

ALTERAZIONI A CARICO DEL SISTEMA FOTOSINTETICO INDOTTE DALLA MALATTIA DELLE FOGLIE TIGRATE (COMPLESSO DEL MAL DELL'ESCA)

P. VALENTINI, R. PERRIA

CREA Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria - Unità di Ricerca per la Viticoltura – Viale Santa Margherita, 81 52100 Arezzo
paolo.valentini@entecra.it

RIASSUNTO

Questo lavoro evidenzia le alterazioni fisiologiche indotte dal complesso del mal dell'esca, rilevabili dallo studio delle curve di estinzione della fluorescenza e determina quali parametri fluorimetrici indicano una condizione anomala della pianta. L'obiettivo è di giungere ad una diagnosi precoce della sindrome o accertare la riuscita di interventi di risanamento. L'indagine ha previsto una serie di rilievi su piante di vite colpite dal mal dell'esca. I rilievi sono stati effettuati su foglie che presentavano sintomi della malattia e su foglie asintomatiche oltre che su piante sane. Il danno a carico del processo fotosintetico si manifesta con alterazione del fotosistema II. Interessante è l'andamento delle curve dei transients, in particolare della banda K e quindi un'alterazione dell'Oxygen Evolving Complex, con conseguente limitazione nel trasporto degli elettroni.

Parole chiave: vite, fluorescenza, banda k

SUMMARY

PHOTOSYNTHETIC SYSTEM ALTERATIONS INDUCED BY THE ESCA DISEASES COMPLEX IN GRAPEVINES

The esca disease complex causes physiological changes in the curves of fluorescence quenching and in the fluorimetric parameters. The goal is to achieve an early diagnosis of the syndrome or to show the success of disease recovery efforts. The study included a series of surveys of vine plants affected by "esca", the measurements were carried out on leaves with symptoms of the disease, on leaves without symptoms and on healthy plants. The damage to the photosynthetic process is shown by alteration of photosystem II. It is of interest the analysis of the curves of transients, in particular of the K-band and the following alteration of the Oxygen Evolving Complex and the limitation in the electron transport.

Keywords: grapevine, fluorescence, k-band

INTRODUZIONE

Il complesso del mal dell'esca è una malattia a carico della vite nota fin dall'antichità e ormai diffusa in tutto il bacino del mediterraneo (Ciferri, 1941), è una malattia del legno provocata da un complesso di funghi che penetrano nella pianta attraverso ferite accidentali o tagli della potatura. Gli agenti patogeni, che causano tale malattia, sono da sempre individuati in una pluralità di funghi; inizialmente attribuita prevalentemente ad agenti di carie (l'agente di carie attualmente riconosciuto è prevalentemente *Fomitiporia mediterranea*) oggi la sintomatologia fogliare della malattia è attribuita a vari agenti patogeni costantemente associati alla malattia, fra cui sono indicate principalmente due specie fungine: *Phaeoacremonium aleophilum* e *Phaeoacremonium aleophilum*. Questi funghi sono in grado di colonizzare il tessuto conduttore delle piante e probabilmente, tramite emissioni sinergiche di tossine, enzimi pectinolitici, e occlusione dei vasi contribuiscono a provocare i noti sintomi fogliari (Mugnai *et al.*, 2010). La "tigratura" delle foglie, da cui il nome di malattia delle foglie striate, è il

classico sintomo esterno della malattia: le lamine presentano delle strisce di tessuto necrotico delimitate da tessuto decolorato tra le nervature; segue una fascia di tessuto ancora verde che include le nervature. Altri sintomi sono associati alla sindrome del complesso del mal dell'esca, come l'apoplezia, più una serie di sintomi del legno, come imbrunimenti e la carie e non esiste una risoluzione della malattia in senso positivo. I mezzi di lotta sono limitati a misure di profilassi e prevenzione; in questi ultimi anni alcuni prodotti sono allo studio poiché hanno evidenziato efficacia quando applicati in campo, come ad esempio nel caso del fosfito di alluminio, comunemente utilizzato nella lotta alla peronospora.

Una pratica non molto diffusa è quella del taglio del ceppo a 20-30 cm da terra, appena la pianta manifesta i primi sintomi; in tal modo si blocca la colonizzazione del legno da parte dei funghi, nello stesso tempo si stimola quel che resta della pianta ad emettere un nuovo germoglio dalle gemme latenti presenti nella porzione di tronco lasciato in campo. Ovviamente il taglio effettuato va disinfettato e protetto (pratica del *recovery*). Non è assicurata la totale riuscita dell'operazione comunque la nuova pianta ha delle chance di sopravvivenza.

Il periodo di latenza dei patogeni coinvolti induce alla loro sottovalutazione, ad annate in cui i sintomi sono evidenti ne possono seguire altre in cui i sintomi sono meno visibili e meno dannosi. La possibilità di diagnosticare precocemente la malattia potrebbe consentire di intervenire tempestivamente, e a questo scopo sono state svolte le osservazioni riportate nel presente lavoro.

L'energia luminosa assorbita dalle foglie viene trasferita verso i centri di reazione dei fotosistemi PSII e PSI, utilizzata per alimentare le reazioni fotochimiche. Una parte dell'energia assorbita, però non è catturata dai centri di reazione ed è dissipata sotto forma di calore. Un'altra frazione di energia, pur raggiungendo il centro di reazione non riesce ad essere trasferita all'accettore di elettroni e per questo viene riemessa in forma di fluorescenza, in quantità molto piccola pari a circa il 3-5 % della luce totale assorbita.

L'emissione di fluorescenza è di modesta entità quando la fotosintesi decorre normalmente e senza problemi, mentre incrementi importanti di emissioni di fluorescenza indicano una riduzione dell'efficienza della fotosintesi (Lichtenthaler e Rinderle, 1988).

Il fluorimetro Handy PEA della Hansatech Instruments produce, per ogni rilievo due serie di dati: la prima riguarda i parametri salienti della curva di induzione della fluorescenza e alcune grandezze relative al flusso energetico, espressione della funzionalità del PSII (tabella 1); la seconda serie di dati rappresenta, istante per istante, l'evoluzione della curva di induzione della fluorescenza (*transient*). Dalla conformazione di tale curva si possono ricavare informazioni sulle caratteristiche dell'apparato fotosintetico del soggetto esaminato. Durante il tempo di illuminazione, di un campione adattato al buio, la fluorescenza passa da un livello basale F_0 ad un livello massimo F_m ; la curva di induzione della fluorescenza è rappresentata in grafico riportando il tempo, espresso in ms, sulle ascisse in scala logaritmica. Fra il punto 0 e il punto P (F_m) viene calcolata, con frequenza decrescente, l'intensità della fluorescenza ai diversi punti del *transient*. Le curve mostrano un andamento polifasico: sono visibili due punti di flesso, il primo compare a 2-3 ms ed è indicato con "J"; il secondo flesso appare a 20-30 ms ed è indicato con la lettera "I". La sequenza dei punti O-J-I-P lungo il *transient* descrive gli eventi fotochimici di riduzione e successiva ri-ossidazione degli accettori di elettroni e prende il nome di JIP-test (Maldonado-Rodriguez *et al.*, 2003).

Considerato che, come rilevato da Petit *et al.* (2006), differenze significative nei valori di F_m si riscontrano solo tra aree gialle di foglie sintomatiche e le foglie controllo, mentre non si hanno differenze significative fra foglie asintomatiche di germogli infetti e foglie controllo, questo lavoro ha voluto evidenziare le alterazioni fisiologiche indotte dai funghi responsabili

del complesso del mal dell'esca, rilevabili dallo studio delle curve di estinzione e determinare quali parametri fluorimetrici, oltre a Fm, indicano la situazione di malessere della pianta, anche allo scopo di giungere ad una diagnosi precoce della sindrome o, come nel caso della pratica del *recovery*, accertare la riuscita dell'intervento "chirurgico".

MATERIALI E METODI

La varietà di vite oggetto del presente studio è l'Orpicchio, un vitigno a bacca bianca, tipico della zona del Val d'Arno e come tale presente nelle Collezione del germoplasma viticolo del CREA - Unità di Ricerca per la Viticoltura di Arezzo. Il vigneto in cui è ospitato il vitigno in esame è stato impiantato nel 2002, ha un sesto di m 2,70x0,90 ed è allevato a spalliera potato a cordone speronato.

I rilievi effettuati con il fluorimetro hanno riguardato piante di Orpicchio, le cui foglie manifestavano evidenti sintomi di mal dell'esca (indicati di seguito come SINTOSI). Sulle stesse piante sono state sottoposte a misurazione anche foglie asintomatiche (indicate come SINTONO). Un terzo gruppo di misurazioni ha avuto per oggetto foglie sane di Orpicchio indenni da tale malattia (indicate come TEST) utilizzate come controllo. I rilievi sono stati effettuati per due anni consecutivi sulle medesime piante.

Nella tabella 1 sono riportati i parametri misurati col fluorimetro nelle due campagne di rilevazioni.

Tabella 1. Elenco dei parametri rilevati col Fluorimetro Handy Pea

Simbolo	Grandezza
F0	Fluorescenza basale del campione adattato al buio; centri di reazione aperti
Fm	Massimo valore di fluorescenza raggiunto; tutti gli accettori di elettroni ridotti
TFm	Tempo necessario per raggiungere il livello massimo di fluorescenza (Fm)
Fv	Differenza tra Fm e F0; rappresenta l'efficienza massima di scissione dell'acqua
Fv/Fm	Massima efficienza fotochimica del PSII
PI	Performance index
A	Area soprastante la curva di induzione
ABS	Energia assorbita dai pigmenti antenna del PSII
TR	Energia trattenuta per la riduzione del Qa
ET0	Elettroni trasportati
DI0	Energia dissipata
RC	Centri di reazione
RC/CS	Densità dei centri di reazione

Come detto nella premessa lo scopo del lavoro è quello di capire quali alterazioni fisiologiche comporta la malattia nota come complesso del mal dell'esca. Nello stesso tempo si cerca di individuare quali sono i parametri fisiologici che vengono alterati dalla malattia.

Nell'ambito del presente studio, l'obiettivo è stato quello di evidenziare e quantificare le differenze del *transient* proveniente da foglia infetta rispetto a quello della foglia asintomatica e al controllo. Per evidenziare le variazioni di traiettoria delle curve provenienti da campioni malati con curve derivate da campioni di controllo, ad ogni punto della prima curva si sottrae il valore corrispondente della seconda, ottenendo una terza curva denominata ΔV (Bussotti *et al.*, 2012).

Dall'analisi delle curve ottenute vengono dedotti i risultati.

Nel primo anno di studio, i rilievi con il fluorimetro sono stati effettuati durante l'estate partendo dalla chiusura grappolo: precisamente il 15 e il 22 luglio e il 19 agosto. Complessivamente sono state realizzate 165 misurazioni. L'anno successivo, le misurazioni fluorimetriche, realizzate sulle medesime piante, hanno avuto inizio dalla post-fioritura: il 13 giugno, il 4 e 26 luglio per un totale di 133 rilievi.

RISULTATI

Al fine di comprendere le alterazioni fisiologiche associate alla manifestazione dei sintomi si è partiti dall'analisi delle curve ottenute dalla misura della fluorescenza diretta o *transient*, le quali consentono di descrivere i processi e le reazioni di ossido-riduzione che sono alla base del trasporto di elettroni. Gli andamenti delle curve vengono riportati nei grafici delle figure da 1 a 6.

Figura 1. Anno I: rilievo effettuato il 15 luglio su foglie sintomatiche e su foglie sane, sono riportate le curve delle due tesi e la curva ΔV

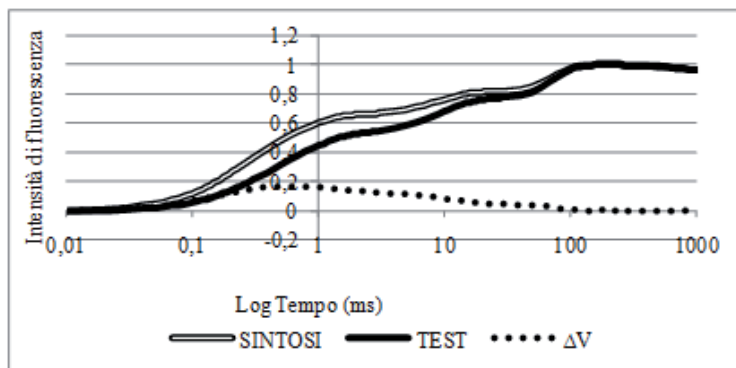


Figura 2. Anno I: rilievo effettuato il 22 luglio su foglie sintomatiche e su foglie sane, sono riportate le curve delle due tesi e la curva ΔV

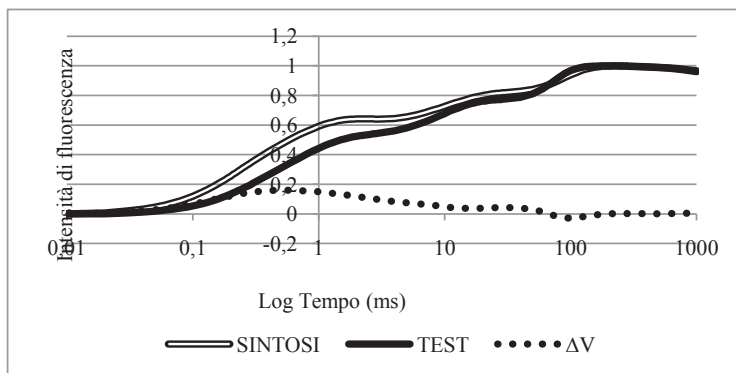


Figura 3. Anno I: rilievo effettuato il 19 agosto su foglie sintomatiche e su foglie sane, sono riportate le curve delle due tesi e la curva ΔV

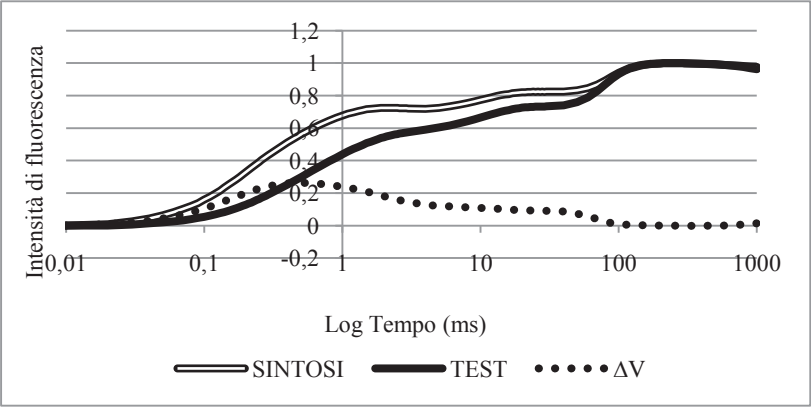


Figura 4. Anno II: rilievo effettuato il 13 giugno su foglie sintomatiche e su foglie sane, sono riportate le curve delle due tesi e la curva ΔV

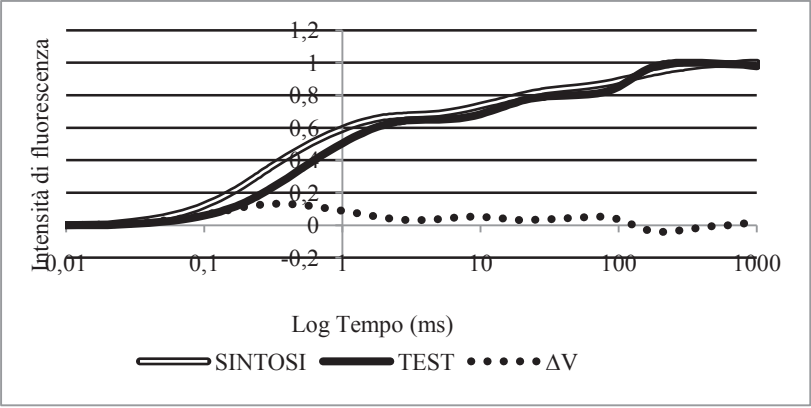


Figura 5. Anno II: rilievo effettuato il 14 luglio su foglie sintomatiche e su foglie sane, sono riportate le curve delle due tesi e la curva ΔV

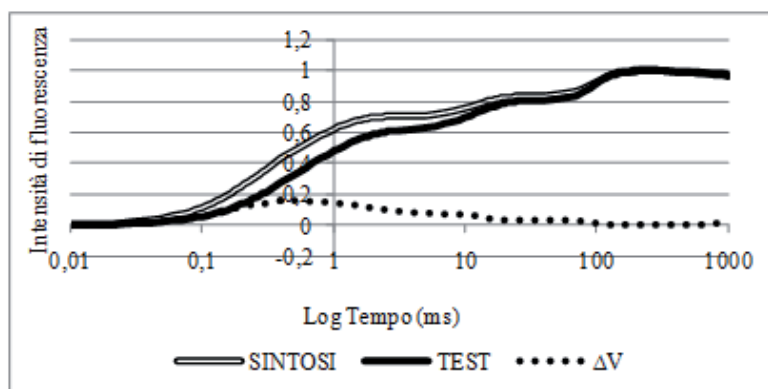
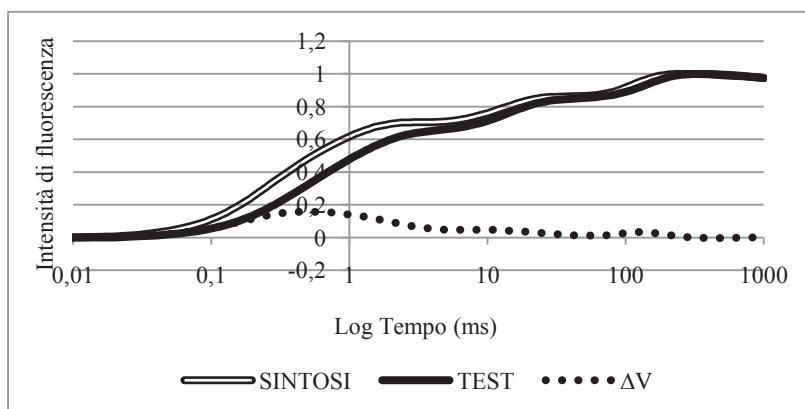


Figura 6. Anno II: rilievo effettuato il 26 luglio su foglie sintomatiche e su foglie sane, sono riportate le curve delle due tesi e la curva ΔV



I dati relativi ai flussi energetici sono sintetizzati nei seguenti grafici radar, nei quali si confrontano i parametri misurati per le tesi SINTONO (tutti i rilievi effettuati nello stesso anno) e TEST (media dei tre rilievi). Considerato 100 il valore delle piante sane (TEST), i valori delle piante SINTONO sono riportati proporzionalmente, per ogni parametro misurato.

Analizzando i valori dei parametri fondamentali delle curve *transient* (F_0 , F_1 , F_2 , F_3 , F_4 e F_5) e quelli direttamente connessi alla condizione fisiologica della pianta (ad es. F_m , F_v/F_m , Area, P.I.) è possibile nel grafico a “radar” rappresentato confrontare i valori rilevati nelle piante asintomatiche con quelli delle piante TEST.

Figura 7. L'immagine rappresenta i dati relativi ai flussi energetici nel primo anno di rilievi per le tesi SINTONO e TEST

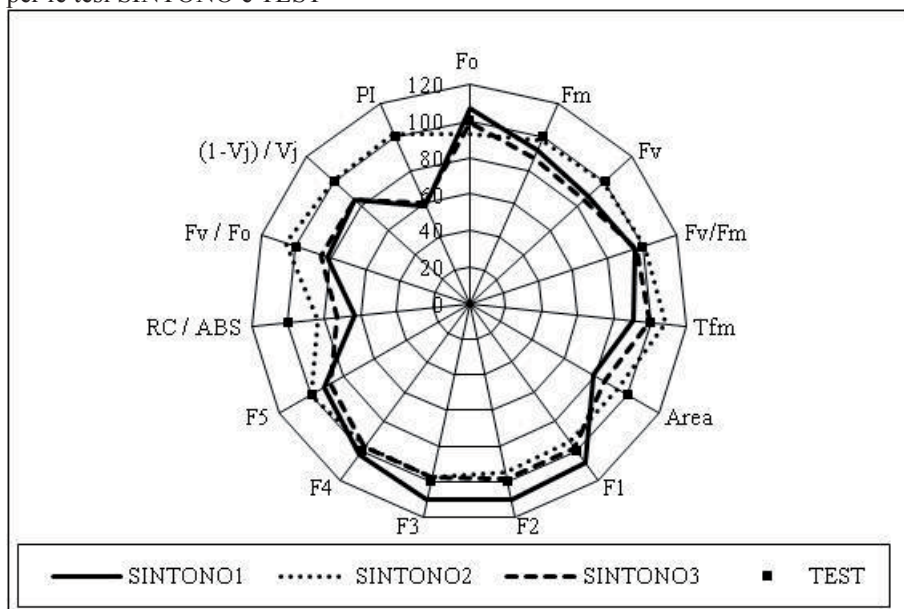
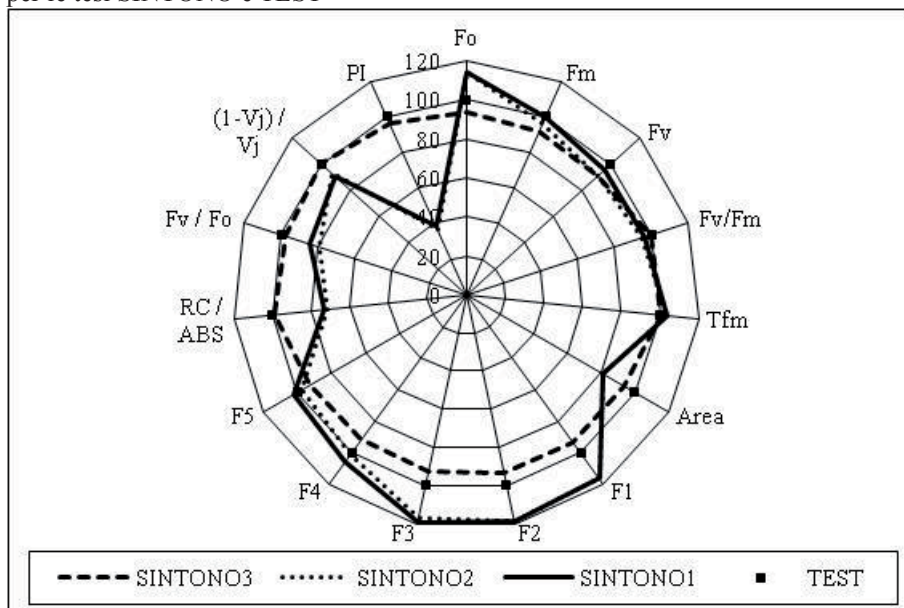


Figura 8. L'immagine rappresenta i dati relativi ai flussi energetici nel secondo anno di rilievi per le tesi SINTONO e TEST



DISCUSSIONE

Grafici dei *transient*

I grafici riportati nelle figure da 1 a 6 rappresentano le traiettorie delle curve *transient* delle foglie malate in confronto alle curve delle foglie di controllo; sugli stessi grafici sono riportate le curve ΔV , ottenute per differenza puntuale tra le due curve. In tutti i grafici si nota che il *transient* delle foglie malate diverge da quello delle foglie di controllo, manifestando una maggiore emissione di fluorescenza in punti particolari della curva (tabella 2). Dalla tabella si ricavano dei dati interessanti: il punto di inizio della divergenza tra le due curve è costante e si verifica quasi sempre al tempo $T = 0,04$. L'aspetto più rilevante che si evidenzia è l'ampliamento del tempo di durata del periodo di divergenza delle due curve, infatti il punto di divergenza, nel primo anno termina al tempo $T = 60-80$ ms; nel secondo il punto di fine divergenza tra le due curve si allunga e varia da 90 a 400 ms.

Tabella 2. Tabella riassuntiva dei punti di maggior interesse e in cui si evidenziano le maggiori differenze fra le curve.

I anno				II anno			
RIL	α	Ω	max ΔV	RIL	α	Ω	max ΔV
1	0,04 ms	80 ms	0,5 ms	1	0,04 ms	400 ms	0,3 ms
2	0,04 ms	60 ms	0,6 ms	2	0,04 ms	90 ms	0,5 ms
3	0,04 ms	80 ms	0,5 ms	3	0,05 ms	220 ms	0,5 ms

La perdita di efficienza del PSII è evidenziata dal dilatarsi del tempo di divergenza tra le due curve, il punto di massima divergenza, indicato come banda K (*Srivastava et al.*, 1997), è indice della limitazione dell'efficienza del donatore di elettroni, ovvero l'Oxygen Evolving Complex (OEC).

Analisi delle curve ΔV

Osservando le curve ΔV delle foglie malate con sintomi, passando dal 1° al 3° rilievo, si assiste, ad un progressivo peggioramento della funzionalità del PSII evidenziato dall'incremento del valore del picco di fluorescenza emessa, in corrispondenza del punto K. Successivamente l'andamento della curva ΔV della medesima tipologia di foglie non subisce modificazioni mentre si assiste ad un decremento della fluorescenza emessa passando dal primo rilievo al terzo.

Analisi dei grafici "radar" (figure 7 e 8)

Nel grafico in figura 7 si osserva una contrazione progressiva dei valori di alcuni parametri come P.I. (1-Vj)/Vj, Fv/F0 RC/ABS e Area; aumenti nei valori di fluorescenza emessa in corrispondenza di F1, F2 e F3. Il grafico in figura 8 mostra la contrazione dei valori degli stessi parametri dell'anno precedente; si assiste ad un aumento della fluorescenza emessa anche a F4 e F5, in accordo a quanto rilevato per il *transient* delle foglie con sintomi, inoltre è evidente l'incremento del valore del tempo impiegato dal PSII per raggiungere Fm.

CONCLUSIONI

Il parametro che indica la vitalità della pianta è il Performance Index (P.I.) e anche in questo lavoro si è mostrato il più sensibile alle alterazioni fisiologiche indotte dal complesso del mal dell'esca. Tuttavia la sola rilevazione del P.I. non è sufficiente ad illustrare i danni alla fisiologia della fotosintesi, le osservazioni sulle traiettorie dei *transient* e sulle curve ΔV invece descrivono le alterazioni nella catena di trasporto degli elettroni. Confrontando le curve

transient delle foglie asintomatiche con i *transient* delle foglie malate si vede subito un “disaccoppiamento” cioè una divergenza nelle traiettorie dei due *transient*; il momento in cui avviene il “disaccoppiamento” è sempre lo stesso, mentre varia il momento in cui avviene la riunificazione tra le due curve. Differenze si notano anche tra le due annate, nel secondo anno di manifestazione dei sintomi si assiste al dilatamento del periodo di “disaccoppiamento”. Osservando le curve ΔV , si nota la formazione di una “duna” in prossimità di $T = 0,3$ ms. cioè nel punto in cui inizia la formazione della banda K. che ha un preciso significato fisiologico: la formazione della “duna” in quella fase della curva *transient*, indica la parziale inattivazione del Oxygen Evolving Complex (OEC), con conseguente limitazione dell’efficacia del donatore di elettroni. Il complesso OEC è responsabile della scissione (ossidazione) della molecola d’acqua con la conseguente liberazione di ossigeno molecolare (Hopkins e Hüner, 2009), il danneggiamento diminuisce il flusso di elettroni verso i centri di reazione.

Per concludere, a livello fisiologico il complesso del mal dell’esca nella sua manifestazione fogliare comporta un blocco parziale della fase di ossidazione dell’acqua che si aggrava lentamente ma progressivamente.

I parametri che ci danno un’indicazione della malattia in atto sono aspecifici (naturalmente) e oltre che il Performance Index, che risulta basso e progressivamente decrescente, bisogna osservare in particolare i valori F1, F2 e F3 che in genere risultano maggiori dei valori osservati per le foglie sane. Queste indicazioni potrebbero essere un valido supporto per stimare la riuscita della pratica del *recovery*.

LAVORI CITATI

- Bussotti F., Kalaji M.H., Desotgiu R., Pollatrin M., Loboda T., Bosa K., 2012. Misurare la vitalità delle piante per mezzo della fluorescenza della clorofilla. Firenze University Press.
- Ciferri R., 1941. Manuale di patologia vegetale. Società Anonima Editrice Dante Alighieri.
- Hopkins W.G., Hüner N.A., 2009. *Introduction to plant physiology*. Fourth edition. Jhon Wiley & Sons Inc., USA.
- Lichtenthaler H.K., Rinderle U., 1988. The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions in plants. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 19, 29-85.
- Mugnai L., Giuggiani 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. In Il mal dell’Esca della Vite. Arsia. 65-88.
- Maldonado-Rodriguez R., Pavlov S., Gonzalez A., Oukarroum A., Strasser R., 2003. Can machines recognise stress in plants? *Environmental Chemistry Letters* 1, 201-205.
- Petit A.-N., Vaillant N., Boulay M., Clément C., Fontaine F., 2006. Alteration of Photosynthesis in Grapevines Affected by Esca. *Phytopathology* 96, 10, 1060-1066.
- Srivastava A., Guissè B., Greppin H., Strasser S. J., 1997. Regulation of antenna structure and electron transport in Photosystem II of *Pisum Sativum* under elevated temperature probed by the fast polyphasic chlorophyll a fluorescence transient: OKJIP. *Biochimica Acta* 1320, 95-106.

