipiche dell'esca e viene assegnato un numero da 0 a 5 in base alla percentuale di foglie con sintomi: 1 = da 1 a 10%, 2 = da 10 a 25%, 3 = da 26 a 50%, 4 = da 51 a 100% e 5 = apoplessia (Martin *et al.*, 2023).

Con i dati raccolti è stato possibile calcolare alcuni parametri patometrici che permettono di valutare la diffusione, la gravità e l'intensità media ponderata (I) o Indice di infezione di McKinney (McKinney, 1923).

La diffusione (D) esprime la percentuale di piante infette sul totale di piante prese in esame. Tale parametro è stato calcolato con la seguente formula:

$$D = n * 100 / N$$

dove n = numero di piante sintomatiche; N = numero totale di piante osservate.

La gravità (G) esprime la gravità della malattia, relativamente alle piante sintomatiche, facendo riferimento alle classi della scala empirica. Tale parametro è stato calcolato con la seguente formula:

$$G = \sum(c \cdot f) / n$$

dove c = valore classe empirica; f= frequenza della classe; n= numero piante infette.

L'indice di McKinney, (o intensità media ponderata della malattia) esprime la gravità della malattia in valore percentuale rispetto a quella massima possibile ed è stato calcolato attraverso la formula:

$$I = \sum(c \cdot f) / (N \cdot X)$$

dove c: valore classe empirica; f: frequenza della classe; N: numero totale delle osservazioni; X: valore della classe massima della scala empirica.

Successivamente si sono calcolate le medie e le deviazioni di ciascuna tesi ed è stata condotta un'analisi statistica. Il software di statistica impiegato per questa analisi prende il nome di SPSS20 (Statistical Package for Social Science). È stata eseguita l'analisi T-test per verificare l'efficacia del trattamento.

5.5 Rilievi sulla peronospora

Considerando l'andamento meteorologico stagionale particolarmente favorevole all'insorgenza di *Plasmopara viticola* (agente causale della peronospora della vite) e, considerata l'azione antagonista e di induzione di resistenza dei microrganismi presenti nei prodotti sperimentati, è stata valutata anche l'efficacia della strategia saggiata nei confronti della peronospora. I rilievi sono stati effettuati su entrambi i campi sperimentali dividendo i filari in tre blocchi con condizioni omogenee. Complessivamente, sono state valutate 15 piante per blocco, per un totale di 45 piante per porzione di vigneto trattata o non trattata. L'effetto deriva è stato arginato selezionando i filari interessati nella parte centrale di ogni tesi. La scelta delle piante è stata razionale: sono state escluse dalla scelta quelle a crescita stentata o eccessivamente vigorose rispetto alla media, oltre alle prime e alle ultime piante di ciascuna fila. Inoltre, ad ogni rilievo sono stati effettuati dei monitoraggi sulla vegetazione per la determinazione delle fasi fenologiche e l'individuazione dei primi sintomi di malattia.

I rilievi sono stati condotti su foglie e su grappoli nelle seguenti date e fasi fenologiche:

- 20/06/2023 a BBCH 73 a Castelplanio

- 23/06/2023 a BBCH 75 a Osimo

Per valutare l'entità delle infezioni sono state adoperate scale empiriche suddivise in più classi di gravità in base alla percentuale di superficie fogliare colpita dai sintomi della malattia o al numero di bacche infette per ogni grappolo. Per quanto riguarda le foglie, ai fini dello studio si considera che le piante prese in esame abbiano in totale una media di 100 foglie ciascuna, classificando quelle malate con 11 differenti classi di gravità della malattia (Tabella 9).

Tabella 9 – Scala empirica utilizzata per il rilievo delle malattie sulle foglie.

Classe di malattia	Superficie fogliare infetta (%)
0	Foglia sana
1	1-10%
2	11-20%
3	21-30%
4	31-40%
5	41-50%
6	51-60%
7	61-70%
8	71-80%
9	81-90%
10	91-100%

Il numero di grappoli invece è stato contato per ogni pianta e sono state attribuite 8 classi di gravità (Tabella 10).

Tabella 10 - Scala empirica utilizzata per il rilievo delle malattie sui grappoli.

Classe di malattia	Numero di bacche infette o % di grappolo infetta
0	Grappolo sano
1	1-5 bacche
2	6-11 bacche
3	12-25 bacche
4	25%
5	26-50%
6	51-75%
7	76-100%

L'adozione di scale empiriche ha consentito di stimare gli stessi parametri patometrici, come la diffusione della malattia (D), la gravità (G) e l'intensità media ponderata (I) o Indice di infezione di McKinney (McKinney, 1923) descritti per il mal dell'esca.

Tutti i dati sono stati sottoposti ad analisi statistica secondo il disegno sperimentale a blocchi randomizzati. Il software di statistica impiegato per questa analisi prende il nome di SPSS20. È stata eseguita l'analisi T-test per verificare l'efficacia del trattamento.

6. RISULTATI

6.1 CONDIZIONI METEOROLOGICHE

Complessivamente, l'andamento meteorologico stagionale, caratterizzato da numerose precipitazioni durante il periodo primaverile ed estivo (soprattutto il mese di maggio) ed elevate temperature estive (con punte di 38,3°C nel mese di luglio) è risultato favorevole alla propagazione delle spore dei funghi responsabili del mal dell'esca ed alla manifestazione dei sintomi fogliari nelle piante già infette precedentemente. Inoltre, le condizioni meteorologiche primaverili hanno creato difficoltà nell'eseguire i trattamenti necessari ed hanno favorito lo sviluppo di *Plasmopara viticola*. I dati meteorologici medi settimanali dei due siti sperimentali che sono stati forniti dalla stazione metereologica di Osimo (AN) (Figura 35) e Castelplanio (AN) (Figura 36) disponibili sul sito dell'AMAP (<http://www.meteo.marche.it/notiziario.aspx>).

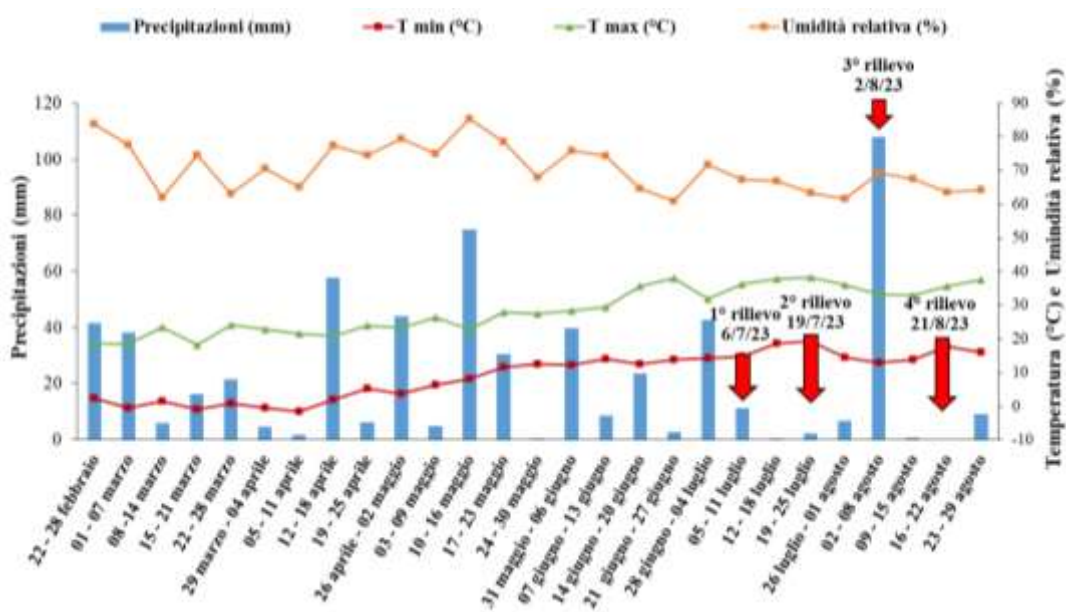


Figura 35: Grafico dell'andamento meteorologico stagionale del 2023 nell'area della prova sperimentale. I dati sono registrati nel periodo che va dal 22 febbraio al 29 agosto 2023 dalla stazione metereologica di Osimo (AN). Fonte dati: AMAP.

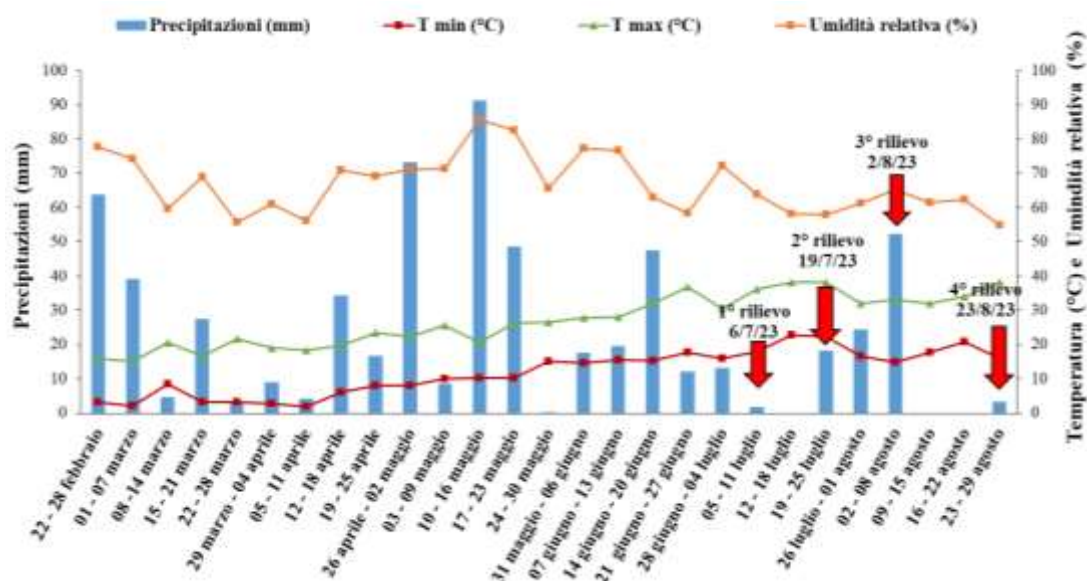


Figura 36: Grafico dell'andamento meteorologico stagionale del 2023 nell'area della prova sperimentale. I dati sono registrati nel periodo che va dal 22 febbraio al 29 agosto 2023 dalla stazione metereologica di Castelpiano (AN). Fonte dati: AMAP.

6.2 RISULTATI DEI RILIEVI RIGUARDANTI MAL DELL'ESCA

6.2.1 Risultati dei rilievi nel vigneto di Osimo

6.2.1.1 Rilievo 1 del 6 luglio 2023 nel vigneto di Osimo

Nel primo rilievo condotto a Osimo in data 6 luglio, avviato quando le piante iniziano a manifestare i primi sintomi del mal dell'esca, la strategia adottata ha portato ad una diminuzione dei tre parametri considerati: diffusione, gravità e Indice di McKinney. Tuttavia, la riduzione della percentuale di diffusione e dell'Indice di McKinney (Figura 37 A e C) non è risultata statisticamente significativa, mentre si è registrato un risultato statisticamente significativo per quanto riguarda la gravità (Figura 37 B).

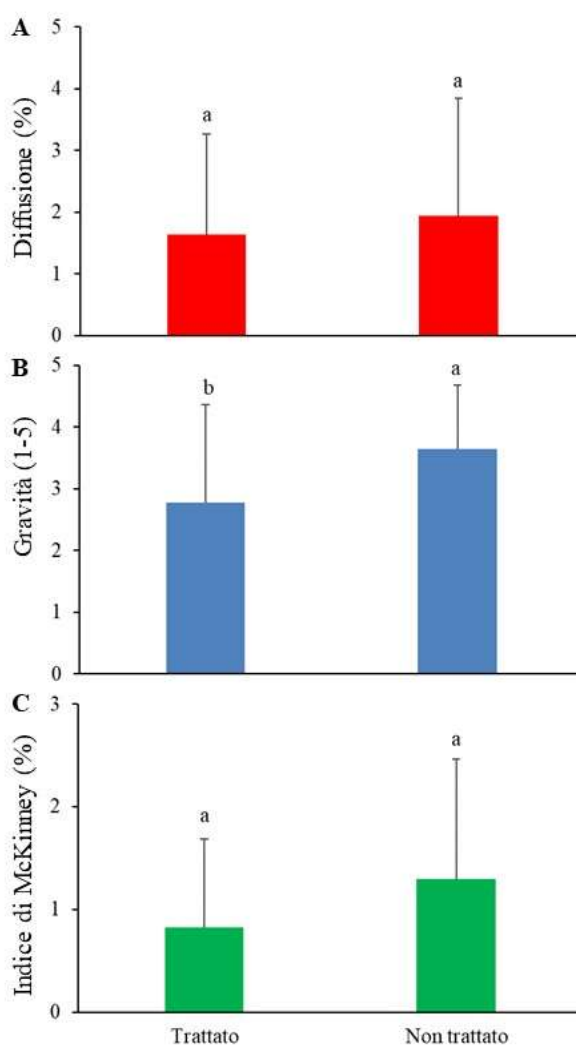


Figura 37: **A.** Diffusione (%), **B.** Gravità (1-5) e **C.** Indice di McKinney (%) del mal dell'esca su piante di Chardonnay; rilievo condotto in data 6 luglio 2023 nel vigneto sperimentale di Osimo. Gli istogrammi con la stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il T-test ($P \leq 0,05$).

6.2.1.2 Rilievo 2 del 19 luglio 2023 nel vigneto di Osimo

Anche nel secondo rilievo sono emerse delle differenze fra le due tesi sperimentali in prova. Nel caso della percentuale di diffusione e dell'Indice di McKinney (Figura 38 A e C), i trattamenti hanno portato ad una riduzione dei parametri, anche se non statisticamente significativa. Al contrario, è stato riscontrato un aumento della gravità dei sintomi (Figura 38 B) nella porzione di vigneto trattata rispetto al testimone non trattato; anche in questo caso però, tale differenza non è statisticamente significativa.

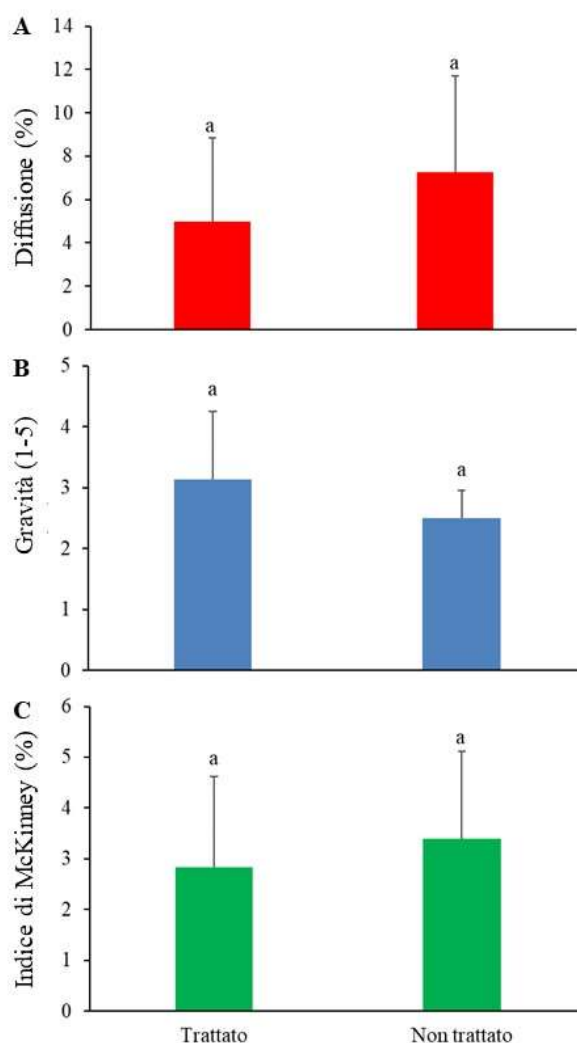


Figura 38: A. Diffusione (%), B. Gravità (1-5) e C. Indice di McKinney (%) di sintomi del mal dell'esca su piante di Chardonnay; rilievo condotto in data 19 luglio 2023 nel vigneto sperimentale di Osimo. Gli istogrammi con la stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il T-test ($P \leq 0,05$).

6.2.1.3 Rilievo 3 del 2 agosto 2023 nel vigneto di Osimo

Nel terzo rilievo, diffusione, gravità ed intensità media ponderata della malattia sono risultate molto simili fra piante trattate e piante non trattate. non sono emerse differenze statisticamente significative tra le due tesi sperimentali (Figura 39).

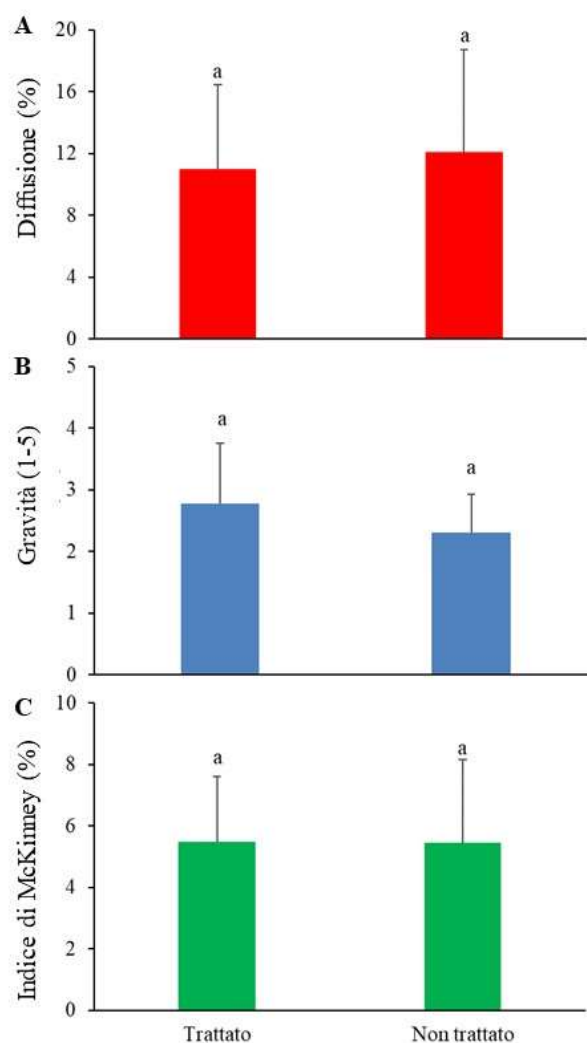


Figura 39: A. Diffusione (%), B. Gravità (1-5) e C. Indice di McKinney (%) di sintomi del mal dell'esca su piante di Chardonnay; rilievo condotto in data 2 agosto 2023 nel vigneto sperimentale di Osimo. Gli istogrammi con la stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il T-test ($P \leq 0,05$).

6.2.1.4 Rilievo 4 del 21 agosto 2023 nel vigneto di Osimo

Nell'ultimo rilievo, la diffusione della malattia è risultata significativamente inferiore nella porzione di vigneto trattata rispetto a quella non trattata (Figura 40 A). La gravità dei sintomi sulle piante riscontrate infette è risultata pressoché uguale nelle due tesi, mentre, per quanto riguarda l'Indice di McKinney invece, si è verificata una riduzione nella strategia adottata rispetto al testimone non trattato, che però non è risultata statisticamente significativa (Figura 40 B e C).

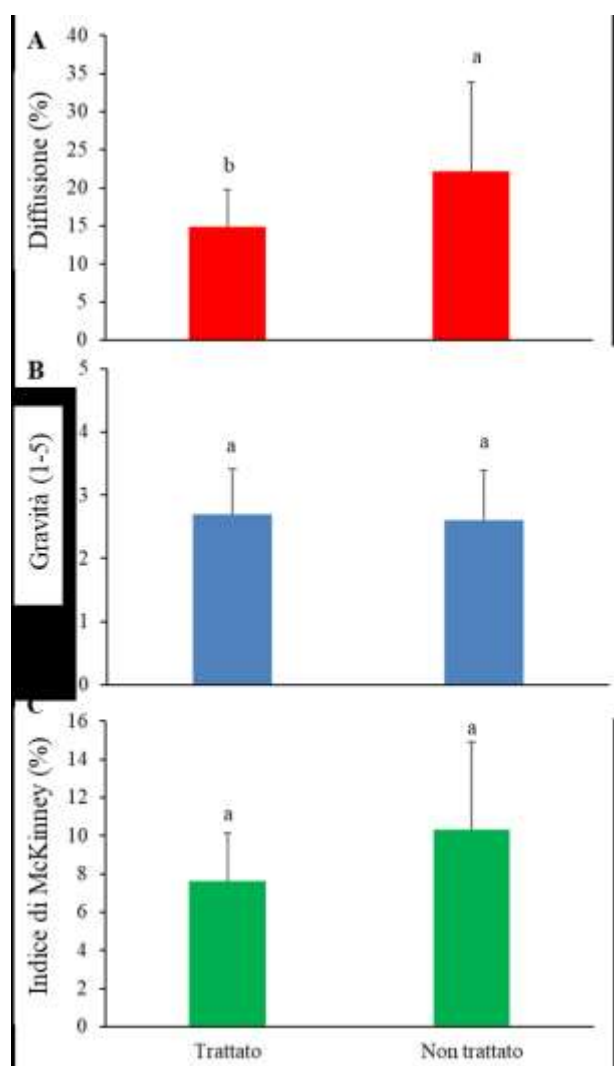


Figura 40 A. Diffusione (%), B. Gravità (1-5) e C. Indice di McKinney (%) di sintomi del mal dell'esca su piante di Chardonnay; rilievo condotto in data 21 agosto 2023 nel vigneto sperimentale di Osimo. Gli istogrammi con la stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il T-test ($P \leq 0,05$).

6.2.2 Risultati dei rilievi nel vigneto di Castelplanio

6.2.2.1 Rilievo 1 del 6 luglio 2023 nel vigneto di Castelplanio

Nel primo rilievo condotto a Castelplanio il 6 luglio 2023, quando le prime piante hanno iniziato a manifestare i sintomi del mal dell'esca, sono state osservate differenze statisticamente significative per quanto riguarda l'incidenza della malattia (Figura 41). La strategia oggetto d'indagine ha ridotto in maniera statisticamente significativa due dei tre parametri considerati (diffusione e Indice di McKinney) rispetto al testimone non trattato. I trattamenti hanno anche ridotto la gravità dei sintomi rispetto al

testimone non trattato, però tale differenza non è risultata significativa da un punto di vista statistico. Inoltre, nel vigneto di Castelplanio è stata riscontrata un'incidenza maggiore del mal dell'esca rispetto al vigneto di Osimo.

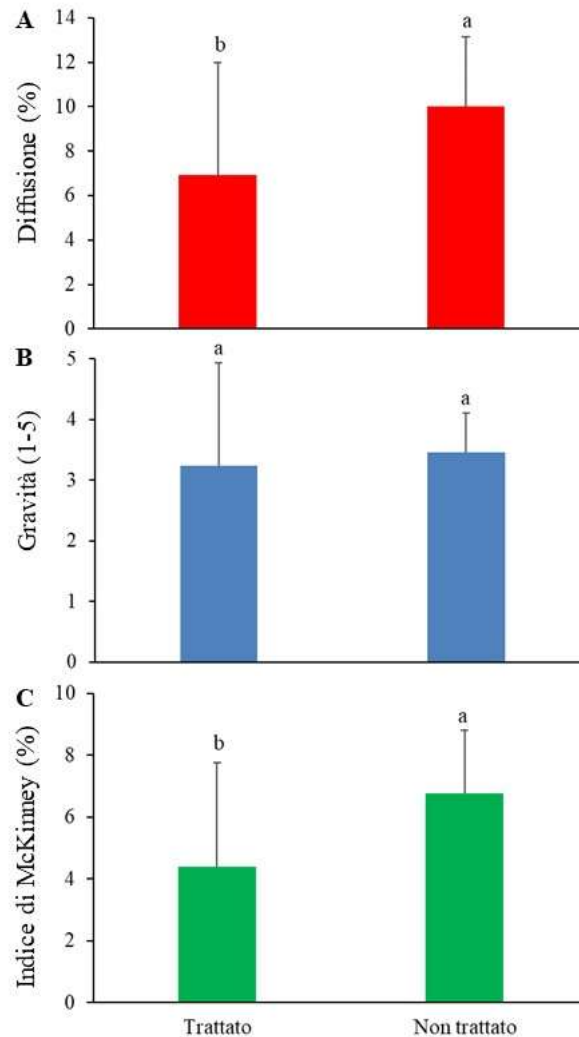


Figura 41: A. Diffusione (%), B. Gravità (1-5) e C. Indice di McKinney (%) di sintomi del mal dell'esca su piante di Verdicchio; rilievo condotto in data 6 luglio 2023 nel vigneto sperimentale di Castelplanio. Gli istogrammi con la stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il T-test ($P \leq 0,05$).

6.2.2.2 Rilievo 2 del 19 luglio 2023 nel vigneto di Castelplanio

Nel secondo rilievo, così come per quello del 6 luglio, è possibile osservare come la strategia sperimentata sia risultata statisticamente diversa dal testimone non trattato, avendo valori inferiori per la diffusione e l'Indice di McKinney (Figura 42 A e C).

Non sono emerse invece differenze statisticamente significative tra le due tesi per quanto riguarda la gravità dei sintomi (Figura 42 B).

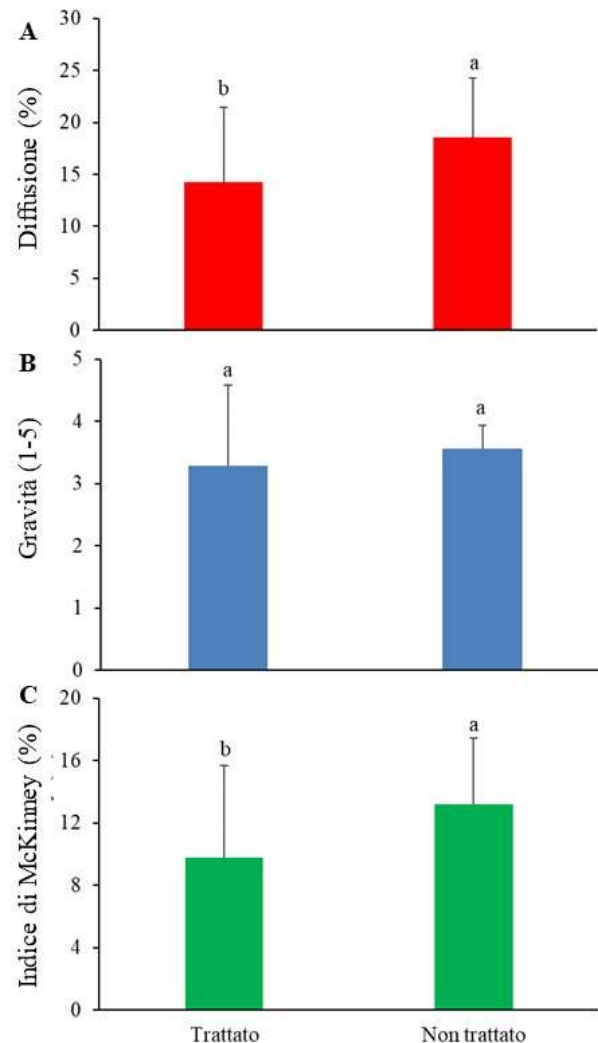


Figura 42: A. Diffusione (%), B. Gravità (1-5) e C. Indice di McKinney (%) di sintomi del mal dell'esca su piante di Verdicchio; rilievo condotto in data 19 luglio 2023 nel vigneto sperimentale di Castelplanio. Gli istogrammi con la stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il T-test ($P \leq 0,05$).

6.2.2.3 Rilievo 3 del 2 agosto 2023 nel vigneto di Castelplanio

Nel terzo rilievo, effettuato il 2 agosto 2023, non sono emerse differenze statisticamente significative. Tuttavia, diffusione e Indice di McKinney sono stati leggermente ridotti dai trattamenti (Figura 43 A e C). Per la gravità dei sintomi (Figura 43 B) non si è verificata alcuna differenza tra le due tesi sperimentali.

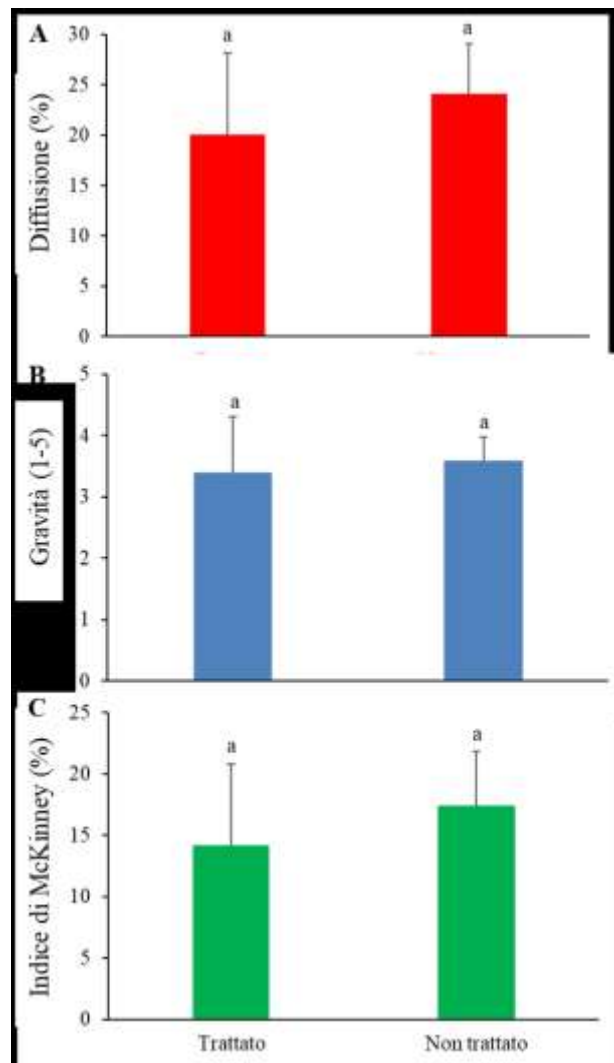


Figura 43: **A.** Diffusione (%), **B.** Gravità (1-5) e **C.** Indice di McKinney (%) di sintomi del mal dell'esca su piante di Verdicchio; rilievo condotto in data 2 agosto 2023 nel vigneto sperimentale di Castelplanio. Gli istogrammi con la stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il T-test ($P \leq 0,05$).

6.2.2.4 Rilievo 4 del 23 agosto 2023 nel vigneto di Castelplanio

Nell'ultimo rilievo, del 23 agosto 2023, la diffusione della malattia è stata complessivamente contenuta in maniera significativa dalla strategia sperimentata rispetto al testimone non trattato (Figura 44 A). Anche per l'Indice di McKinney (Figura 44 C) si è verificata una riduzione a seguito dei trattamenti effettuati, anche se però tale riduzione non risulta statisticamente significativa. Per quanto riguarda la gravità dei sintomi invece, non si sono registrate differenze fra piante trattate e non trattate (Figura 44 B).

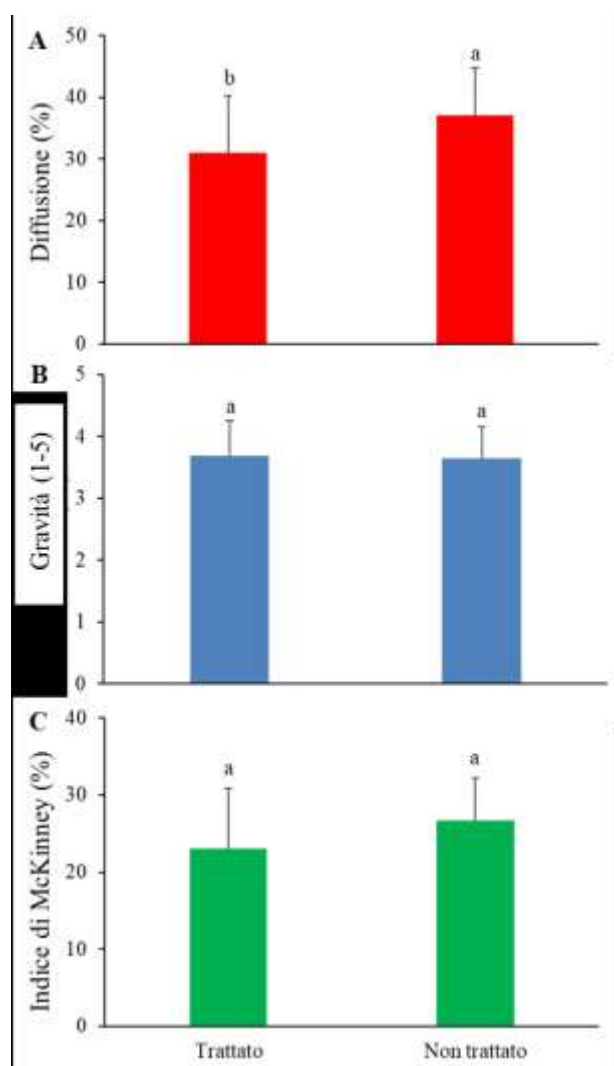


Figura 44: A. Diffusione (%), B. Gravità (1-5) e C. Indice di McKinney (%) di sintomi del mal dell'esca su piante di Verdicchio; rilievo condotto in data 23 agosto 2023 nel vigneto sperimentale di Castelplanio. Gli istogrammi con la stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il T-test ($P \leq 0,05$).

6.2.3 Considerazioni rispetto alla situazione registrata nel 2021 nei due vigneti sperimentali

Oltre alla valutazione d'efficacia dei trattamenti sull'espressione dei sintomi dell'annata in corso (2023), è stato eseguito un confronto con la situazione dei due vigneti registrata nel 2021 da uno studio condotto sull'incidenza del mal dell'esca nella regione Marche, che ha reso possibile l'individuazione delle piante dei due vigneti che all'epoca manifestavano sintomi. È stato analizzato se la strategia sperimentata abbia avuto un effetto sulla remissione dei sintomi delle piante che risultavano sintomatiche nei rilievi effettuati nell'anno 2021. Inoltre, partendo dalle piante sintomatiche

osservate nel 2023, è stato valutato se i trattamenti abbiano ridotto la percentuale di nuove piante sintomatiche.

6.2.3.1 Effetto dei trattamenti sulle piante sintomatiche nei rilievi del 2021 nel vigneto di Osimo

Dall'analisi sull'effetto della strategia sperimentata sul numero di piante che sono state identificate sintomatiche anche nei rilievi del 2021 non sono emerse delle differenze statisticamente significative tra le due tesi sperimentali (trattato e non trattato) (Figura 45).

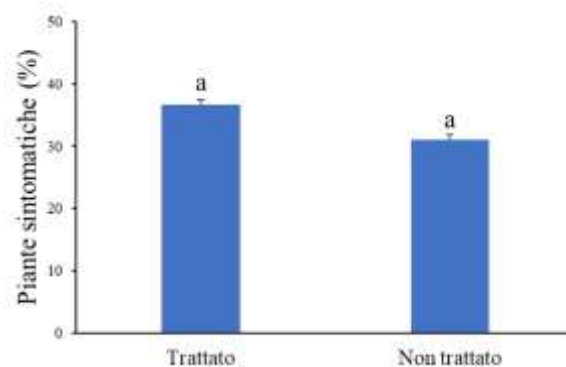


Figura 45: Percentuale di piante di Chardonnay sintomatiche nei rilievi effettuati nel 2021 che hanno mantenuto i sintomi anche nei rilievi effettuati nel 2023. Gli istogrammi con la stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il T-test ($P \leq 0,05$).

6.2.3.2 Effetto dei trattamenti sulle nuove piante sintomatiche rispetto ai rilievi del 2021 nel vigneto di Osimo

Anche dall'analisi sull'effetto della strategia sperimentata sul numero di nuove piante sintomatiche rispetto a quello identificato nei rilievi del 2021 si osserva come non ci siano delle differenze statisticamente significative tra piante trattate e non (Figura 46).

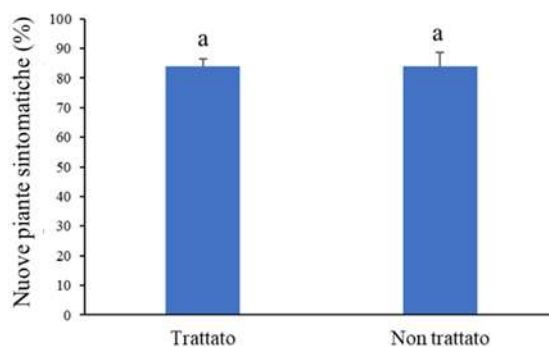


Figura 46: Percentuale di piante di Chardonnay sintomatiche nei rilievi effettuati nel 2023 che risultavano sane nei rilievi effettuati nel 2021. Gli istogrammi con la stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il T-test ($P \leq 0,05$).

6.2.3.3 Effetto dei trattamenti sulle piante sintomatiche nei rilievi del 2021 nel vigneto di Castelplanio

Anche a Castelplanio non sono emerse delle differenze statisticamente significative circa la capacità dei trattamenti testati di indurre una remissione dei sintomi nelle piante che erano risultate sintomatiche due anni prima. (Figura 47).

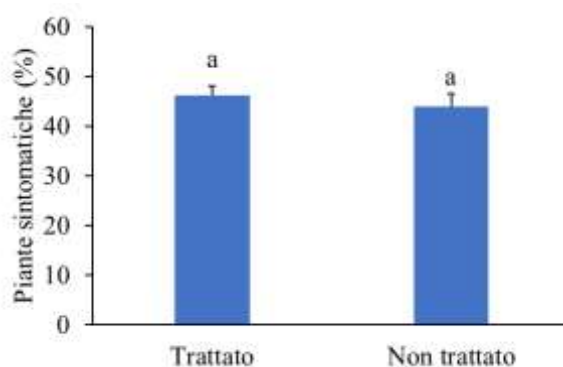


Figura 47: Percentuale di piante di Verdicchio sintomatiche nei rilievi effettuati nel 2021 che hanno mantenuto i sintomi anche nei rilievi effettuati nel 2023. Gli istogrammi con la stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il T-test ($P \leq 0,05$).

6.2.3.4 Effetto dei trattamenti sulle nuove piante sintomatiche rispetto ai rilievi del 2021 nel vigneto di Castelplanio

Non risulta esserci una differenza significativa fra area trattata e non trattata circa la percentuale di nuove piante sintomatiche fra quelle risultate sintomatiche nell'annata 2023 (Figura 48).

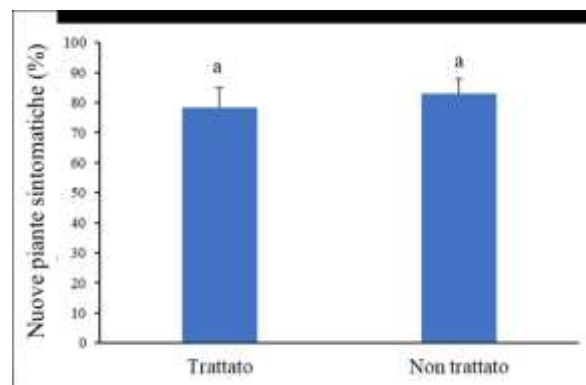


Figura 48: Percentuale di piante di Verdicchio sintomatiche nei rilievi effettuati nel 2023 che risultavano sane nei rilievi effettuati nel 2021. Gli istogrammi con la stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il T-test ($P \leq 0,05$).

6.3 RISULTATI DEI RILIEVI RIGUARDANTI PERONOSPORA

6.3.1 Risultati dei rilievi nel vigneto di Osimo

6.3.1.1 Risultati foglie

In data 23 giugno 2023, vista l'annata particolarmente favorevole alla peronospora della vite, è stato eseguito un rilievo per verificare eventuali effetti collaterali della strategia saggiata, nei confronti di questa malattia. Nel vigneto sperimentale di Osimo, non sono emerse differenze statisticamente significative riguardo i tre parametri presi in esame: diffusione, gravità e Indice di McKinney (Figura 49), i quali sono risultati pressoché identici fra piante trattate e piante non trattate.

6.3.1.2 Risultati grappoli

L'effetto collaterale è stato valutato anche su grappoli, sempre in data 23 giugno 2023. Nel vigneto sperimentale di Osimo, la pressione di malattia è risultata molto più alta sui grappoli rispetto a quella registrata sulle foglie. Tuttavia, neanche in questo caso è stato possibile apprezzare delle differenze significative tra le due tesi (Figura 50). Nella porzione trattata sono stati riscontrati dei livelli di infezione dei grappoli superiori.

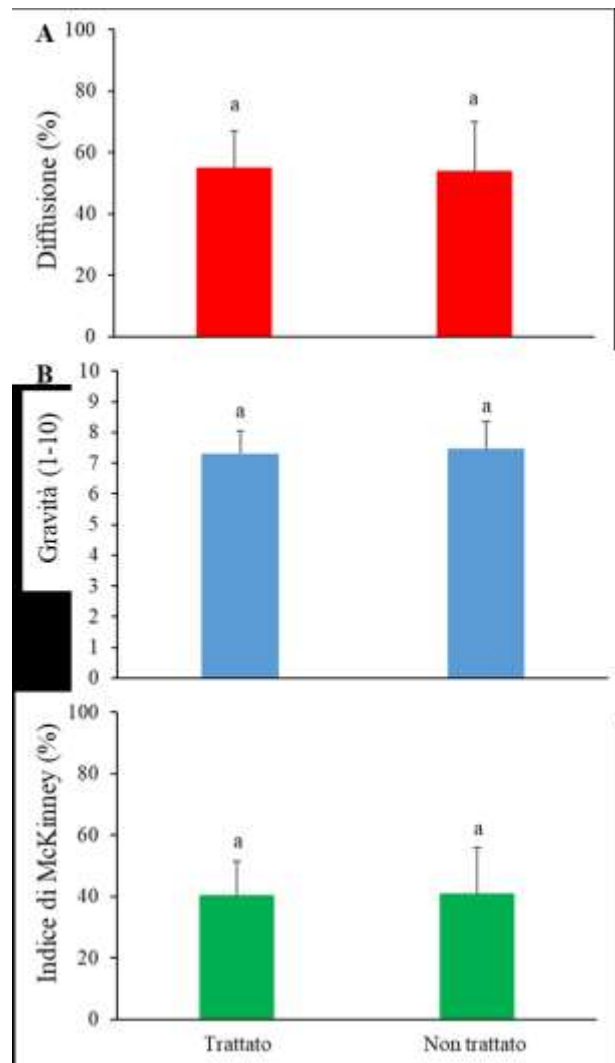


Figura 49: A. Diffusione (%), B. Gravità (1-10) e C. Indice di McKinney (%) di peronospora su foglie di Chardonnay; rilievo condotto in data 23 giugno 2023 nel vigneto sperimentale di Osimo. Gli istogrammi con la stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il T-test ($P \leq 0,05$).

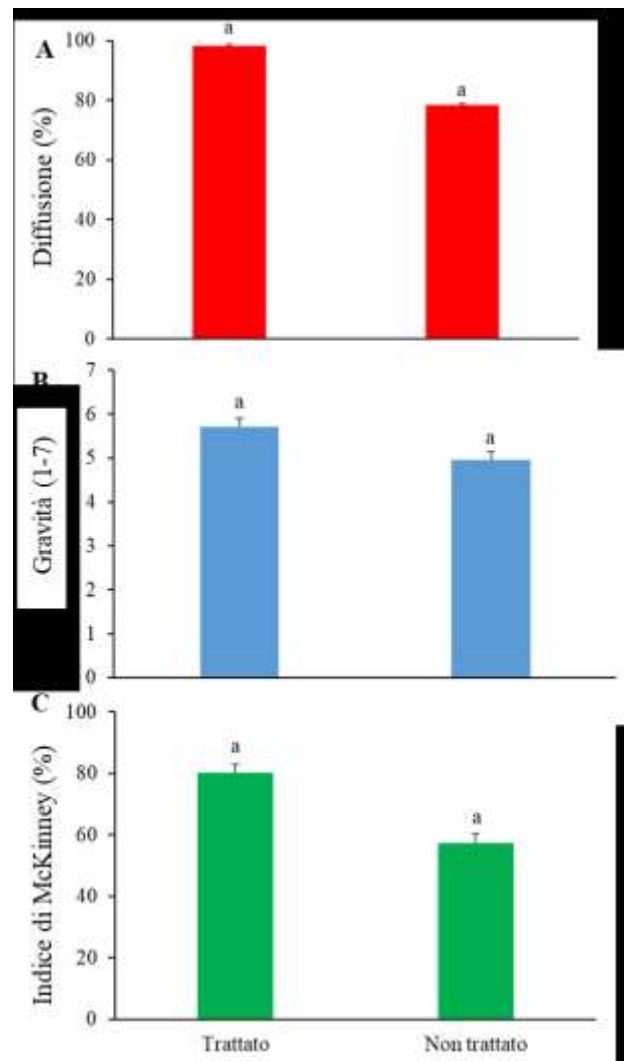


Figura 50: A. Diffusione (%), B. Gravità (1-7) e C. Indice di McKinney (%) di peronospora su grappoli di Chardonnay; rilievo condotto in data 23 giugno 2023 nel vigneto sperimentale di Osimo. Gli istogrammi con la stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il T-test ($P \leq 0,05$).

6.3.2 Risultati dei rilievi nel vigneto di Castelplanio

6.3.2.1 Risultati foglie

Anche nel vigneto sperimentale di Castelplanio (rilievo condotto il 20 giugno 2023), sulle foglie non sono emerse differenze significative fra piante trattate e piante non trattate per quanto riguarda la peronospora, considerando i tre parametri presi in esame: diffusione, gravità e indice di McKinney (Figura 51).

6.3.2.2 Risultati grappoli

La pressione della peronospora è stata maggiore sui grappoli rispetto alla vegetazione. Nel rilievo eseguito il 20 giugno 2023, le due tesi non si sono differenziate in termini di contenimento della peronospora (Figura 52).

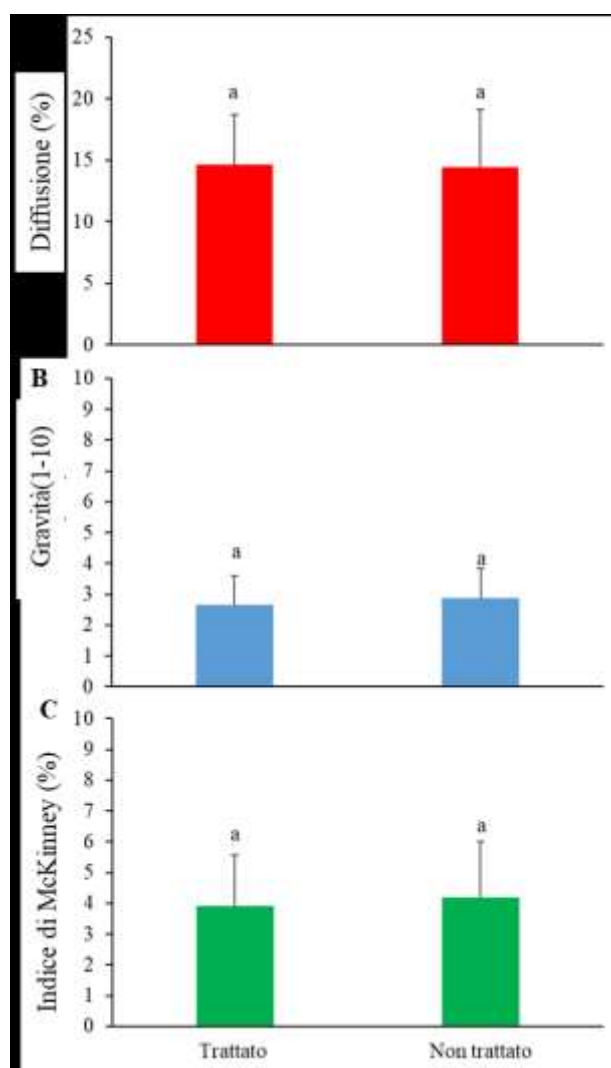


Figura 51: A. Diffusione (%), B. Gravità (1-10) e C. Indice di McKinney (%) di peronospora su foglie di Verdicchio; rilievo condotto in data 20 giugno 2023 nel vigneto sperimentale di Castelplanio. Gli istogrammi con la stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il T-test ($P \leq 0,05$).

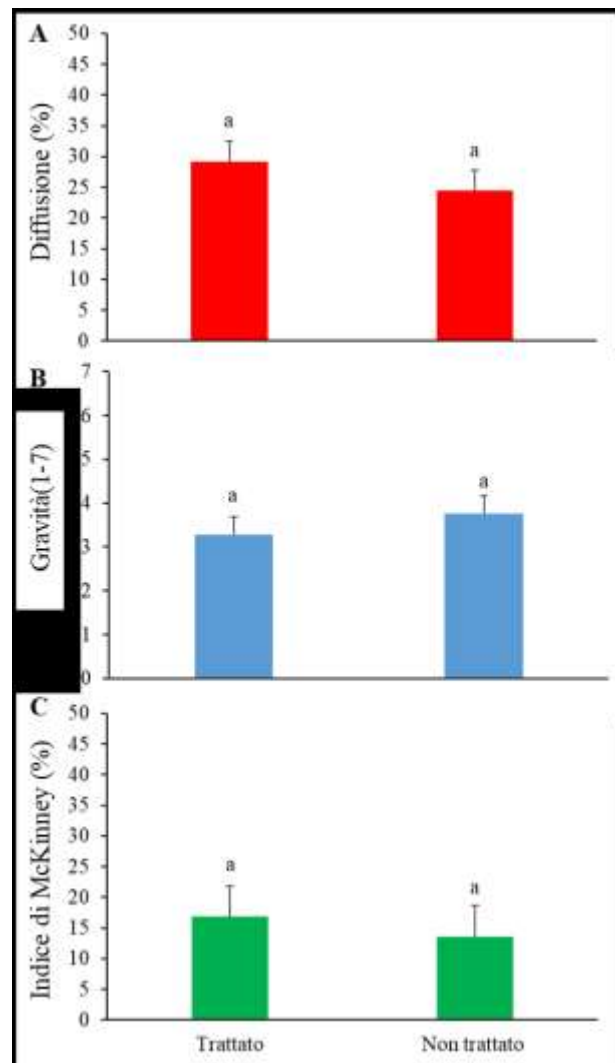


Figura 52: A. Diffusione (%), B. Gravità (1-7) e C. Indice di McKinney (%) di peronospora su grappoli di Verdicchio; rilievo condotto in data 20 giugno 2023 nel vigneto sperimentale di Castelplano. Gli istogrammi con la stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il T-test ($P \leq 0,05$).

7. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il mal dell'esca è una delle malattie della vite più diffuse al mondo, in grado di creare importanti danni economici agli agricoltori, in quanto è considerata la principale causa di morte delle viti, nonché ambientali, per la presenza di vigneti con rilevanti fallanze. Nonostante i notevoli sforzi della comunità scientifica impegnata a chiarirne eziologia, epidemiologia e strategie di gestione, è tuttora una sindrome complessa che necessita di approfondimenti per poter costruire un quadro completo di tutti i patogeni responsabili e la loro interazione, l'interazione fra loro e la pianta e l'influenza delle tante variabili (cultivar e portinnesto, condizioni climatiche, struttura fisica e chimica del terreno, ecc.) che agiscono sull'epidemiologia e potrebbero favorire l'incidenza della malattia. Ad oggi, ancora non esiste una soluzione efficace per controllare questa malattia (Romanazzi *et al.*, 2016), anche a causa della mancanza di conoscenze necessarie, ed è quindi fondamentale attuare e migliorare tutte le strategie di prevenzione per il contenimento del mal dell'esca. Le varie cultivar di *Vitis vinifera* mostrano livelli di sensibilità alla malattia piuttosto variabili (Marchi, 2001; Landi *et al.*, 2012; Murolo e Romanazzi, 2014; Foglia *et al.*, 2022), tuttavia ad oggi nessuna cultivar è risultata immune ai funghi responsabili (Surico *et al.*, 2006; Murolo e Romanazzi, 2014). La suscettibilità dei portinnesti e delle cultivar di vite ai patogeni del mal dell'esca è stata studiata, fra gli altri, da Eskalen *et al.* (2001), Feliciano *et al.* (2004) e Murolo e Romanazzi (2014): questi studi hanno dimostrato che esistono diversi livelli di suscettibilità agli agenti patogeni osservati tra i diversi genotipi, e nessuno risulta essere veramente resistente.

L'obiettivo di questa tesi è stato la valutazione dell'efficacia di prodotti biologici, quali fertilizzanti e microrganismi, sulla manifestazione dei sintomi del mal dell'esca. Per questo, sono stati selezionati due vigneti sperimentali con una discreta incidenza del mal dell'esca, confermata da precedenti studi pluriennali effettuati dall'Università Politecnica delle Marche di Ancona. I due vigneti, infatti, presentano un'alta percentuale di fallanze e/o di nuove barbatelle da rimpiazzo dovute principalmente alle infezioni verificatesi negli anni. La cultivar Verdicchio, presente a Castelplanio, è considerata una delle cultivar a bacca bianca meno suscettibili al mal dell'esca (Murolo e Romanazzi, 2014), anche se negli ultimi anni l'incidenza su impianti di Verdicchio, nell'areale della sperimentazione, è aumentata in maniera preoccupante. Anche

Chardonnay, la varietà coltivata a Osimo, è classificato tra i vitigni meno suscettibili (Andreini *et al.*, 2009; Andreini *et al.*, 2013; Borgo *et al.*, 2008; Christen *et al.*, 2007), ma le caratteristiche pedoclimatiche della zona e le tecniche colturali potrebbero influire sulla sua capacità di resistenza. Ad ogni modo, a causa della complessità del mal dell'esca, la valutazione della sensibilità della cultivar è molto difficile, soprattutto perché non è possibile sapere quando inizino le infezioni ed i diversi fattori ambientali e colturali sembrano influire pesantemente sulla manifestazione dei sintomi (Andreini *et al.*, 2014).

Osservando le condizioni meteorologiche che si sono registrate durante la sperimentazione, si può affermare che le abbondanti piogge primaverili-estive, accompagnate da temperature estive alte, abbiano favorito l'insorgenza dei sintomi del mal dell'esca. Le stesse condizioni si sono verificate in entrambi i campi che sono distanti 28 km in linea d'aria, sebbene abbiano condizioni pedoclimatiche molto diverse. Per quanto riguarda i sintomi del mal dell'esca, dai primi rilievi effettuati il 6 luglio agli ultimi rilievi effettuati il 20 e 23 agosto, rispettivamente ad Osimo e Castelplanio, si è verificato un aumento progressivo del numero di piante sintomatiche. Probabilmente, nei primi rilievi effettuati la pressione della malattia è risultata bassa a causa delle condizioni ambientali favorevoli al benessere delle piante (temperatura mite e disponibilità d'acqua). In seguito, probabilmente a causa delle elevate temperature estive, e del conseguente aumento della traspirazione, si è registrato un progressivo incremento della pressione di malattia in entrambi i campi. Infatti, nella prima settimana di agosto, ad esempio, si sono registrate precipitazioni con oltre 100 mm di pioggia caduti in pochi giorni contestualmente alla presenza di temperature superiori ai 30°C. Complessivamente, considerando in partenza una diffusione della malattia omogenea nei vigneti, la strategia sperimentata ha ridotto l'incidenza dei sintomi del mal dell'esca nei due campi sperimentali, anche se non sempre in maniera significativa. Nel campo di Osimo, inizialmente, la bassa pressione della malattia non ha permesso di apprezzare differenze significative fra le due tesi (trattato e non trattato), tranne nel caso della gravità dei sintomi. Nell'ultimo rilievo però, complessivamente è stato osservato un numero in percentuale di piante sintomatiche significativamente superiore nella porzione non trattata rispetto a quella trattata.

Nel campo di Castelplanio, dove la pressione della malattia è risultata più importante rispetto a quella registrata a Osimo, un contenimento della malattia statisticamente significativo è stato osservato nei primi rilievi. Dopodiché, con il progredire della stagione, il livello della malattia tende ad uniformarsi tra le due tesi, suggerendo che la strategia saggiata abbia ritardato la manifestazione dei sintomi di alcune piante infette. Questo potrebbe essere dovuto alle continue precipitazioni verificatesi tra maggio e giugno che hanno favorito l'assorbimento dei prodotti distribuiti ed hanno favorito la loro traslocazione nei tessuti della pianta. Inoltre, la presenza dei funghi appartenenti al genere *Trichoderma* spp. e del batterio *Bacillus subtilis* all'interno dei prodotti sperimentati, per i quali è stata accertata la funzione antagonista verso i funghi patogeni del mal dell'esca, sia *in vitro* che *in vivo*, tramite i numerosi studi effettuati negli anni (Di Marco *et al.*, 2004; Di Marco e Osti, 2007; Fourie *et al.*, 2001; Fourie e Halleen, 2004, 2006; Pertot *et al.*, 2016; Halleen *et al.*, 2010; Kotze *et al.*, 2011; Schmidt *et al.*, 2011), dovrebbe aver contribuito alla riduzione iniziale dei sintomi. È probabile che anche gli altri microrganismi presenti nei formulati, per i quali non ci sono ancora degli studi scientifici, svolgano un'azione antagonista contro i funghi del mal dell'esca in quanto la loro efficacia è stata dimostrata contro altri funghi patogeni. Anche la distribuzione del calcio (che è stato utilizzato in miscela con il magnesio per mantenere stabile il rapporto Ca/Mg) potrebbe aver influito sulla manifestazione dei sintomi (Calzarano *et al.* 2018). Si presume che questa miscela di nutrienti abbia un impatto positivo sull'aumento delle fitoalessine nelle foglie in un complesso meccanismo di risposta di difesa delle piante. In particolare, il calcio potrebbe svolgere un ruolo importante nel ridurre la risposta ossidativa della pianta (Lima *et al.*, 2012). Il calcio penetra nei tessuti fogliari in associazione con le alghe (le quali agiscono da trasportatrici) e può favorire l'accumulo di calmodulina che regola l'acido salicilico e innesca reazioni di difesa delle piante e riduzioni delle risposte di ipersensibilità (Lecourieux *et al.*, 2006; Du *et al.*, 2009).

In uno studio di Bruez *et al.* (2020) sul microbioma dei tessuti del legno delle viti non infette (10 anni di età) sono state identificate 515 unità tassonomiche operative fungine e 403 batteriche. L'ibridazione *in situ* ha dimostrato che questi funghi e batteri convivono nei tessuti legnosi della vite. Tuttavia, *P. chlamydospora*, è considerata la specie più abbondante nei tessuti legnosi di piante sane, tra quelle coinvolte nel

complesso del mal dell'esca, suggerendo un possibile comportamento endofitico non patogeno. Diversi studi hanno dimostrato che *P. chlamydospora* potrebbe passare da uno stile di vita endofitico a uno patogeno in risposta a fattori biotici e abiotici (Bertelli *et al.*, 1998; Pierron *et al.*, 2016). Da questi studi è emersa una ipotesi secondo la quale è l'associazione microbica tra *F. mediterranea* e *P. chlamydospora* a favorire lo sviluppo della carie bianca nel legno delle viti sane. Sarebbe opportuno studiare meglio la biologia dei principali agenti fitopatogeni coinvolti per mettere a punto formulazioni microbiche mirate per contenere le infezioni dovute all'azione di *F. mediterranea*, *P. chlamydospora* e *P. minimum* tramite esclusione competitiva. Un aspetto da considerare riguarda anche la composizione micorrizica delle piante, con le principali specie apparse più frequenti nelle piante sintomatiche (Landi *et al.*, 2021).

I vigneti coinvolti nella sperimentazione erano stati anche oggetto di un'indagine pluriennale condotta dall'Università Politecnica delle Marche sull'incidenza del mal dell'esca sul territorio regionale (Romanazzi *et al.*, 2009; Murolo e Romanazzi, 2014). Confrontando i rilievi di questa prova con quelli effettuati durante l'ultimo anno di monitoraggio (2021) si è cercato di valutare se i trattamenti effettuati potessero aver avuto un effetto sulla remissione dei sintomi nelle piante infette o sulla percentuale di nuove piante sintomatiche. Dal confronto effettuato, non sembra che i trattamenti del 2023 siano stati in grado di aumentare la percentuale di piante che cessano di manifestare i sintomi, o di ridurre la percentuale di nuove manifestazioni sintomatiche sulle piante risultate sane nel 2021.

Infine, vista la stagione particolarmente umida e piovosa, si è voluto valutare anche l'eventuale effetto collaterale della strategia nei confronti del mal dell'esca sulla peronospora della vite. A causa delle abbondanti precipitazioni primaverili, la malattia si è manifestata in maniera distruttiva, soprattutto nel vigneto di Osimo, dove a causa delle continue piogge è stato anche difficile intervenire tempestivamente. Anche su Verdicchio a Castelplanio c'è stato un forte attacco di peronospora, ma comunque decisamente meno impattante di quello osservato ad Osimo. In entrambi i siti sperimentali, la strategia saggiata per il mal dell'esca non sembra aver avuto un effetto sul contenimento della peronospora.

La strategia saggiata in questa sperimentazione, basata sull'uso di una serie di microrganismi e particolarmente innovativa a livello internazionale, ha consentito di

ridurre, anche se non sempre in maniera significativa, l'espressione dei sintomi di mal dell'esca in entrambi i campi sperimentali. In particolare, sulla *cv* Chardonnay sono state osservate riduzioni significative, rispetto alle piante non trattate, della gravità dei sintomi nel primo rilievo e della diffusione nel quarto rilievo. Su *cv* Verdicchio nei primi due rilievi sia la diffusione che l'intensità media ponderata della malattia sono risultate significativamente inferiori nei filari trattati rispetto a quelli non trattati, mentre nell'ultimo rilievo è stata osservata una riduzione statisticamente significativa solo della percentuale di piante infette nei filari trattati.

Nonostante i risultati promettenti osservati in questa prova, è doveroso considerare che il mal dell'esca è una malattia molto complessa e pertanto è difficile trarre delle conclusioni al primo anno di sperimentazione. Inoltre, i prodotti a base di microrganismi saggiati con lo scopo di creare competizione con gli agenti patogeni potrebbero aver bisogno di più tempo per esplicare al massimo la loro azione antagonista. Alla luce dei risultati ottenuti, è importante perseverare nella sperimentazione con prove di campo ripetute nel tempo, per poi procedere ad indagini su ampia scala, che coinvolgano diversi areali di produzione, vitigni, tecniche agronomiche e diversi livelli di malattia.

BIBLIOGRAFIA

- Andreini, L., Cardelli, R., Bartolini, S., Scalabrelli, G., Viti, R. (2014). Esca symptoms appearance in *Vitis vinifera* L.: influence of climate, pedoclimatic conditions and rootstock/cultivar combination. *Vitis*, 53, 33-38.
- Arantes, V., Jellison, J., Goodell, B. (2012). Peculiarities of brown-rot fungi and biochemical Fenton reaction with regard to their potential as a model for bioprocessing biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94, 323-338.
- Ari, M.E. (2000). A general approach for esca disease in the vineyards of Turkey. *Phytopathologia Mediterranea*, 39, 35-37.
- Bertelli, E., Mugnai, L., Surico, G. (1998). Presence of *Phaeoacremonium chlamydosporum* in apparently healthy rooted grapevine cuttings. *Phytopathologia Mediterranea*, 37, 79-82.
- Bigot, G., Sivilotti, P., Stecchina, M., Lujan, C., Freccero, A., Mosetti, D. (2020). Long-term effects of *Trichoderma asperellum* and *Trichoderma gamsii* on the prevention of esca in different vineyards of Northeastern Italy. *Crop Protection*, 137, 105264
- Borgo, M. (2016). *Avversità della vite - Parte Prima*. Gianni Sartori, 141-154.
- Bruetz, E., Lecomte, P., Grosman, J., Doublet, B., Bertsch, C., Fontaine, F., Ugaglia, A., Teissedre, P.L., Da Costa, J.P., Guerin-Dubrana, L., Rey, P. (2013). Overview of grapevine trunk diseases in France in the 2000s. *Phytopathologia Mediterranea*, 52, 262–275.
- Bruetz, E., Larignon, P., Compant, S., Rey, P. (2017). Investigating the durable effect of the hot water treatment used in nurseries on pathogenic fungi inhabiting grapevine wood and involved in Grapevine Trunk Diseases. *Crop Protection*, 100, 203-210.
- Bruetz, E., Vallance, J., Gautier, A., Laval, V., Compant, S., Maurer, W., Sessitsch, A., Lebrun, M. H., Rey, P. (2020). Major changes in grapevine wood microbiota are associated with the onset of esca, a devastating trunk disease. *Environmental Microbiology*, 22, 5189-5206.
- Bruno, G., Sparapano, L. (2006). 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.

- Calzarano, F., Amalfitano, C., Seghetti, L., Cozzolino, V. (2009). Nutritional status of vines affected with esca proper. *Phytopathologia Mediterranea*, 48, 20–31.
- Calzarano, F., Di Marco, S., D’Agostino, V., Schiff, S., Mugnai, L. (2014). Grapevine leaf stripe disease symptoms (esca complex) are reduced by a nutrients and seaweed mixture. *Phytopathologia Mediterranea* 53, 543–558.
- Calzarano, F., Di Marco, S. (2018). Further evidence that calcium, magnesium and seaweed mixtures reduce grapevine leaf stripe symptoms and increase grape yields. *Phytopathologia Mediterranea*, 57, 459–471.
- Calzarano, F., Osti, F., Baranek, M., Di Marco, S. (2018). Rainfall and temperature influence expression of foliar symptoms of grapevine leaf stripe disease (esca complex) in vineyards. *Phytopathologia Mediterranea*, 57, 488-505.
- Calzarano, F., Pagnani, G., Pisante, M., Bellocchi, M., Cillo, G., Metruccio, E G., Di Marco, S. (2021). Factors involved on tigerstripe foliar symptom expression of esca of grapevine. *Plants*, 10, 1041.
- Camps, C., Kappel, C., Lecomte, P., Léon, C., Gomès, E., Coutos-Thévenot, P., Delrot, S. (2010). A transcriptomic study of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Cabernet-Sauvignon) interaction with the vascular ascomycete fungus *Eutypa lata*. *Journal of Experimental Botany*, 61, 1719-1737.
- Cobos, R., Martin, M. T. (2007). Identification of fungi associated with grapevine decline in Castilla y León (Spain). *Phytopathologia Mediterranea*, 1000-1008.
- Cobos, R., Mateos, R. M., Alvarez-Perez, J.M., Olego, M. A., Sevillano, S., Gonzalez-Garcia, S., Garzon-Jimeno, E., Coque, J.J.R. (2015). Effectiveness of natural antifungal compounds in controlling infection by grapevine trunk disease pathogens through pruning wounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 6474-6483.
- Cottral, E., Pascoe, I. (2000). Developments in grapevine trunk diseases research in Australia. *Phytopathologia Mediterranea*, 39, 68-75.
- 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.

- Damm, U., Fourie, P. (2005). A cost-effective protocol for molecular detection of fungal pathogens in soil: research in action. *South African Journal of Science*, 101, 135-139.
- Dewasme, C., Mary, S., Darrieutort, G., Roby, J. P., Gambetta, G. A. (2022). Long-term esca monitoring reveals disease impacts on fruit yield and wine quality. *Plant Disease*, 106, 3076-3082.
- Di Marco, S., Cesari, A., Osti, F. (2004). Experiments on the control of esca by *Trichoderma*. *Phytopathologia Mediterranea*, 43, 108-115.
- 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. (2009). Effect of biostimulant sprays on *Phaeomoniella chlamydospora* and esca proper infected vines under greenhouse and field conditions. *Phytopathologia Mediterranea*, 48, 47-58.
- Di Marco, S., Osti, F., Bossio, D., Nocentini, M., Cinelli, T., Calzarano, F., Mugnai, L. (2019). Electrolyzed acid water: A clean technology active on fungal vascular pathogens in grapevine nurseries. *Crop Protection*, 119, 88-96.
- Du, L., Ali, G. S., Simons, K. A., Hou, J., Yang, T., Reddy, A. S. N., Poovaiah, B. W. (2009). Ca^{2+} /calmodulin regulates salicylic-acid-mediated plant immunity. *Nature*, 457, 1154-1158.
- Elena, G., Luque, J. (2016). Seasonal susceptibility of grapevine pruning wounds and cane colonization in Catalonia, Spain following artificial infection with *Diplodia seriata* and *Phaeomoniella chlamydospora*. *Plant Disease*, 100, 1651-1659.
- Eskalen, A., Gubler, W. D., Khan, A., (2001). Rootstock susceptibility to *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* spp. *Phytopathologia Mediterranea*, 40, S433-S438.
- 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 *Phaeomoniella chlamydospora*. *Plant Disease*, 91, 1100-1104.
- Evidente, A., Bruno, G., Andolfi, A., Sparapano, L. (2000). Two naphthalenone pentakides from liquid cultures of *Phaeoacremonium aleophilum*, a fungus associated with esca of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea*, 1000-1007.

- Evidente, A., Peduto, F., Andolfi, A., Marchi, G., Mugnai, L., Surico, G. (2010). Fattori di virulenza dei funghi dell'esca. Fitotossine di *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum* e *Fomitiporia mediterranea*: produzione e attività biologica. *Il Mal dell'Esca della Vite, Interventi di ricerca e sperimentazione per il contenimento della malattia, Progetto MESVIT*, 214-218.
- Feliciano, A. J., Gubler, W. D. (2001). Histological investigations on infection of grape roots and shoots by *Phaeoacremonium* spp. *Phytopathologia Mediterranea*, S387-S393.
- Feliciano, A. J., Eskalen, A., Gubler, W. D., (2004). Differential susceptibility of three grapevine cultivars to *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeomoniella chlamydospora* in California. *Phytopathologia Mediterranea*, 1000-1004.
- Fischer, M., Ashnaei, S. P. (2019). Grapevine, esca complex, and environment: the disease triangle. *Phytopathologia Mediterranea*, 58, 17-37.
- Foglia, R., Landi, L., Romanazzi, G. (2022). Analyses of xylem vessel size on grapevine cultivars and relationship with incidence of esca disease, a threat to grape quality. *Applied Sciences*, 12(3), 1177.
- Fontaine, F., El Hamss, H., Amiri, S., Lahlali, R., Barka, E. A. (2022). A panoramic view on grapevine trunk diseases threats: case of *Eutypa dieback*, *Botryosphaeria dieback*, and esca disease. *Journal of Fungi*, 8, 595.
- Fontaine, F., Gramaje, D., Armengol, J., Smart, R., Nagy, Z. A., Borgo, M., Rego, C., Corio-Costet, M.F. (2016). Grapevine trunk diseases. *A review. OIV Publications*.
- Fourie, P. H., Vyver, J., Schreuder, W., Halleen, F. (2001). Effect of *Trichoderma* treatments on the occurrence of decline pathogens in the roots and rootstocks of nursery grapevines. *Phytopathologia Mediterranea*, 40, 473-478.
- Fourie, P.H., Halleen, F. (2004). Occurrence of grapevine trunk disease pathogens in rootstock mother plants in South Africa. *Australasian Plant Pathology*, 33, 313–315.
- Fourie, P. H., Halleen, F. (2004a). 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*, 116, 255-265.

- Gams, W., Crous, P. W. (2000). “*Phaeomoniella chlamydospora*” gen. et comb. nov., a causal organism of Petri grapevine decline and esca. “*Phaeomoniella chlamydospora*”. *Phytopathologia Mediterranea*, 39, 112-118.
- Goodell, B. (2020). Fungi involved in the biodeterioration and bioconversion of lignocellulose substrates. *Genetics and Biotechnology*, 369-397.
- Gramaje, D., Aroca, Á., Raposo, R., García-Jiménez, J., Armengol, J. (2009). Evaluation of fungicides to control Petri disease pathogens in the grapevine propagation process. *Crop Protection*, 28, 1091–1097.
- 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.
- Grosman, J., Doublet, B. (2012). Maladie du bois de la vigne synthèse des dispositifs d’observation au vignoble, de l’observation 2003-2008 au réseau d’épidémiologie surveillance actuel. *Phytomala Défense des Végétaux*, 651, 31-35.
- Halleen, F., Crous, R. W., Petrin, 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., Fourie, P. H., Lombard, P. J. (2010). Protection of grapevine pruning wounds against *Eutypa lata* by biological and chemical methods. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 31, 125-132.
- Harborne, J. B. (1983). Toxins of plant-fungal interactions. *Plant and Fungal Toxins*, 1, 762.
- Hess, J., Balasundaram, S. V., Bakkemo, R. I., Drula, E., Henrissat, B., Högberg, N., Eastwood, D., Skrede, I. (2021). Niche differentiation and evolution of the wood decay machinery in the invasive fungus *Serpula lacrymans*. *The ISME Journal*, 15, 592-604.
- Hofstetter, V., Buyck, B., Croll, D., Viret, O., Couloux, A., Gindro, K. (2012). What if esca disease of grapevine were not a fungal disease? *Fungal Diversity*, 54, 51-67.
- Kenfaoui, J., Radouane, N., Mennani, M., Tahiri, A., El Ghadraoui, L., Belabess, Z., Fontaine, F., El Hamss, H., Amiri, S., Lahlali, R., Barka, E. A. (2022). A panoramic view on grapevine trunk diseases threats: Case of *Eutypa dieback*, *Botryosphaeria dieback*, and esca disease. *Journal of Fungi*, 8, 595.

- Kotze, C., Van Niekerk, J., Mostert, L., Halleen, F., Fourie, P. (2011). Evaluation of biocontrol agents for grapevine pruning wound protection against trunk pathogen infection. *Phytopathologia Mediterranea*, 50, S247-S263.
- Lambert, C., Bisson, J., Waffo-Téguo, P., Papastamoulis, Y., Richard, T., Corio-Costet, MF, Mérillon, JM., Cluzet, S. (2012). Phenolics and their antifungal role in grapevine wood decay: focus on the *Botryosphaeriaceae* family. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 11859-11868.
- Landi, L., Murolo, S., Romanazzi, G. (2012). Colonization of *Vitis* spp. wood by sGFP-transformed *Phaeoconiella chlamydsopora*, a tracheomycotic fungus involved in esca disease. *Phytopathology*, 102, 290-297.
- Landi, L., Foglia, R., Murolo, S., Romanazzi, G. (2021). The mycorrhizal status in vineyards affected by esca. *Journal of Fungi*, 7(10), 869.
- Larignon, P, Dubos B (1997). Fungi associated with esca disease in grapevine. *European Journal of Plant Pathology*, 103, 147-157.
- Larignon, P., Froidefond, G., Dubos, B. (1999). Premiers resultats concernant la biologie des *Phaeoacremonium*. *IOBC WPRS BULLETIN*, 23, 75-76.
- Larignon, P., Dubos, B. (2001). Black dead arm a new disease not to be confused with esca. *Phytoma*, 538, 26-29.
- Larignon, P. Darné, G., Ménard, E., Desaché F., Dubos, B. (2008). Comment agissait l'arsénite de sodium sur l'esca de la vigne? *Progrès Agricole et Viticole* 125, 642–651.
- Larignon, P., Fontaine, F., Farine, S., Clément, C., Bertsch, C. (2009). Esca et black dead arm: deux acteurs majeurs des maladies du bois chez la vigne. *Comptes Rendus Biologies*, 332, 765-783.
- Leathers, T. D. (2002). Pullulan. *Biopolymers*, 6, 1-35.
- Lecomte, P., Diarra, B., Carbonneau, A., Rey, P., Chevrier, C. (2018). Esca of grapevine and training practices in France. *Phytopathologia Mediterranea*, 57, 472-487.
- Lecourieux, D., Ranjeva, R., Pugin, A. (2006). Calcium in plant defence-signalling pathways. *New Phytologist* 171, 249–269.
- Lima, M. R., Ferreres, F., Dias, A. C. (2012). Response of *Vitis vinifera* cell cultures to *Phaeoconiella chlamydsopora*: changes in phenolic production, oxidative state

- and expression of defence-related genes. *European Journal of Plant Pathology*, 132, 133-146.
- Lorenz, D. H., Eichhorn, K. W., Bleiholder, H., Klose, R., Meier, U., Weber, E. (1994). Phänologische Entwicklungsstadien der Weinrebe (*Vitis vinifera* L. ssp. *vinifera*). Codierung und Beschreibung nach der erweiterten BBCH-Skala. *Wein-Wissenschaft*, 49, 66-70.
- Luque, J., Elena, G., Garcia-Figueres, F., Reyes, J., Barrios, G., Legorburu, F. J. (2014). Natural infections of pruning wounds by fungal trunk pathogens in mature grapevines in Catalonia (Northeast Spain). *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 20, 134-143.
- Marchi, G. (2001). Susceptibility to esca of various grapevine (*Vitis vinifera*) cultivars grafted on different rootstock in a vineyard in the Province of Siena (Italy). *Phytopathologia Mediterranea*, 1000-1010.
- Martín, L., Martín, M.T. (2013). Characterization of fungicide resistant isolates of *Phaeoacremonium aleophilum* infecting grapevines in Spain. *Crop Protection*, 52, 141–150.
- Martín, L., Millán, A., Castaño, F. J., Fontaine, F. (2023). Deciphering chitosan–host plant interaction in esca disease. *Agronomy*, 13, 1290.
- McKinney, H. H. (1923). A new system of grading plant diseases. *Journal of Agricultural Research*, 26, 195-218.
- McWain, P., Gregory, G.F. (1972). A neutral mannan from *Ceratocystis fagacearum* culture filtrate. *Phytochemistry*, 11.
- Minervini G., Cortesi P., Betto A., Braccini P., Culatti P., D’Onofrio V., Guidotti V., Ricciolini M., Sancassani G.P., Bisiach M. (1997). Incidence of esca in Italian vineyards. *Proceedings 10th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union*, 1-5 June, Montpellier, France, 61-66.
- Mondello, V., Songy, A., Battiston, E., Pinto, C., Coppin, C., Trotel-Aziz, P., Clément, C., Mugnai, L., Fontaine, F. (2018). Grapevine trunk diseases: a review of fifteen years of trials for their control with chemicals and biocontrol agents. *Plant Disease*, 102, 1189–1217.
- Moretti, S., Pacetti, A., Pierron, R., Kassemeyer, H. H., Fischer, M., Péros, J. P., Perez-Gonzalez, G., Bieler, E., Schilling, M., Di Marco, S., Gelhaye, E., Mugnai, L.,

- Bertsch, C., Farine, S. (2021). *Fomitiporia mediterranea* M. Fisch., the historical esca agent: A comprehensive review on the main grapevine wood rot agent in Europe. *Phytopathologia Mediterranea*, 60, 351-379.
- Mostert, L., Groenewald, J. Z., Summerbell, R. C., Gams, W., Crous, P. W. (2006). Taxonomy and pathology of *Togninia* (*Diaporthales*) and its *Phaeoacremonium* anamorphs. *Studies in Mycology*, 54, 1-113.
- Mounier, E., Bouliset, F., Cortes, F., Cadiou, M. (2016). Esquive Wp limits development of grapevine trunk diseases and safeguards the production potential of vineyards. *Biocontrol of major grapevine disease: leading research*, 160-170.
- Moyo, P., Allsopp, E., Roets, F., Mostert, L., Halleen, F. (2014). Arthropods vector grapevine trunk disease pathogens. *Phytopathology*, 104, 1063-1069.
- 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. (1999). Il mal dell'esca della vite. *L'informatore Agrario*, 15, 77-81.
- Mugnai, L., Guiggiani, M., Bazzo, F., Marchi, G., Surico G. (2010). Il mal dell'esca e la carie bianca del legno: agenti causali, sintomatologia e casi studio di esca giovane. *Il Mal dell'esca della vite, interventi di ricerca e sperimentazione per il contenimento della malattia, Progetto MESVIT*, 65-88.
- Mugnai, L. (2021). Malattie del legno della vite. *Patologia vegetale*, EdiSES Edizioni, Napoli.
- Mullins, M. G., Bouquet, A., Williams, L. E. (1992). Biology of the grapevine. *Cambridge University Press*, 52-54.
- Murolo, S., Romanazzi, G. (2014). Effects of grapevine cultivar, rootstock and clone on esca disease. *Australasian Plant Pathology*, 43, 215-221.
- Palliotti, A., Poni, S., Silvestroni, O. (2018). *Manuale di viticoltura*. Edagricole.
- Parrini, C., Pandolfo, FM (1990). Malattie della vite e loro controllo nei vigneti della Toscana. *Difesa delle Piante*, 13, 113-129.
- Perez-Gonzalez, G., Sebestyen, D., Petit, E., Jellison, J., Mugnai, L., Gelhaye, E., Lee, E., Farine, S., Bertsch, F., Goodell, B. (2022). Oxygen radical-generating metabolites secreted by *Eutypa* and esca fungal consortia: understanding the mechanisms behind grapevine wood deterioration and pathogenesis. *Frontiers in Plant Science*, 13, 921961.

- Pertot, I., Prodorutti, D., Colombini, A., Pasini, L. (2016). *Trichoderma atroviride* SC1 prevents *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* infection of grapevine plants during the grafting process in nurseries. *BioControl*, 61, 257-267.
- Pierron, R., Pouzoulet, J., Couderc, C., Judic, E., Compant, S., and Alban, J. (2016) Variations in early response of grapevine wood depending on wound and inoculation combinations with *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeomoniella chlamydospora*. *Frontiers in Plant Science*, 7, 268.
- Pouzoulet, J., Jacques, A., Besson, X., Dayde, J., Mailhac, N. (2013). Histopathological study of response of *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon to bark and wood injury with and without inoculation by *Phaeomoniella chlamydospora*. *Phytopathologia Mediterranea*, 313-323.
- Pratt, C. (1974). Vegetative anatomy of cultivated grapes - a review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 25, 131-150.
- Reggiori, F., Aloï, C., Baleani, M., Benanchi, M., Bigot, G., Bortolotti, P., Bossion, D., Cotromino, M., Marco, S., Faccini, F., Freccero, A., Osti, F., Montermini, A., Nannini, R., Mugnai, L. (2014). Remedier (*Trichoderma asperellum* e *Trichoderma gamsii*): una nuova opportunità per controllare il complesso della malattia dell'esca. Risultati quadriennali delle prove sul campo in Italia. *Atti Giornate Fitopatologiche*, 2, 363-372.
- Rego C., Nascimento, T., Cabral, A., Oliveira H. (2005). Fungi associated with young vine decline in Portugal: results of nine years surveys. *OILB WPRS Bulletin*, 29, 123-126.
- Retief, E., McLeod, A., Fourie, P. H. (2006). Potential inoculum sources of *Phaeomoniella chlamydospora* in South African grapevine nurseries. *European Journal of Plant Pathology*, 115, 331-339.
- Ridgway, H.J., Baskarathevan, J., Amponsah, N., Jaspers, M.V., Jones, E.E. (2014). The identity, distribution and diversity of botryosphaeriaceous species in New Zealand vineyards – a national perspective. *Phytopathologia Mediterranea*, 53, 565.
- Rolshausen, P. E., Greve, L. C., Labavitch, J. M., Mahoney, N. E., Molyneux, R. J., Gubler, W. D. (2008). Pathogenesis of *Eutypa lata* in grapevine: identification of

- virulence factors and biochemical characterization of cordon dieback. *Phytopathology*, 98, 222-229.
- 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., Santomauro, A., Brunelli, A., Faretra, F., (2016). Innovazioni nella protezione dalle malattie. In: *La nuova viticoltura*, 483-516.
- Rubio, J.J., Garzón, E. (2011). “Las enfermedades de madera de vid como amenaza del sector vitícola”. *Revista Winetech, Noviembre*, 18-21.
- Rudolph, K. W. E., Gross, M., Neugebauer, M., Hokawat, S., Zachowski, A., Wydra, K., Klement, Z. (1989). Extracellular polysaccharides as determinants of leaf spot diseases caused by pseudomonads and xanthomonads. In: *Phytotoxins and Plant Pathogenesis*. Springer Berlin Heidelberg, 177-218.
- Schmidt, C. S., Lorenz, D., Wolf, G. A. (2001). Biological control of the grapevine dieback fungus *Eutypa lata* I: screening of bacterial antagonists. *Journal of Phytopathology*, 149, 427-435.
- Serra, S., Mannoni, M. A., Ligios, V. (2008). Studies on the susceptibility of pruning wounds to infection by fungi involved in grapevine wood diseases in Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, 47, 234-246.
- Siebert, J.B. (2001). *Eutypa*: The economic toll on vineyards. *Wines and Vines*, 50-56.
- Smart, R. (2015). Trunk diseases: Timely trunk renewal to overcome trunk disease. *Wine and Viticulture Journal*, 30, 44.
- Sofia, J. (2018). Esca complex in the Dão wine region (Portugal) [*PhD Thesis Universidade de Coimbra*].
- Sosnowski, M.R., Loschiavo, M.L. Wicks, T.J., Lardner, R., and Scott, E.S. (2013). Evaluating treatments and spray application for the protection of grapevine pruning wounds from infection by *Eutypa lata*. *Plant Disease*, 97, 1599-1604.
- Sosnowski M., Ayres, M., Wicks, T., Scott, E. (2013). Optimising management of *Eutypa dieback*. *South Australian Research and Development Institute*, 55.
- Sparapano, L., Bruno, G., Ciccarone, C., Graniti, A. (2000). 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., Campanella, A., Bruno, G. (2001). Interactions between three fungi associated with esca of grapevine, and their secondary metabolites. *Phytopathologia Mediterranea*, 1000-1006.
- Surico, G., Marchi, G., Braccini, P., Mugnai, L. (2000). Epidemiology of esca in some vineyards in Tuscany (Italy). *Phytopathologia Mediterranea*, 39, 190-205.
- Surico G., Mugnai L., 2001. Sulla presenza di venature brune della vite. *L'Informatore Fitopatologico* 5, 22-26.
- Surico, G., Marchi, G., Mugnai, L. (2006). Older and more recent observations on esca: A critical overview. *Phytopathologia Mediterranea*, 1000–1019.
- Surico, G. (2009). Towards a redefinition of the diseases within the esca complex. *Phytopathologia Mediterranea*, 48, 5–10.
- Surico, G., Marchi, G., Mugnai, L., Peduto, F. (2010). Espressione dei sintomi fogliari dell'esca in funzione della disponibilità di acqua nel suolo e germogliamento delle gemme. Il Mal dell'Esca della Vite: Interventi di ricerca e Sperimentazione per il Contenimento della Malattia. *Atti Progetto MesVit*, 276-291.
- Tabacchi, R., Dubin, G. M., Fkyera, A., Poliart, C. (2000). Phytotoxins from fungi of esca of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea*, 39, 156-161.
- Valtaud, C., Larignon, P., Roblin, G., Fleurat-Lessard, P. (2009). Developmental and ultrastructural features of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* in relation to xylem degradation in esca disease of the grapevine. *Journal of Plant Pathology*, 37-51.
- Van den Bosch, M. E., Cecilia, C., Escoriaza, G., Gatica, M. (2011). Evaluación económica de la reposición de plantas afectadas por hoja de malvón en viñedos de la provincia de Mendoza. *3er Congreso Regional de Economía Agraria XLII Reunión Anual de la Asociación Argentina de Economía Agraria Valdivia Chile*.
- Whiteman, S. A., Jaspers, M. V., Stewart, A., Ridgway, H. J. (2002). Detection of *Phaeomoniella chlamydospora* in soil using species-specific PCR. *New Zealand Plant Protection*, 55, 139-145.

- Xu, G., Goodell, B. (2001). Mechanisms of wood degradation by brown-rot fungi: chelator-mediated cellulose degradation and binding of iron by cellulose. *Journal of Biotechnology*, 87, 43-57.
- Yacoub, A., Gerbore, J., Magnin, N., Chambon, P., Dufour, M.C., Corio-Costet, M.F., Rey, P. (2016). Ability of *Pythium oligandrum* strains to Protect *Vitis vinifera* L., by inducing plant resistance against *Phaeomoniella chlamydospora*, a pathogen involved in esca, a grapevine trunk disease. *Biological Control*, 92, 7–16.

Sitografia

<http://www.winetwork-data.eu/intranet/libretti/0/libretto15549-01-1.pdf>

<https://enoviti-hanumangirl.blogspot.com/2021/04/grapevine-trunk-diseases-esca.html>

<https://prever.edu.it/comprever/salabar/vini-delle-marche/>

<https://agronotizie.imaginenetwork.com/difesa-e-diserbo/2020/11/03/mal-dell-esca-e-se-i-funghi-patogeni-sono-gia-nelle-barbatelle/68241>

<http://www.ersa.fvg.it/export/sites/ersa/aziende/informazione/notiziario/allegati/2016/1/Il-mal-dellesca.pdf>

[https://www.quattroclici.it/articoli/superficie-vitata-in-italia-suddivisa-per-vitigno/#:~:text=La%20superficie%20vitata%20totale%20in,equivalente%20\(49%2F51%25\).](https://www.quattroclici.it/articoli/superficie-vitata-in-italia-suddivisa-per-vitigno/#:~:text=La%20superficie%20vitata%20totale%20in,equivalente%20(49%2F51%25).)

<http://dati.istat.it/Index.aspx?QueryId=33706>

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il Professor Gianfranco Romanazzi per la sua dedizione alla ricerca, grazie alla quale è stato possibile ottenere maggiori informazioni utili a questo studio.

Ringrazio la Ricercatrice Marwa Moumni per avermi indirizzato nella stesura di questa tesi sperimentale.

Ringrazio il Dottorando Simone Piancatelli per il suo prezioso contributo nella stesura di questa tesi sperimentale.

Ringrazio il Professor Costantino Vischetti e la Dottoressa De Bernardis per l'esecuzione delle analisi dei terreni.

Un ringraziamento speciale va alla mia famiglia che mi ha sempre sostenuta nei momenti più difficili di questo lungo percorso.

Infine, ringrazio il Professor De Ales Luigi che, con la sua ricerca di oltre 50 anni, ha dato vita ad un progetto indispensabile all'agricoltura a livello mondiale.