

## Aspetti epidemiologici ed ecofisiologici del 'mal dell'esca' in cultivar di *Vitis vinifera* L. in Puglia

G.L. Bruno, M. Vendemia, A.D. Marsico, F. Tommasi

**Riassunto** – Il 'mal dell'esca' è tra le malattie della vite più studiate e discusse con forti ripercussioni sulla carriera produttiva delle piante. È un complesso di malattie diverse: venature brune delle barbatelle, malattia di Petri, esca giovane, esca propria e apoplezia che condividono la presenza nel legno di *Phaeoconiella chlamydospora* (Pch), *Phaeoacremonium aleophilum* (Pal) e *Fomitiporia mediterranea*. Il presente lavoro riporta i risultati preliminari di una indagine su piante di *Vitis vinifera* L. di quattro cultivar (Autumn Royal, Red Italia, Sublima e Summer Royal) coltivate a tendone irriguo, al fine di chiarire il ruolo di alcuni parametri fisiologici nella comparsa dei sintomi fogliari. In giugno, luglio e agosto 2018, sono state prelevate foglie visivamente sane e, quando presenti, foglie con sintomi. Nelle foglie, sono stati valutati lo stato di integrità delle membrane, come perdita di elettroliti e contenuto in malondialdeide, prodotto finale della perossidazione dei lipidi di membrana, e la presenza di scitalone, isosclerone e pullulano, metaboliti prodotti da Pch e Pal. Nelle quattro cultivar, le foglie con sintomi hanno evidenziato danni alle membrane e maggiori concentrazioni di isosclerone, scitalone e pullulano rispetto a quelle visivamente sane. Questi metaboliti, prodotti nel legno infetto, traslocati e accumulati nelle foglie, potrebbero essere la causa delle alterazioni biochimiche e fisiologiche che, compromettendo l'integrità delle membrane cellulari, porteranno ai sintomi fogliari.

**Parole chiave:** isosclerone, perdita elettroliti, perossidazione lipidi, pullulano, scitalone, venature brune

### Introduzione

Il 'mal dell'esca' della vite è un complesso di almeno sei malattie, contemporaneamente associate o espresse in tempi differenti, caratterizzate da sintomi diversi e causate da un variegato gruppo di funghi. *Venature (striature) brune delle barbatelle*, evidenti in sezione longitudinale e che appaiono come punteggiature nere variamente distribuite sulla superficie della sezione trasversale. *Malattia di Petri ('black goo', Slow dieback o Phaeoacremonium grapevine decline)*, caratterizzata da deperimento generale di giovani piante (2-7 anni) con fuoriuscita di essudati a consistenza gommosa e catramosa dai tagli trasversali, clorosi fogliare e graduale declino della produttività. *Esca giovane*, tipica dei vitigni con età superiore ai 2-3 anni, contraddistinta dalla comparsa di 'tiger-stripes' fogliari, striature/punteggiature brune del legno, ritardo vegetativo e aree puntiformi ('black measles') sulle bacche. *Carie bianca del legno*, tipica di piante adulte (oltre 8 anni), si mostra come marciume secco a consistenza friabile che può raggiungere il ritidoma ('mal dello spacco'). *Apoplezia*, che descrive l'improvviso avvizzimento di germogli, branche o di tutta la parte aerea nei periodi più caldi della stagione vegetativa. *Esca propria*, caratterizzata dalla presenza, nello stesso vitigno, di sintomi fogliari dell'esca giovane, venature brune e carie bianca del legno (Mugnai et al. 1999, Graniti et al. 2000, Surico et al. 2008, 2010, Mondello et al. 2018). Ai sintomi di venature brune e malattia di Petri sono associati *Phaeoacremonium aleophilum* W. Gams, Crous, M.J. Wingf. & Mugnai [Teleomorfo: *Togninia minima* (Tul. & C. Tul.) Berl.], altre specie di *Phaeoacremonium* e *Phaeoconiella chlamydospora* (W. Gams, Crous, M.J. Wingf. & Mugnai) Crous & W. Gams. Agenti di carie del legno sono *Fomitiporia punctata* (Fr.) Murrill e, negli ambienti mediterranei, *F. mediterranea* Fisher (Larignon, Dubos 1997, Crous, Gams 2000, Fischer 2002, Mostert et al. 2006a,b). Metaboliti secondari fitotossici caratterizzano i fattori di virulenza di questi funghi. In particolare, due pentacetidi naftalenonici (scitalone e isosclerone) e pullulano sono prodotti *in vitro* e *in planta* da *Pa. chlamydospora* e *Pm. aleophilum* (Evidente et al. 2000, Tabacchi et al. 2000, Abou-Mansour et al. 2004, Bruno, Sparapano 2006, Bruno et al. 2007, Andolfi et al. 2011).

Scopo di questo lavoro è dare un primo contributo al ruolo che alcuni parametri fisiologici hanno nella comparsa dei sintomi fogliari del 'mal dell'esca', e di suggerire potenziali marcatori in grado di evidenziare precocemente la malattia anche in piante apparentemente sane, facilitando così l'applicazione delle più opportune strategie di lotta.

### Materiali e Metodi

Osservazioni e prelievi di foglie sono stati effettuati presso il campo collezione del Centro di ricerca Viticoltura ed Enologia di Turi (BA). Tra i 728 vitigni (16 cultivar) presenti nel tendone irriguo impiantato nel 1994 con sesto 2,5 × 2,5 m, sono state utilizzate due piante di 'Autumn Royal', 'Red Italia', 'Sublima' e 'Summer Royal' naturalmente infette da *Pa. chlamydospora*, *Pm. aleophilum* e *F. mediterranea*. Il 20 giugno, 12 luglio e 7 agosto 2018 da ciascuna delle 8 piante sono state prelevate 10 foglie asintomatiche e, quando presenti, 10 foglie con sintomi di clorosi, arrossamenti o 'tiger-stripes'. Le foglie raccolte sono state immediatamente riposte in box-frigo ed ivi mantenute sino al ritorno in laboratorio. Tutte le foglie sono state private del picciolo e fotografate. L'eventuale danno alle membrane è stato valutato come perdita percentuale di elettroliti (PE) (Bajji et al. 2002) e come quantità di malondialdeide (MDA), prodotto finale della perossidazione dei lipidi di membrana (Heath,

Packer 1968). Per ciascuna classe, due foglie sono state pesate, congelate a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  e liofilizzate. Aliquote di foglie liofilizzate sono state sospese in acetato di etile (rapporto 1:100; g/ml), mantenute in agitazione per 30 min e centrifugate ( $5.500\times g$ , 30 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). La parte liquida è stata eliminata in evaporatore rotante. Nel residuo secco è stata determinata la concentrazione di scitalone e isosclerone come proposto da Bruno, Sparapano (2006). L'estrazione e quantificazione del pullulano è stata effettuata come riportato da Bruno, Sparapano (2006). I valori percentuali (P) sono stati trasformati in gradi (Y) mediante la formula:  $Y = \arcsen\sqrt{(P/100)}$ . Dopo aver verificato l'assunto di normalità (test di Shapiro-Wilk:  $Pr < W < 0,0001$ ), i dati grezzi sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA). Le medie sono state separate in base al test di Tukey ( $P \leq 0,05$ ). È stato calcolato il coefficiente di correlazione di Pearson tra i parametri ecofisiologici considerati. I test statistici sopra descritti sono stati eseguiti utilizzando il software SAS 9.00.

## Risultati e Discussione

I vitigni di 'Summer Royal' e 'Autumn Royal' hanno manifestato arrossamenti internervali delle foglie in tutti e tre i prelievi effettuati, mentre 'Sublima' e 'Red Italia' hanno evidenziato sintomi fogliari solo nelle raccolte di luglio e agosto (Fig. 1). Nei prelievi effettuati nel mese di agosto su 'Sublima' erano presenti sintomi di apoplessia su alcune branche.

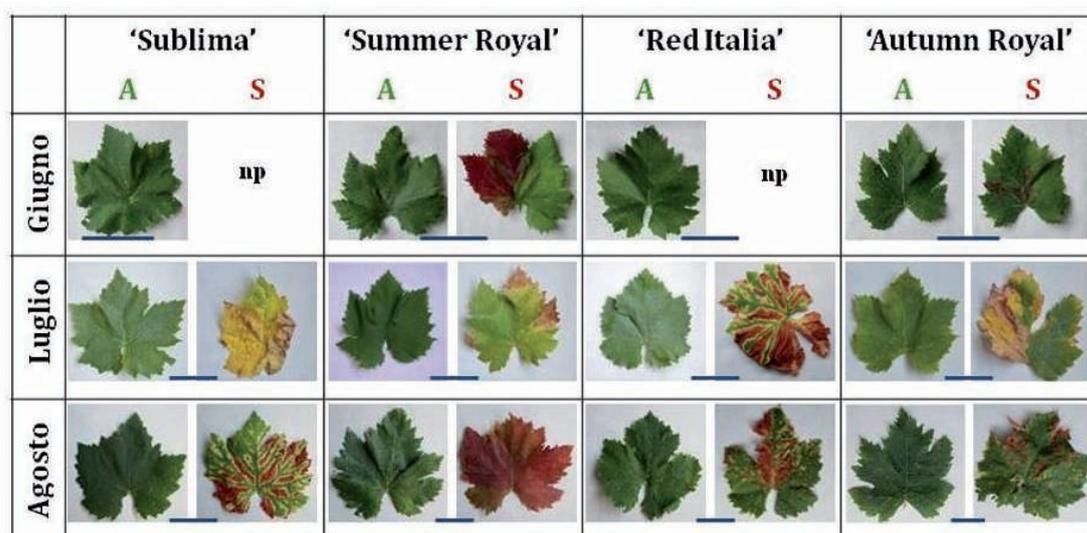


Fig. 1

Esempi di foglie visivamente normali (A) o con sintomi (S) raccolte in giugno, luglio e agosto 2018 da piante di 'Sublima', 'Summer Royal', 'Red Italia' e 'Autumn Royal'. Barra = 10 cm; np = tipologia di foglia non presente.

La perdita di elettroliti (Fig. 2) ha mostrato un generale incremento nelle foglie con sintomi (massimo 84% in 'Red Italia' e 'Autumn Royal') rispetto a quelle asintomatiche. Interessanti sono i valori riscontrati nelle foglie asintomatiche che, partendo da valori inferiori al 20% nelle raccolte di giugno e luglio, hanno raggiunto in agosto valori del 39 ('Summer Royal'), 53 ('Red Italia') e 61 % ('Autumn Royal').

Le concentrazioni di MDA (Fig. 3) registrate nelle foglie asintomatiche delle quattro cultivar sono risultate essere sempre inferiori rispetto a quelle presenti nelle foglie con sintomi. Le foglie asintomatiche di 'Sublima' hanno mostrato il maggior contenuto di MDA.

Solitamente, perdita di elettroliti e morte cellulare sono alterazioni fisiologiche che conducono alla necrosi dei tessuti vegetali (Agrios 2005, Taiz, Zeiger 2010).

Seppur con le dovute differenze legate alla cultivar ed al momento del campionamento, perdita di elettroliti e perossidazione dei lipidi di membrana caratterizzano lo stato fisiologico delle foglie con sintomi.

Scitalone, isosclerone e pullulano, metaboliti prodotti da *Pa. chlamydospora* e *Pm. aleophilum*, nelle foglie delle cultivar considerate sono risultati presenti in concentrazioni differenti (Fig. 4). In tutte le foglie in cui è risultato presente lo scitalone è stato riscontrato anche l'isosclerone. Nelle foglie con sintomi delle cvs Summer Royal e Autumn Royal, scitalone e isosclerone sono stati riscontrati in tracce ( $\leq 0,25\text{ }\mu\text{g g}^{-1}\text{ pf}$ ) nella raccolta di giugno e hanno raggiunto la massima concentrazione in agosto. In 'Red Italia' e 'Sublima' è stato possibile evidenziare queste due molecole solo nelle raccolte di luglio e agosto. In particolare, nelle foglie asintomatiche i due pentacetidi sono risultati presenti nelle raccolte di luglio ('Sublima', 'Red Italia' e 'Autumn Royal') e agosto (tutte e quattro le cultivar). Il pullulano, nelle foglie con sintomi è risultato essere presente in concentrazioni variabili da 0,5 ('Autumn Royal' in giugno) ai  $9,2\text{ }\mu\text{g g}^{-1}\text{ pf}$  ('Red Italia'). Questo polisaccaride è risultato presente anche

nelle foglie asintomatiche raccolte in giugno ('Red Italia'), luglio ('Sublima', 'Red Italia' e 'Autumn Royal') e agosto (tutte e quattro le cultivar).

Questi risultati confermano le capacità di *Pm. aleophilum* e di *Pa. chlamydospora* di produrre scitalone, isosclorene e pullulano *in planta* (Bruno, Sparapano 2007).

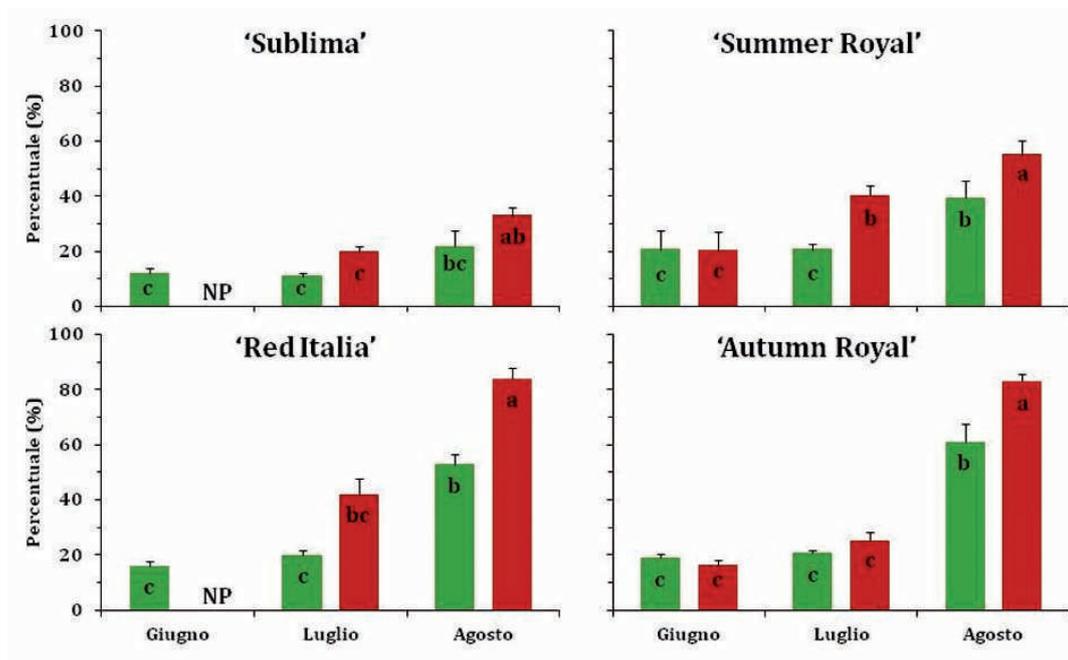


Fig. 2

Variazione della perdita percentuale di elettroliti in foglie visivamente 'normali' (■) o con sintomi (■) prelevate da piante di 'Sublima', 'Summer Royal', 'Red Italia' e 'Autumn Royal' raccolte in giugno, luglio e agosto 2018. Ciascun istogramma riporta la media di 6 valori  $\pm$  d.s. Per l'intera figura, istogrammi con la stessa lettera non sono significativamente differenti per il test di Tukey a  $P < 0,05$ . 'NP' = tipologia di foglia non presente.

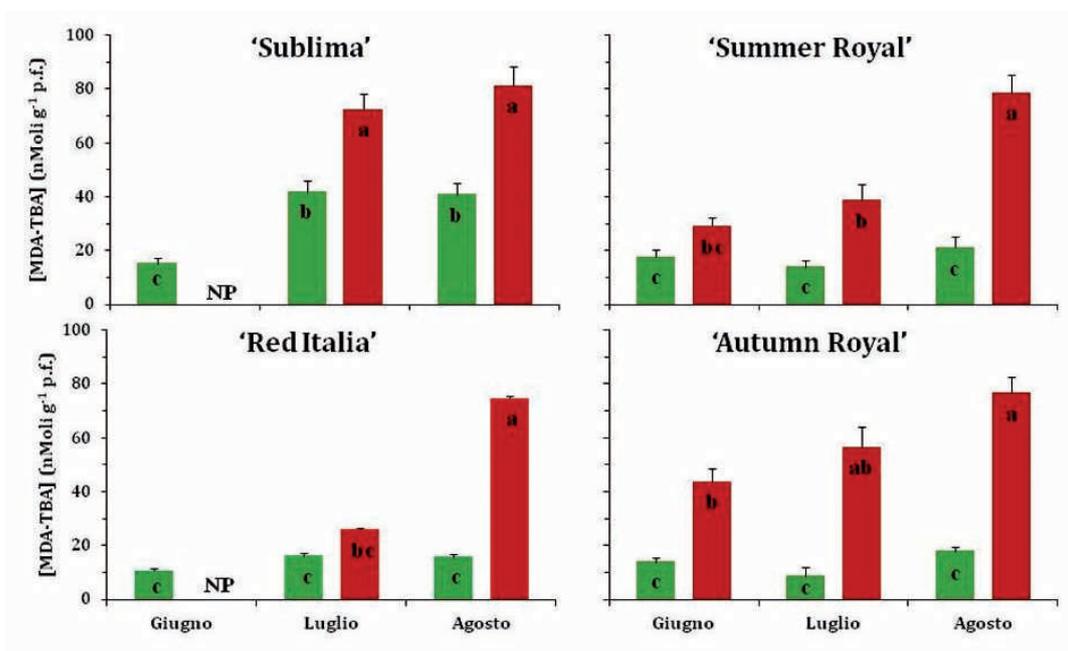


Fig. 3

Variazione del complesso MDA-TBA in foglie visivamente 'normali' (■) o con 'tiger-stripes' (■) raccolte da piante di 'Sublima', 'Summer Royal', 'Red Italia' e 'Autumn Royal' raccolte in giugno, luglio e agosto 2018. Ciascun istogramma riporta la media di 6 valori  $\pm$  d.s. Per l'intera figura, istogrammi con la stessa lettera non sono significativamente differenti per il test di Tukey a  $P < 0,05$ . 'NP' = tipologia di foglia non presente.

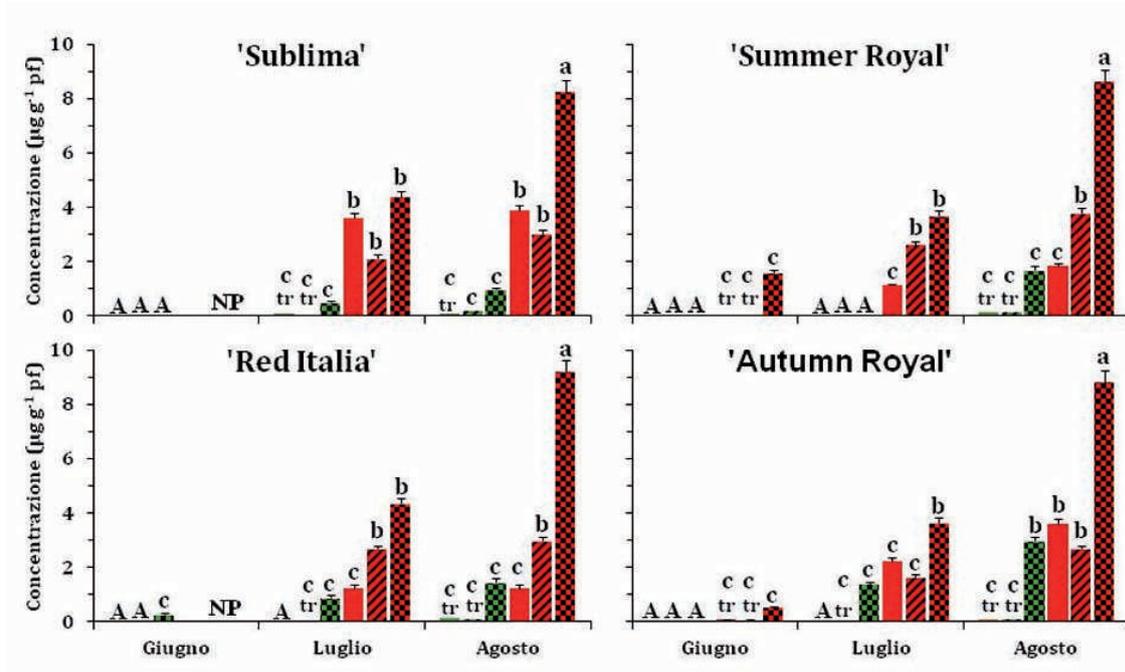


Fig. 4

Variatione del contenuto in scitalone (□), isosclerone (▨) e pullulano (▩) in foglie visivamente 'normali' (■) o con sintomi (■) prelevate da piante di 'Sublima', 'Summer Royal', 'Red Italia' e 'Autumn Royal' raccolte in giugno, luglio e agosto 2018. Ciascun istogramma riporta la media di 6 valori  $\pm$  d.s. Per l'intera figura, valori con la stessa lettera non sono significativamente differenti per il test di Tukey a  $P < 0,05$ . 'NP' = tipologia di foglia non presente, 'tr' = presente in tracce ( $\leq 0,25 \mu\text{g g}^{-1}$  pf), 'A' = composto non individuato.

Come riportato in Tab. 1, i coefficienti di Pearson indicano una correlazione diretta tra perdita di elettroliti e quantità di MDA. Le concentrazioni di scitalone e isosclerone e quelle di scitalone e pullulano sono fortemente correlate in modo indiretto in 'Sublima', 'Summer Royal' e 'Red Italia', mentre una forte correlazione diretta si ha per 'Autumn Royal'. In tutte le cultivar analizzate si evidenzia una forte correlazione diretta tra presenza di isosclerone e pullulano. Per le cvs 'Sublima', 'Summer Royal' e 'Red Italia' fortemente correlati in modo indiretto sono MDA e scitalone. Questi due parametri sono correlati in modo diretto per 'Autumn Royal'. Nelle quattro cultivar, perdita di elettroliti e contenuto in scitalone sono correlati in modo indiretto, mentre contenuto in MDA e perdita di elettroliti mostrano una correlazione diretta con il contenuto di isosclerone e pullulano. Gli studi di Pierron et al. (2016) dimostrano che l'attività fitotossica di *Pm. aleophilum* è meno efficace rispetto a quella di *Pa. chlamydospora*; i nostri dati invece mostrano un'azione sinergica dei due patogeni con una più intensa comparsa di sintomi.

Soprattutto pullulano e isosclerone sembrerebbero le molecole che, raggiunta la concentrazione citotossica, contribuiscono alla formazione di 'tiger-stripes'. In conclusione, sembrerebbe che scitalone, isosclerone e pullulano, prodotti nel legno infetto, traslocati e accumulati nelle foglie, potrebbero essere la causa delle alterazioni biochimiche e fisiologiche che, compromettendo l'apparato fotosintetico e le membrane

Tabella 1

Coefficienti di correlazione di Pearson per perdita di elettroliti (PE), complesso MDA-TBA (MDA), scitalone (SCI), isosclerone (ISO) e pullulano (PUL) in foglie di Sublima, Summer Royal, Red Italia e Autumn Royal.<sup>a</sup>

	PE	MDA	SCI	ISO	PUL
<b>'Sublima'</b>					
PE	1,000				
MDA	0,561	1,000			
SCI	-0,548	-0,995	1,000		
ISO	0,588	0,566	-0,556	1,000	
PUL	0,455	0,632	-0,617	0,824	1,000
<b>'Summer Royal'</b>					
PE	1,000				
MDA	0,189	1,000			
SCI	-0,187	-0,997	1,000		
ISO	0,519	0,397	-0,400	1,000	
PUL	0,544	0,566	-0,576	0,828	1,000
<b>'Red Italia'</b>					
PE	1,000				
MDA	0,266	1,000			
SCI	-0,256	-0,996	1,000		
ISO	0,230	0,446	-0,444	1,000	
PUL	0,391	0,429	-0,432	0,822	1,000
<b>'Autumn Royal'</b>					
PE	1,000				
MDA	0,071	1,000			
SCI	-0,042	0,703	1,000		
ISO	0,050	0,733	0,997	1,000	
PUL	0,069	0,627	0,934	0,925	1,000

<sup>a</sup> Le variabili sono: correlate positivamente (CP>0), incorrelate (CP=0), correlate negativamente (CP<0). La correlazione è: debole (CP<|0,3|), moderata (|0,3|<CP<|0,7|) o forte (CP>|0,7|).

cellulari, porteranno ai sintomi fogliari, anche in relazione ad una certa inefficienza o rallentamento dei sistemi di difesa.

**Ringraziamenti** - Gli autori ringraziano Luca Scarola e Francesco Mannerucci (Dipartimento di Scienze del Suolo della Pianta e degli Alimenti, Università di Bari Aldo Moro) per il valido supporto tecnico nella realizzazione delle prove.

#### Letteratura citata

- Abou-Mansour E, Couche E, Tabacchi R (2004) Do fungal naphthalenones have a role in the development of esca symptoms? *Phytopathologia Mediterranea* 43: 75-82.
- Agrios GN (2005) *Plant Pathology*, 5<sup>th</sup> Ed. Academic Press, San Diego, CA. 952 pp.
- Andolfi A, Mugnai L, Luque J, Surico G, Cimmino A, Evidente A (2011) Phytotoxins produced by fungi associated with grapevine trunk diseases. *Toxins* 3: 1569-1605.
- Bajji M, Kinet JM, Lutts S (2002) The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. *Plant Growth Regulation* 36(1): 61-70.
- Bruno GL, Sparapano L (2006) Effects of three esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L. II. Characterization of biomolecules in xylem sap and leaves of healthy and diseased vines. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 69: 195-208.
- Bruno GL, Sparapano L, Graniti A (2007) Effects of three esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L. IV. Diffusion through the xylem of metabolites produced by two tracheiphilous fungi in the woody tissue of grapevine leads to esca-like symptoms on leaves and berries. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 71: 106-124.
- Crous PW, Gams W (2000) *Phaeomoniella chlamydospora* gen. et comb. nov., a causal organism of Petri grapevine decline and esca. *Phytopathologia Mediterranea* 39: 112-118.
- Evidente A, Sparapano L, Andolfi A, Bruno GL (2000) Two naphthalenone pentaketides isolated from liquid cultures of *Phaeoacremonium aleophilum*, a fungus associated with esca disease syndrome. *Phytopathologia Mediterranea* 39: 162-168.
- Fischer M (2002) A new wood-decaying basidiomycete species associated with esca of grapevine: *Fomitiporia mediterranea* (*Hymenochaetales*). *Mycological Progress* 1(3): 315-324.
- Graniti A, Surico G, Mugnai L (2000) Esca of grapevine: a disease complex or a complex of diseases? *Phytopathologia Mediterranea* 39: 16-20.
- Heath RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives in Biochemistry and Biophysics* 125: 189-198.
- Larignon P, Dubos B (1997) Fungi associated with esca disease in grapevine. *European Journal of Plant Pathology* 103: 147-157.
- 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.
- Mostert L, Groenewald JZ, Summerbell RC, Gams W, Crous PW (2006a) Taxonomy and pathology of *Togninia* (*Diaporthales*) and its *Phaeoacremonium* anamorphs. *Studies in Mycology* 54: 1-115.
- Mostert L, Hallen F, Fourie P, Crous PW (2006b) A review of *Phaeoacremonium* species involved in Petri disease and esca of grapevines. *Phytopathologia Mediterranea* 45(S): 12-29.
- Mugnai L, Graniti A, Surico G (1999) Esca (black measles) and brown wood streaking: two old and elusive diseases of the grapevine. *Plant Disease* 83: 404-418.
- Pierron RJG, Pouzoulet J, Couderc C, Judic E, Compant S, Jacques A (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: 1-14.
- Surico G, Mugnai L, Marchi G (2008) The esca disease complex. In: Ciancio A, Mukerji KG (Eds) *Integrated Management of Diseases Caused by Fungi, Phytoplasma and Bacteria*: 119-136. Springer, Netherlands.
- Surico G, Mugnai L, Marchi G (2010) Verso una nuova definizione del concetto di esca. In: *Il Mal dell'Esca della Vite. Interventi di ricerca e sperimentazione per il contenimento della malattia Progetto MESVIT*: 59-61. Il Bandino, Italia.
- Tabacchi R, Fkyerat A, Poliard C, Dubin GM (2000) Phytotoxins from fungi of esca of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea* 39: 156-161.
- Taiz L, Zeiger E (2010) *Plant physiology*. 5<sup>th</sup> Ed. Sinauer Associates. 782 pp.

#### AUTORI

Giovanni Luigi Bruno (giovanniluigi.bruno@uniba.it), Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti (Di.S.S.P.A.), Università di Bari Aldo Moro, Via G. Amendola 165/A, 70126 Bari  
Antonio Domenico Marsico (adomenico.marsico@crea.gov.it), Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA) Centro di Ricerca Viticoltura ed Enologia Sede di Turi, Via Casamassima 148, 70010 Turi (Bari)  
Franca Tommasi (franca.tommasi@uniba.it), Marco Vendemia (marco.vendemia@gmail.com), Dipartimento di Biologia, Università di Bari Aldo Moro, Via Orabona 4, 70125 Bari  
Autore di riferimento: Giovanni Luigi Bruno