RIDUZIONE DEI SINTOMI DELLA 'MALATTIA DELLE FOGLIE STRIATE' DEL COMPLESSO ESCA (GLSD) TRAMITE UNA MISCELA DI FERTILIZZANTI FOGLIARI[1]

F. CALZARANO[1], V. D'AGOSTINO[1], F. OSTI[2], S. SCHIFF[3],
L. MUGNAI[3], S. DI MARCO[2]
[1] Università degli Studi di Teramo, Facoltà di Bioscienze e Tecnologie Agro-Alimentari e Ambientali, Via R. Balzarini, 1, 64100 Teramo
[2] CNR, IBIMET, Via Gobetti 101, 40129 Bologna
[3] Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agroalimentari e dell'Ambiente (DISPAA), Università degli Studi di Firenze, P.le Cascine 28, 50144 Firenze
fcalzarano@unite.it

RIASSUNTO

I sintomi fogliari della malattia delle foglie striate (GLSD) del complesso Esca riducono gravemente quantità e qualità della produzione. L'efficacia di una miscela di Sali di calcio e magnesio ed estratti di alghe *Fucales* nella riduzione dei sintomi fogliari è stata valutata nel triennio 2010-2012 in tre diversi vigneti della provincia di Teramo in Abruzzo. Dall'inizio della crescita vegetativa alla pre-chiusura grappolo, sono stati effettuati, ogni dieci giorni, nove trattamenti fogliari con la miscela completa, con una miscela di calcio e magnesio senza alghe, e con le singole componenti. I risultati, simili nei tre anni e vigneti, hanno messo in luce l'efficacia della miscela completa nella riduzione dei sintomi ed effetti minori con le altre combinazioni. Inoltre nelle viti trattate con la miscela completa sono stati osservati incrementi di quantità e qualità della produzione, effetti sulla crescita vegetativa, incrementi di *trans*-resveratrolo e flavonoidi, superiori estensioni di druse di ossalato di calcio e assenza di fitotossicità. Tali risultati incoraggiano l'utilizzo della miscela fertilizzante completa nelle strategie di controllo dalla GLSD e forniscono una base per ulteriori avanzamenti nella conoscenza dei meccanismi che originano i sintomi fogliari della malattia.
Parole chiave fertilizzanti fogliari, Ca^{2+}, risposta di difesa, *trans*-resveratrolo

SUMMARY

REDUCTION OF GRAPEVINE LEAF STRIPE DISEASE SYMPTOMS (ESCA COMPLEX) BY A MIXTURE OF NUTRIENTS AND SEAWEEDS

The leaf symptoms of Grapevine leaf stripe disease (GLSD) of Esca complex seriously reduce the quality and quantity of grape production. The effect of foliar applications of a mixture of calcium chloride, magnesium nitrate and *Fucales* seaweed extract on the development of leaf symptoms was evaluated over a 3-year period, from 2010 to 2012. Nine foliar applications in different combinations of the mixture and its individual mineral components were tested in three different vineyards in the Teramo province (Abruzzo, Italy). Treatments were applied every 10 days from the beginning of vegetative growth to pre-bunch closure. The results were similar in the three vineyards and in the three years, leading to a significant reduction of symptom development in the vines treated with the full mixture, while lower effects were obtained by applying partial combinations or single components. Both quantity and quality of grapes from the treated vines increased, while no phytotoxic or other unwanted effects on

[1] Questo articolo è una riduzione ed adattamento dell'articolo pubblicato dagli stessi autori sulla rivista internazionale *Phytopathologia Mediterranea*, (2014) 53, 3, 543−558, e qui riprodotto con il permesso dell'editore.

grape growth were detected. Vines treated with the full mixture showed an increase in *trans*-resveratrol and flavonoids content, and a higher accumulation of calcium oxalate in crystal druses in the leaf mesophyll. These data can be a useful base to set up a control strategy against GLSD and give some input for better understanding the mechanisms involved in foliar symptom expression in GLSD.
Keywords: foliar fertilisation, Ca^{2+}, defence response, *trans*-resveratrol

INTRODUZIONE

Le malattie del complesso esca (Surico et al., 2008) sono le più diffuse e pericolose malattie del legno della vite in pressoché tutte le aree di coltivazione, in particolare in Europa. Studi eziologici ed epidemiologici hanno accresciuto le conoscenze sugli agenti fungini responsabili e sulle loro interazioni con la pianta e l'ambiente, mentre la messa a punto di efficaci strategie di difesa risulta ancora carente (Di Marco et al., 2011).

I patogeni coinvolti in tali malattie, in primis *Phaeomoniella chlamydospora* (Pch), differenti specie di *Phaeoacremonium*, *Phaeoacremonium minimum* (Pmi) in particolare, e il basidiomicete *Fomitiporia mediterranea* (Fmed), possono ridurre l'efficienza del trasporto linfatico e generare necrosi dei tessuti legnosi. Pertanto è stata rivolta una particolare attenzione alla prevenzione delle infezioni (Rolshausen et al., 2010). Alcuni di questi patogeni producono metaboliti fitotossici (Andolfi et al., 2011) che interferiscono su processi metabolici della pianta determinando danni quantitativi e qualitativi delle uve e accorciamento della vita delle piante colpite. Nella 'malattia delle foglie striate' (GLSD), la più diffusa in Italia tra le malattie del complesso esca, insieme ai sintomi sui tessuti legnosi si osservano sintomi sull'apparato epigeo che consistono in cloro-necrosi internervali e sottili linee di tessuto verde che delimitano le nervature fogliari, e nei grappoli in tacche violacee sugli acini e seccumi variamente estesi che possono riguardare interi tralci (Calzarano et al., 2004). La gravità di manifestazione di tali sintomi risulta direttamente proporzionale ai danni alla produzione. Viceversa la gravità dei danni non risulta proporzionale alla estensione delle necrosi dei tessuti legnosi colonizzati dai funghi (Calzarano e Di Marco, 2008), bensì, presumibilmente, alla risposta che i metaboliti tossici di questi ultimi attivano nella chioma giungendo dal legno tramite la corrente traspiratoria (Andolfi et al., 2011; Calzarano et al., 2013). Tale effetto è influenzato da fattori ambientali non ancora ben definiti (Surico et al., 2006) e questo è probabilmente il motivo per cui una precisa riproduzione dei sintomi fogliari, nelle diverse prove di inoculazione artificiale dei patogeni responsabili, non è ancora stata ottenuta. La mancata proporzionalità tra gravità dei sintomi sulla chioma e alterazioni nel legno arriva al suo estremo quando le viti malate rimangono asintomatiche per l'intera stagione, fino all'ottenimento di una produzione con caratteristiche quantitative e qualitative non dissimili da quelle delle viti sane (Calzarano et al., 2004). Con ragionevole certezza la tendenza al mascheramento dei sintomi, nelle viti colpite da GLSD, è favorita nelle stagioni vegetative più siccitose, in particolare quando le piogge sono carenti durante la crescita vegetativa, tra maggio e luglio, come risultato evidente nel corso di rilievi dei sintomi fogliari e delle precipitazioni effettuati per 21 anni consecutivi in vigneti abruzzesi (Calzarano, dati non pubblicati). Tali risultati hanno confermato quanto emerso nel corso di una prova su viti malate in vaso sottoposte ad un regime di sovrairrigazione e in un altro lavoro effettuato in vigneti toscani (Surico et al., 2010).

In considerazione della sufficiente qualità del prodotto di viti malate negli anni in cui sono asintomatiche e di viti sane (Calzarano et al., 2004), sono stati effettuati studi mirati alla riduzione della frazione di viti che esprime sintomi fogliari nei vigneti interessati dalla malattia in particolare analizzando l'influenza della nutrizione sulla manifestazione dei

sintomi fogliari (Calzarano et al., 2009). In tali lavori è stato rilevato un superiore contenuto di calcio nelle foglie di viti asintomatiche, rispetto a foglie di viti sane o sintomatiche, suggerendo un ruolo di tale elemento nella ridotta manifestazione dei sintomi sulla chioma della malattia (Calzarano et al., 2009), mentre, viceversa, trattamenti fogliari a base dei principali macro e microelementi incrementavano l'espressione di tali sintomi (Calzarano et al., 2007; Di Marco e Osti., 2009).

Sulla base dei risultati descritti è stato messo a punto uno specifico programma di applicazioni fogliari da effettuare in vigneto durante lo sviluppo vegetativo, quando verosimilmente si determinano i meccanismi responsabili della manifestazione dei sintomi fogliari nel prosieguo della stagione, per valutarne gli effetti su tale espressione. Il programma era basato sulla somministrazione di elementi singoli o in combinazione al fine di sviluppare una efficace strategia di intervento. Inoltre sono stati valutati ulteriori effetti di tali trattamenti sullo sviluppo vegetativo e sui principali parametri di quantità e qualità del prodotto. In aggiunta sono state verificate variazioni istologiche nelle lamine fogliari trattate e composti legati alla risposta della pianta, in particolare il *trans*-resveratrolo, la principale fitoalessina della vite.

MATERIALI E METODI

Vigneti e trattamenti

Lo studio ha avuto come oggetto un vigneto della cv. Trebbiano d'Abruzzo situato a Controguerra (TE), allevato da 37 anni con il sistema Geneva Double Courtain (GDC), e due vigneti della cv. Montepulciano d'Abruzzo, situati a Mosciano Sant'Angelo (TE), allevati a Tendone da 34 anni. L'espressione dei sintomi fogliari di GLSD è stata monitorata dal 1994 nel primo vigneto, e dal 2010 nei due rimanenti.

Nel triennio 2010-2012, in ognuno dei tre vigneti sono stati effettuati nove trattamenti fogliari distribuendo una miscela di Sali di calcio e magnesio ed estratti di alghe *Fucales*, la medesima miscela senza estratti di alghe, o i singoli Sali. I trattamenti, effettuati dalla fase in cui i tralci presentavano 3-5 foglie fino alla pre-chiusura grappolo, erano distanziati tra loro da un intervallo di dieci giorni. La miscela completa conteneva $CaCl_2$, $Mg(NO_3)_2$, ed estratti di alghe *Fucales* ed è stata distribuita alla dose di 4 L/ha. Tale dose è stata distribuita nel vigneto 'Trebbiano d'Abruzzo' con una irroratrice ad aereoconvezione erogante un volume di 8 hl/ha e nei vigneti 'Montepulciano d'Abruzzo' con irroratrice pneumatica erogante un volume di 4 hl/ha, variando opportunamente la concentrazione da 500 a 1000 ml/hl. Le dosi dei due Sali, distribuiti senza alghe, singolarmente o in miscela, erano analoghe a quelle contenute nella miscela completa. Nel 2010 nel vigneto 'Trebbiano d'Abruzzo' i trattamenti hanno riguardato due tesi, una trattata con la miscela completa e una testimone; ogni tesi presentava 4 repliche da 90 viti. Nel 2011 e 2012, nei vigneti 'Trebbiano d'Abruzzo' e 'Montepulciano d'Abruzzo 1', i trattamenti sono stati suddivisi in 5 differenti tesi (1: miscela completa, 2: miscela di $CaCl_2$ e $Mg(NO_3)_2$, 3: $CaCl_2$, 4: $Mg(NO_3)_2$, 5: testimone); ogni tesi includeva 2 repliche da 70 o 50 viti, nel primo e nel secondo vigneto rispettivamente; nel vigneto 'Montepulciano d'Abruzzo 2' sono stati effettuati solo trattamenti con la miscela completa; sia la tesi trattata che quella testimone comprendevano 3 repliche da 50 viti ciascuna.

Rilievi dei sintomi fogliari

I rilievi dei sintomi fogliari sono stati effettuati in tutti i vigneti ogni anno, nella seconda metà di settembre, quando tale manifestazione raggiunge il massimo livello. Nel vigneto 'Trebbiano d'Abruzzo', monitorato dal 1994, l'incidenza dei sintomi è stata calcolata dividendo il numero di viti presentanti sintomi con il numero di viti malate (somma di viti

sintomatiche e asintomatiche). Nei vigneti 'Montepulciano d'Abruzzo', monitorati solo dal 2010, data l'impossibilità di distinguere le viti sane dalla malate asintomatiche, il calcolo dell'incidenza è stato effettuato dividendo il numero di viti con sintomi con il numero totale di viti presenti. La gravità di espressione dei sintomi fogliari è stata calcolata ricorrendo ad una scala arbitraria da 0 a 5, dove 0 = assenza di sintomi, 1 = 1-10%, 2 = 11-30%, 3 = 31-50%, 4 = 51-70%, 5 = 71-100 % di estensione dei sintomi sulla chioma. Le percentuali di gravità dei sintomi sono state calcolate utilizzando l'indice di McKinney: $\sum N \times 100 / (Y \times Z)$, dove $\sum N$ = sommatoria dei valori di gravità di sintomo per pianta; Y = numero piante osservate (piante malate sintomatiche ed asintomatiche, nel vigneto della cv. 'Trebbiano d'Abruzzo'; totale piante presenti nei vigneti della cv. 'Montepulciano d'Abruzzo'); Z = valore massimo della scala di espressione dei sintomi (McKinney, 1923).

Misure delle aree fogliari

Nel 2012, nel vigneto 'Trebbiano d'Abruzzo', sono stati valutati gli effetti dei trattamenti sulla crescita vegetativa, misurando le aree fogliari di viti sane e malate asintomatiche, nelle parcelle trattate con la miscela completa e in quelle testimone. In ognuna delle 4 tesi a confronto sono stati selezionati 24 tralci, 12 esposti ed est e 12 ad ovest; i tralci sono stati prelevati in pre-chiusura grappolo, alla fine della crescita vegetativa, e portati in laboratorio dove tutte le foglie sono state staccate dall'asse del tralcio; le foglie sono state fotografate tenendo distinta la fogliazione primaria dalla secondaria e si è proceduto poi al calcolo di ogni area fogliare utilizzando il software d'immagine 'Image-pro plus', versione 7.0, Media Cybernetic Inc., Silver Spring, MD, USA.

Quantità e qualità della produzione e livelli di *trans*-resveratrolo nelle viti trattate

La produzione delle viti sane e asintomatiche trattate con la miscela completa è stata confrontata con quella delle corrispondenti viti non trattate, nel 2012, nel vigneto 'Trebbiano d'Abruzzo'. In ognuna delle 4 tesi a confronto (sane e asintomatiche, trattate e non trattate) sono state scelte 6 viti dalle quali è stata raccolta l'intera produzione, calcolando il peso e il numero dei grappoli. Inoltre, in ogni tesi a confronto sono stati raccolti 3 campioni di acini di 500 g, prelevando alternativamente da punte, ali e porzione centrale dei grappoli di 12 viti, utilizzati per determinare i livelli di zuccheri riducenti e di acidità totale. Le analisi sono state effettuate in accordo con la metodica ufficiale del Regolamento EC 2676/90, Allegati 13, 24 e 5 (AA. VV., 1990).

I livelli di *trans*-resveratrolo nelle foglie di viti sane, asintomatiche e sintomatiche, trattate con la miscela completa e non trattate del vigneto 'Trebbiano d'Abruzzo' (3 campioni di 8 foglie per ognuna delle 6 tesi a confronto) sono stati misurati in pre-chiusura grappolo, alla fine della crescita vegetativa, nel 2010 e 2011, secondo il metodo di Calzarano et al. (2008).

Analisi istologiche

Nel 2010 e 2011, nel vigneto 'Trebbiano d'Abruzzo', sono state effettuate analisi micromorfologiche su foglie di viti asintomatiche trattate con la miscela completa e su foglie di viti sane e asintomatiche non trattate, valutando druse di ossalato di calcio (6 foglie per ogni tipo di vite prelevando 2 foglie da 3 diverse viti) e composti flavonoidi (3 foglie per ogni tipo di vite prelevando una foglia da 3 diverse viti).

Le osservazioni dei flavonoidi sono state condotte su 3 foglie fresche per ognuno dei gruppi di viti sopra citati, subito dopo la raccolta. Da ogni foglia sono state ottenute 3 sezioni per un totale di 9 sezioni per gruppo. Tutte le osservazioni sono state effettuate secondo il protocollo riportato in Calzarano et al., (2014).

Analisi statistiche

Le differenze nella manifestazione dei sintomi fogliari, rilevata nelle diverse tesi a confronto, sono state analizzate statisticamente tramite test $\chi 2$ (Chi-quadro), secondo il metodo riportato in Calzarano et al., (2014). I relativi valori di *P* erano moderatamente significativi, significativi e molto significativi rispettivamente per valori < 0,1, <0,05 e <0,001.

Gli zuccheri riducenti e l'acidità totale alla raccolta negli acini di viti sane e asintomatiche, trattate e non trattate, i livelli di *trans*-resveratrolo nelle foglie di viti sane, asintomatiche e sintomatiche, trattate e non trattate, le aree fogliari e il numero e peso dei grappoli delle viti sane e asintomatiche, trattate e non trattate, sono stati analizzati tramite confronti a coppie con lo Student's *t*-test ($p \leq 0,05$) e ($p \leq 0,1$). I dati descritti sono stati analizzati tramite sistema SAS 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

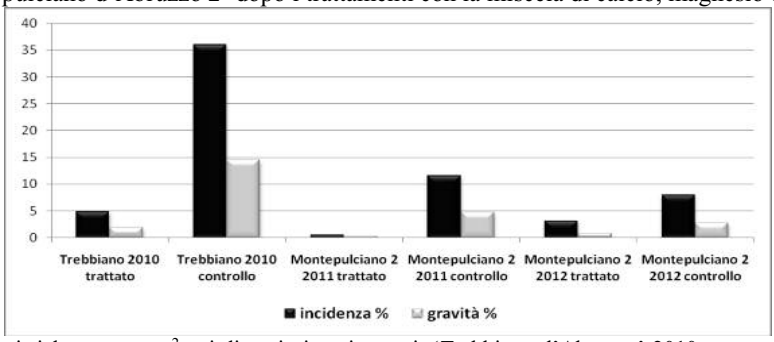
Il numero di druse nelle foglie dei diversi gruppi di viti confrontati è stato analizzato tramite analisi della varianza a una via seguita da test LSD per $p \leq 0,05$ (Statistica, version 7.1, Statsoft, Tulsa, USA).

RISULTATI

Effetto sui sintomi fogliari di GLSD

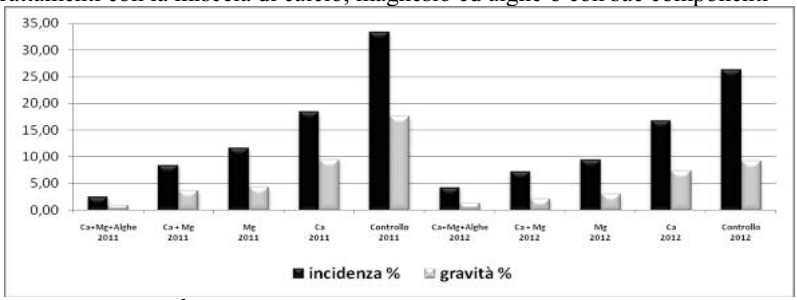
Nel 2010 l'incidenza e la gravità dei sintomi fogliari nel vigneto 'Trebbiano d'Abruzzo' sono stati fortemente ridotti dalla miscela completa (figura 1). Nel 2011 e 2012 l'efficacia della miscela completa è stata confermata in tutti i vigneti (figure 2 e 3), mentre una riduzione di minore entità è stata ottenuta dalla miscela $CaCl_2$ + $Mg(NO_3)_2$, e anche dalle singole componenti, sebbene in misura ancora più ridotta (figure 2 e 3). Solo la miscela completa ha sortito risultati statisticamente significativi in tutti i casi, eccetto nel 2012 nel 'Montepulciano d'Abruzzo 1', verosimilmente per la ridotta incidenza dei sintomi manifestata in tale anno anche nel testimone.

Figura 1. Incidenza e gravità dei sintomi fogliari di GLSD nei vigneti 'Trebbiano d'Abruzzo' e 'Montepulciano d'Abruzzo 2' dopo i trattamenti con la miscela di calcio, magnesio ed alghe



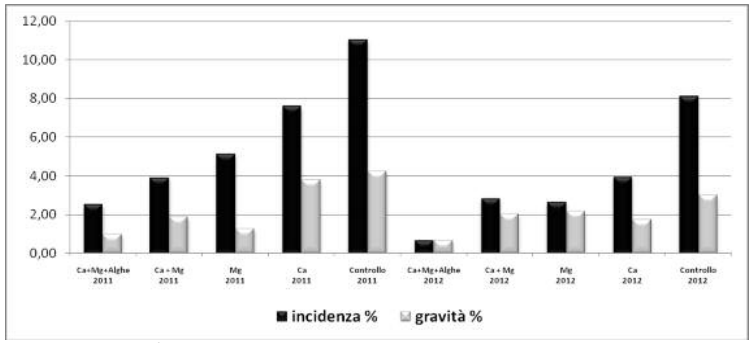
Analisi statistiche con test χ^2 nei diversi vigneti e anni: 'Trebbiano d'Abruzzo' 2010 trattato-controllo: incidenza *P*=<0,0001, gravità *P*=<0,0001; 'Montepulciano d'Abruzzo 2' 2011 trattato-controllo: incidenza *P*=<0,0001, gravità *P*=0,0004; 'Montepulciano d'Abruzzo 2' 2012 trattato-controllo: incidenza *P*=0,0650, gravità *P*=0,0581

Figura 2. Incidenza e gravità dei sintomi fogliari di GLSD nel vigneto 'Trebbiano d'Abruzzo' dopo i trattamenti con la miscela di calcio, magnesio ed alghe o con sue componenti



Analisi statistiche con test χ^2 nel vigneto 'Trebbiano d'Abruzzo': Ca+Mg+alghe trattato-controllo 2011: incidenza *P*=<0,0001, gravità *P*=<0,0001, 2012: incidenza *P*=<0,0001, gravità *P*=0,0006; Ca+Mg trattato-controllo 2011: incidenza *P*=<0,0001, gravità *P*=0,0002, 2012: incidenza *P*=0,0006, gravità *P*=0,0029; Mg trattato-controllo 2011: incidenza *P*=0,0008, gravità *P*=0,0004, 2012: incidenza *P*=0,0045, gravità *P*=0,0133; Ca trattato-controllo 2011: incidenza *P*=0,0135, gravità *P*=0,0353, 2012: incidenza *P*=0,0944, gravità *P*=0,5274.

Figura 3. Incidenza e gravità dei sintomi fogliari di GLSD nel vigneto 'Montepulciano d'Abruzzo 1' dopo i trattamenti con la miscela di calcio, magnesio ed alghe o con sue componenti



Analisi statistiche con test χ^2 nel vigneto 'Montepulciano d'Abruzzo 1': Ca+Mg+alghe trattato-controllo 2011: incidenza *P*=0,0039, gravità *P*=0,0243, 2012: incidenza *P*=0,0022, gravità *P*=0,1037; Ca+Mg trattato-controllo 2011: incidenza *P*=0,0765, gravità *P*=0,1888, 2012: incidenza *P*=0,1460, gravità *P*=0,6110; Mg trattato-controllo 2011: incidenza *P*=0,1516, gravità *P*=0,0545, 2012: incidenza *P*=0,2539, gravità *P*=0,9737; Ca trattato-controllo 2011: incidenza *P*=0,4252, gravità *P*=0,8354, 2012: incidenza *P*=0,2541, gravità *P*=0,4487.

Effetto sulle aree fogliari

Nelle viti trattate non sono mai stati riscontrati effetti fitotossici né alterazioni della crescita vegetativa. Le aree fogliari medie di viti sane misurate nel 2012, nel vigneto 'Trebbiano d'Abruzzo', non differivano statisticamente tra tralci primari trattati, 29293 cm^2, e non trattati, 27036 cm^2 (*P*=0,41), o tra tralci secondari trattati, 35312 cm^2, e non trattati, 41702 cm^2 (*P*=0,42). Le aree fogliari medie di viti asintomatiche differivano invece tra tralci primari trattati, 37656 cm^2, e non trattati, 27829 cm^2 (*P*=0,0005), ma non tra tralci secondari trattati, 46227 cm^2, e non trattati, 53958 cm^2 (*P*=0,62).

Effetto su quantità e qualità della produzione e sui livelli di *trans*-resveratrolo

Un incremento di produzione statisticamente significativo è stato riscontrato nel 2012, nel vigneto 'Trebbiano d'Abruzzo', nelle viti sane trattate con la miscela completa, sia in termini di peso (P=0,035) che di numero di grappoli (P=0,036), con valori di 136,1 Kg e 337 grappoli nelle viti trattate e 88,8 Kg e 241 grappoli nelle non trattate. Un incremento significativo veniva registrato anche nelle viti asintomatiche trattate, 180,1 Kg e 409 grappoli, contro 120,1 e 310 grappoli delle viti non trattate (produzione: P=0,073; numero grappoli: P=0,093).

Nella maggioranza dei casi la qualità della produzione veniva incrementata nelle viti trattate con la miscela completa. Nel 2012, nel vigneto 'Montepulciano d'Abruzzo 1' gli zuccheri riducenti e l'acidità totale si attestavano su valori di 235,8 e 220,0 g/L (P=0,00004), e 8,29 e 8,87 g/L (P=0,04) nelle viti sane trattate e non trattate, rispettivamente; 238,4 e 220,1 g/L (P=0,00002), e 8,30 e 8,43 g/L (P=0,71) nelle viti asintomatiche trattate e non trattate, rispettivamente. Nel medesimo anno, nel vigneto 'Trebbiano d'Abruzzo' venivano riscontrati valori simili di zuccheri riducenti e acidità totale, 193,8 e 198,3 g/L (P=0,37), e 5,57 e 5,30 g/L (P=0,27) nelle viti sane trattate e non trattate, rispettivamente, e significativamente differenti per i medesimi parametri, 198,4 e 188,3 g/L (P=0,37), e 5,81 e 7,13 g/L (P=0,27) nelle viti asintomatiche trattate e non trattate, rispettivamente.

Nel vigneto 'Trebbiano d'Abruzzo' è stato riscontrato un significativo ($p<0,05$) incremento di *trans*-resveratrolo in pre-chiusura grappolo, dopo aver effettuato tutti i trattamenti previsti, nelle foglie di tutti i gruppi di viti trattate: viti sane: non trattate 6,95 e 6,94, trattate 11,17 e 10,03 ppm/ss; viti asintomatiche: non trattate 8,53 e 8,53, trattate 10, 43 e 12,87 ppm/s.s; viti sintomatiche: non trattate 17,83 e 19,44, trattate 25,46 e 27,43 ppm/s.s., nel 2010 e nel 2011 rispettivamente.

Analisi istologiche

Le tecniche adottate hanno permesso di osservare druse di ossalato di calcio più grandi, in maggior numero (11,83 e 15,4 mm nel 2010 e 2011), e localizzate in prossimità dei fasci vascolari, nelle foglie asintomatiche trattate con la miscela completa, rispetto a quelle delle foglie sane e asintomatiche non trattate, non dissimili fra loro (7,99 e 8,05 mm nel 2010; 11,1 e 11,05 mm nel 2011) e presenti a maggior distanza dai fasci vascolari. I confronti a coppie con lo Student's t-test hanno attestato come significative le differenze tra le superfici delle druse nelle foglie di viti asintomatiche trattate e quelle delle foglie di viti sane non trattate (P=0,003 e P=0,010 nel 2010 e 2011) o delle viti asintomatiche non trattate (P=0,003 e P=0,010 nel 2010 e 2011).

Nelle foglie fresche di viti asintomatiche trattate con la miscela completa veniva osservata una intensa e uniforme fluorescenza giallo brillante, decisamente più discontinua e meno intensa nelle foglie di viti sane e asintomatiche non trattate, indicante un superiore accumulo di flavonoidi rispetto a quello di queste ultime.

DISCUSSIONE

La miscela di fertilizzanti fogliari a base di cloruro di calcio, nitrato di magnesio, ed estratti di alghe si è dimostrata efficace nella riduzione dei sintomi sulla chioma di GLSD. I trattamenti con tale miscela non agiscono sui funghi che colonizzano i tessuti legnosi delle viti malate ma interferiscono con i meccanismi che determinano lo sviluppo delle clorosi e necrosi negli spazi internervali delle foglie. In tal modo i trattamenti aumentano il naturale processo di mascheramento dei sintomi, per il quale solo una frazione delle viti malate manifesta sintomi mentre l'altra, in dipendenza delle condizioni ambientali, mostra sintomi attenuati, non proporzionali all'entità della colonizzazione dei tessuti legnosi, o appare totalmente asintomatica (Surico et al., 2006).

La significativa riduzione dei sintomi fogliari è stata ottenuta con la miscela a tre componenti nella quale gli estratti di alghe agiscono plausibilmente come veicolo d'ingresso dei nutrienti nei tessuti fogliari. I trattamenti con miscele di calcio e magnesio senza alghe o con i singoli Sali hanno sortito effetti decisamente inferiori, al pari di quelli effettuati con sole alghe in altre sperimentazioni (Di Marco e Osti, 2009; Calzarano, dati non pubblicati).

L'incremento di *trans*-resveratrolo sempre riscontrato nelle foglie di tutti i tipi di viti trattate, così come il superiore contenuto di flavonoidi nelle foglie di viti asintomatiche trattate, hanno indicato la verosimile induzione di una risposta di difesa. I metaboliti secondari, come i flavonoidi, sono infatti coinvolti nei meccanismi di difesa della pianta da agenti biotici o abiotici (Lima et al., 2012). L'effettuazione dei trattamenti durante la crescita vegetativa, a partire dalle fasi subito successive al germogliamento, è sembrata causare una precoce attivazione delle risposte di difesa interferendo con il "burst" ossidativo, cui consegue il danno fogliare probabilmente determinato dai fattori di virulenza veicolati dal legno alla chioma tramite il flusso linfatico. Valtaud *et al*, (2011) hanno indicato una relazione tra l'incremento di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e la diminuzione dei carotenoidi e del loro relativo effetto di protezione dal danno ossidativo nelle foglie di viti infette da esca che stanno iniziando ad esprimere i sintomi. Nel presente lavoro le osservazioni istologiche hanno rivelato un incremento di flavonoidi in pre-chiusura grappolo nelle foglie di viti trattate che rimangono asintomatiche indicando l'attivazione di una risposta di difesa della pianta (Treutter, 2006) nel periodo che precede la comparsa massiva dei sintomi nel vigneto.

I nutrienti, come Ca^{2+}, oggetto del presente lavoro, potrebbero avere un ruolo nell'attenuazione della risposta ossidativa che causa clorosi e necrosi internervali (Lima et al., 2012). Gli effetti benefici di Ca^{2+} sono stati descritti in numerosi patosistemi (Biggs et al., 1994). Tali effetti potrebbero essere correlati agli accumuli di calmodulina che regola l'acido salicilico che innesca la reazione di difesa riducendo la reazione di ipersensibilità (Lecourieux et al., 2006; Du et al., 2009). Inoltre un elevato contenuto di calcio negli spazi intercellulari può essere associato all'incremento della sintesi di fitoalessine (Tavernier et al., 1995). In aggiunta, il calcio ha la capacità di legarsi alle pectine (Conway et al., 1991) conferendo una particolare resistenza meccanica alle pareti cellulari (Kratzke, 1988). La capacità del calcio nel rinforzare le pareti cellulari è stata indicata dal superiore contenuto di druse di ossalato di calcio nelle foglie delle viti trattate che rimanevano asintomatiche. Tali druse sono una delle forme di stoccaggio di Ca^{2+} nei tessuti fogliari (Lecouriex et al., 2006).

Un ulteriore rilevante aspetto del calcio in una malattia come la GLSD potrebbe consistere nel suo ruolo di ritardo della senescenza fogliare, come dimostrato in *Arabidopsis* e in altre piante (Ma et al., 2010). Infatti la 'tigratura' fogliare è stata descritta come conseguenza di un precoce invecchiamento nelle zone del mesofillo internervali (Andolfi et al., 2011) e pertanto il ruolo del calcio nel ritardare tale processo potrebbe essere rilevante.

Le differenti funzioni del magnesio nelle piante agrarie sono state ampiamente descritte (Marschner, 2012), mentre Il ruolo del magnesio nella difesa dalle malattie è molto meno conosciuto di quello del calcio e i non numerosi studi effettuati presentano aspetti discordanti (Jones e Huber, 2007). Il magnesio è una componente essenziale della clorofilla e la sua carenza porta generalmente alla clorosi. Nelle foglie di vite la carenza di magnesio si manifesta con sintomi simili a quelli provocati dalla GLSD, comportando clorosi e necrosi internervali. Tale elemento potrebbe avere un ruolo più diretto nella interazione pianta-patogeno. Colrat (1999) ha descritto l'attivazione di un processo di detossificazione di fitotossine determinato da Mn^{2+} e Mg^{2+} nelle infezioni da *Eutypa lata*. L'eutipina viene trasformata dalle cellule di vite in eutipinolo, composto non tossico, ed è stato ipotizzato che la suscettibilità all'eutipiosi sia fortemente legata alla capacità delle cellule di detossificare

l'eutipina. Pertanto si può ritenere possibile una simile attività nei confronti delle tossine prodotte dai patogeni del complesso esca.

CONCLUSIONI

I trattamenti con la miscela completa descritti nel presente lavoro hanno ridotto significativamente incidenza e gravità dei sintomi sulla chioma di GLSD, stimolato l'attività vegetativa, come dimostrato dalla superiore superficie delle foglie dei tralci primari, nonché aumentato quantità e qualità della produzione. Inoltre non sono mai stati riscontrati fenomeni di fitotossicità. Pertanto tali risultati, che rappresentano il primo efficace trattamento fogliare per ridurre i sintomi di GLSD, dopo la più moderata riduzione ottenuta con il Fosetyl Al (Di Marco et al., 2011), incoraggiano l'utilizzo della miscela fertilizzante sperimentata e rappresentano un nuovo approccio per lo sviluppo di una strategia di difesa nei confronti di questa complessa malattia.

La particolare riduzione dei sintomi fogliari e il miglioramento dei parametri produttivi determinati dalle influenze sui processi fisiologici e sulle caratteristiche istologiche hanno indotto al deposito di una domanda di brevetto (Domanda di brevetto italiano n. RM2014A000097 del 3 marzo 2014) sull'utilizzo di miscele di cloruro di calcio e/o nitrato di magnesio e alghe del genere *Fucales* per il contenimento dei sintomi a carico dell'apparato epigeo di viti colpite da malattie del complesso esca che si manifestano con tigrature fogliari, concesso dall'Ufficio Italiano Marchi e Brevetti del Ministero dello Sviluppo Economico con numero 0001422954 (Titolare: Università degli Studi di Teramo; Inventore: Dott. Francesco Calzarano), in data 18/07/2016, e attualmente in fase di estensione in Europa.

LAVORI CITATI

Andolfi A., Mugnai L., Luque J., Surico G., Cimmino A., Evidente A., 2011. Phytotoxins produced by fungi associated with grapevine trunk diseases. *Toxins* 3 (12), 1569-1605.

Biggs A.R., El-Kholi M.M., El-Neshawy S.M, 1994. Effect of calcium salts on growth, pectic enzyme activity, and colonization of peach twigs by *Leucostoma persoonii*. *Plant Disease* 78, 886-890.

Calzarano F., Seghetti L., Del Carlo M., Cichelli A., 2004. Effect of esca on the quality of berries, musts and wines. *Phytopathologia Mediterranea* 43, 125-135.

Calzarano F., Amalfitano C., Seghetti L., D'Agostino V., 2007. Foliar treatment of esca proper affected vines with nutrients and bio activators. *Phytopathologia Mediterranea* 46, 207-217.

Calzarano F., D'Agostino V., Del Carlo M., 2008. Trans-resveratrol extraction from grapevine: application to berries and leaves from vines affected by esca proper. *Analytical Letters* 41, 1-13.

Calzarano F., Amalfitano C., Seghetti L., Cozzolino V., 2009. Nutritional status of vines affected with esca proper. *Phytopathologia Mediterranea* 48, 20-31.

Calzarano F., D'Agostino V., Osti F., Di Marco S., 2013. Levels of *trans*-resveratrol in leaves of vines affected with "esca". *In*: Protection and Production in Viticulture, IOBC/WPRS Bulletin Vol. 85, 129-136.

Colrat S., Deswarte C., Latché A., Klaébe K., Bouzayen M., Fallot J., Roustan J.P., 1999. Enzymatic detoxification of eutypine, a toxin from *Eutypa lata*, by *Vitis vinifera* cells: partial purification of an NADPH-dependent aldehyde reductase. *Planta* 207, 544-550.

Conway W.S., Sams C.E., Abbott J.A., Bruton B.D., 1991. Postharvest calcium treatment of apple fruit to provide broad-spectrum protection against postharvest pathogens. *Plant Disease* 75, 620-622.

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., Calzarano F., Roberti R., Veronesi A., Amalfitano C., 2011. Effects of grapevine applications of fosetyl-aluminium formulations for downy mildew control on "esca" and associated fungi. *Phytopathologia Mediterranea* 50, S285-S299.

Du L., Ali G.S., Simons K.A., Hou J., Yang T., Reddy A.S.N., Poovaiah B.W., 2009. Ca^{2+}/ calmodulin regulate salicylic-acid-mediated plant immunity. *Nature* 457, 1154-1158.

Jones J.B., Huber D.M., 2007. Magnesium and plant disease. *In*: Mineral Nutrition and Plant Disease, (Datnoff L.E., ed.), American Phytopathological Society, St. Paul, MN, USA, 95-100,

Kratzke M.G., 1988. Study of mechanism of calcium uptake by potato tubers and of cellular properties affecting soft rot. Ph. D. Thesis, University of Wisconsin, MD, USA.

Lecourieux D., Ranjeva R, Pugin A., 2006. Calcium in plant defence-signalling pathways. *New Phytologist* 171, 249-269.

Lima M.R.M., Ferreres F., Dias A.C.P., 2012. Response of *Vitis vinifera* cell cultures to *Phaeomoniella chlamydospora*: changes in phenolic production, oxidative state and expression of defence-related genes. *European Journal of Plant Pathology* 132, 133-146.

Ma W., Smigel A., Walker R.K., Moeder W., Yoshioka K., Berkowitz, G.A., 2010. Leaf senescence signaling: The Ca^{2+}-conducting Arabidopsis cyclic nucleotide gated channel2 acts through nitric oxide to repress senescence programming. *Plant physiology 154*, 733-743.

Marschner P. (ed), 2012. Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants (Third Edition). Elsevier Ltd.

McKinney H.H., 1923. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. *Journal of Agricultural Research* 26, 195-218.

Rolshausen P.E., Úrbez-Torres J.R., Rooney-Latham S., Eskalen A., Smith R.J., Gubler W.D., 2010. Evaluation of pruning wound susceptibility and protection against fungi associated with grapevine trunk diseases. *American Journal of Enology and Viticulture* 61 (1), 113-119.

Surico G., Mugnai L., Marchi G., 2006. Older and more recent observations on esca, a critical overview. *Phytopathologia Mediterranea* 45, S68-S86.

Surico G., Mugnai L., Marchi G., 2008. The esca disease complex. *In*: Integrated Management of Diseases Caused by Fungi, Phytoplasma and Bacteria. (Ciancio A., Mukerji K.G., ed.) Springer, Heidelberg, Germany, 119-136.

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. *In*: Il Mal dell'Esca della Vite: Interventi di ricerca e Sperimentazione per il Contenimento Della Malattia. Progetto MesVit. (Surico G., Mugnai L., ed.), Arsia Regione Toscana, Firenze, Italy, 276-291.

Tavernier E., Wendehenne D., Blein J.P., Pugin A., 1995. Involvement of free calcium in action of cryptogein, a proteinaceous elicitor of hypersensitive reaction in tobacco cells. *Plant Physiology* 109, 3, 1025-1031.

Treutter D., 2006. Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environmental Chemistry Letters* 4, 147-157.

Valtaud C., Thibault F., Larignon P., Bertsch C., Fleurat-Lessard P., Bourbouloux A., 2011. Systemic damage in leaf metabolism caused by esca infection in grapevines. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 17 (1), 101-110.