

MODIFICAZIONI ISTOLOGICHE INDOTTE DA MAL DELL'ESCA SULLA VITE

Lucia ANDREINI^{1*}, Raffaella VITI², Giancarlo SCALABRELLI²

¹ Scuola Superiore Sant'Anna, P.zza Martiri della Libertà, 33 – 56127 Pisa

² Dipartimento di Coltivazione e Difesa delle Specie Legnose "G. Scaramuzzi", Università di Pisa, Via del Borghetto, 80 - 56124 Pisa

*landreini@sss.up.it, fax 050 883204

Poster presentato ad Enoforum, 21-23 aprile 2009, Piacenza, Italia

Riassunto

La ricerca ha inteso studiare le caratteristiche istologiche di germogli uviferi campionati da piante di Cabernet Sauvignon, Sangiovese e Trebbiano affette dal Mal dell'Esca. Nell'arco di un triennio il materiale è stato prelevato da: piante sintomatiche (S); piante che non avevano mai mostrato sintomi di Mal dell'Esca (NoS) e da piante che erano risultate sintomatiche l'anno precedente (PAS). Su quest'ultime piante della cultivar Cabernet Sauvignon, dalla fioritura all'inizio dell'allegagione, e prima della comparsa dei sintomi, sono stati selezionati germogli dai quali sono stati prelevati piccioli di foglie basali e apicali. Alla manifestazione dei primi sintomi i piccioli sono stati campionati da foglie apicali e asintomatiche. Dopo la comparsa dei sintomi di Mal dell'Esca, dall'allegagione all'invaiaitura, da piante sintomatiche e asintomatiche di Cabernet Sauvignon, Sangiovese e Trebbiano sono stati prelevati piccioli e internodi. Previa fissazione ed inclusione i tessuti sono stati sezionati e le sezioni fini colorate (Cristal violetto-Eritrosina B) per identificare la lignificazione delle pareti cellulari. La caratteristica principale, dei tessuti di piante sintomatiche, era il minore ispessimento delle pareti cellulari, in particolare degli elementi vascolari. Tale variazione è stata osservata analogamente nei tre vitigni sia a livello dei tessuti degli internodi che nei piccioli. L'alterazione della colorazione delle pareti dei vasi xilematici, rilevata nei piccioli prima della comparsa dei sintomi fogliari, suggerisce di poter valutare l'opportunità di utilizzare in futuro l'analisi istologica come un potenziale metodo per la precoce rilevazione dell'Esca.

Summary

This work aimed to study the histological characteristics of Esca symptomatic leaves petioles and internodes sampled from grapevine plants of 'Cabernet Sauvignon', 'Sangiovese' and 'Trebbiano'. Materials were collected during three-year period from: symptomatic vines (SV); vines that never showed Esca symptoms (NES); vines that in the previous years resulted symptomatic and that could be expected to show again foliar symptoms (PYS). On these vines, before Esca appearance, were selected three shoots from which petioles were collected from basal and apical portions. After leaf symptoms appearance, petioles were collected from the apical leaves that had not yet exhibited Esca symptoms. The tissues were fixed in FAA, embedded in Histoplast and transversally sectioned (7µm) by a Shandon microtome. The thin sections were stained with Crystal violet and Erythrosin B to identify the lignified cell walls.

Histological observations were carried out by optical microscope and showed different characteristics in relation to vine health. The main feature of tissues infected by Esca disease was the minor lignification of vascular tissues. This deficiency was detected revealing the presence of lignin by the specific stain. Specifically, this feature was observed in petiole tissues before appearance of visual Esca symptoms. The opportunity to utilize in the future the histological examination of petiole tissues as a method for the early detection of Esca infections was hypothesized.

Introduzione

Il Mal dell'Esca è una complessa patologia nota fin da quando è iniziata la coltivazione della vite ed è considerata in Europa, come in altre parti del mondo, una delle più dannose patologie che colpiscono i tessuti legnosi della vite. Il Mal dell'Esca comprende una serie di sintomi che derivano da modifiche strutturali e fisiologiche che non possono essere ridotte alla semplice relazione di causa – effetto. Come conseguenza ne deriva che sintomi che appaiono simili possono essere originati da cause differenti (Mugnai *et al.*, 1999). I sintomi possono comparire, da giugno a settembre, in forma lieve o severa, benché esistano casi in cui entrambe le tipologie si possano verificare sulla stessa pianta (Surico *et al.*, 2000; Dubos, 2002). I sintomi di lieve entità sono caratterizzati dal deterioramento dell'apparato fogliare a partire dalle porzioni basali dei tralci, le foglie inizialmente sono interessate da piccole aree di tessuto internervale che dapprima mostra soltanto un ingiallimento, in seguito i tessuti necrotizzano. I grappoli possono presentare a loro volta i sintomi sull'epidermide degli acini, in ogni

modo il grappolo non raggiunge la piena maturità. La forma severa del Mal dell'Esca consiste in una rapida morte della pianta, chiamata apoplezia: consiste in un repentino appassimento che determina la morte dell'intera pianta o di una parte di essa (Larignon and Dubos, 1997, Surico *et al.*, 2000).

Negli ultimi 10 anni il Mal dell'Esca ha acquistato sempre più importanza in tutti i paesi Europei impegnati nella coltivazione della vite, dove l'incidenza della patologia è significativamente incrementata. In Italia la sindrome è segnalata in tutte le regioni viticole, registrando annualmente incidenze percentuali anche molto diverse da un anno all'altro, che nei casi più gravi può determinare anche la morte della totalità delle piante del vigneto. La fluttuazione della presenza dei sintomi è una delle caratteristiche che rende difficoltoso lo studio della patologia (Mugnai *et al.*, 1999).

Nonostante le numerose sperimentazioni realizzate sul Mal dell'Esca, le alterazioni istologiche a carico dei tessuti interessati dalla patologia, resta un argomento ancora da esaminare e che potrebbe dare un ulteriore contributo volto alla comprensione del complesso meccanismo che sta alla base del Mal dell'Esca. Lo scopo di questo lavoro era quello di studiare da un punto di vista istologico le caratteristiche di piccioli e internodi di germogli sintomatici.

Materiali e metodi

La prova sperimentale è stata svolta nel triennio 2005-2007 in un vigneto al ventiquattresimo anno di produzione situato a Colignola (Pisa), presso i campi sperimentali del Dipartimento di Coltivazione e Difesa delle Specie Legnose (Altitudine 6 m, 43.02 N, 10.36 E). Il vigneto con sesto d'impianto 3 x 1 m, è costituito da 4 varietà (*Sangiovese*, *Cabernet Sauvignon*, *Trebbiano*, *Chardonnay*), le cui piante, allevate a cordone libero, sono disposte in senso trasversale alla lunghezza del vigneto in quattro blocchi randomizzati ciascuno di 15 piante. L'attività di ricerca è stata condotta su tre dei quattro vitigni: *Sangiovese*, *Cabernet Sauvignon*, *Trebbiano*. Il *Cabernet Sauvignon* è conosciuto essere un vitigno sensibile al Mal dell'Esca, e *Sangiovese* e *Trebbiano* sono due vitigni, uno a bacca rossa e l'altro bianca, ampiamente diffusi sul territorio nazionale.

- **Prima e all'inizio della comparsa dei sintomi di Mal dell'Esca** (dalla fioritura alle prime fasi dell'allegagione) i prelievi del materiale sono stati effettuati da piante di *Cabernet Sauvignon*, genotipo conosciuto essere molto suscettibile al Mal dell'Esca. Su piante che non sono mai state sintomatiche, considerate sane e quindi di controllo (NoS); e su piante (5) che erano risultate sintomatiche l'anno precedente (PAS), prima della comparsa dei sintomi sono stati selezionati tre germogli con numero simile di nodi (compreso tra 24 e 27) dai quali sono stati prelevati piccioli di foglie basali e apicali. Al fine di campionare materiale con la stessa età, all'interno di ogni porzione i piccioli sono stati prelevati da uno stesso tratto di germoglio costituito da 3 nodi. In corrispondenza della manifestazione dei primi sintomi fogliari nella parte basale del germoglio i prelievi sono stati realizzati dalle foglie apicali asintomatiche.

- **Dopo la comparsa dei sintomi del Mal dell'Esca**, (dall'allegagione all'invaiaatura) da piante sintomatiche (S) e asintomatiche (NoS) di *Cabernet Sauvignon*, *Sangiovese* e *Trebbiano* campioni di piccioli e internodi (n=10) sono stati prelevati dalla porzione mediana ed apicale di germogli costituiti da un numero simile di nodi e compreso tra 30 e 33. Al fine di campionare materiale vegetale il più possibile omogeneo dal punto di vista dell'età e delle caratteristiche di vigoria dei germogli uviferi, i prelievi sono stati effettuati seguendo gli stessi criteri sopra riportati. Il materiale prelevato è stato fissato in FAA (etanolo, acido acetico, formaldeide in rapporto 8:1:1 v/v) e, previa disidratazione in una serie alcolica crescente, sono stati inclusi in Histoplast e sezionati al microtomo (Shandon) in senso trasversale (7 μ m). Con lo scopo di evidenziare la lignificazione degli elementi vascolari, le sezioni sono state colorate mediante Cristal violetto ed Eritrosina B (Clark, 1981). Il Cristal violetto è un colorante cationico che possiede un'elevata affinità per la lignina (Drnovsek and Perdih, 2005), rilevandone la presenza con una colorazione blu-violacea. I preparati istologici sono stati osservati al microscopio ottico (Nikon, Fluophot) in luce polarizzata equipaggiato con fotocamera digitale per l'acquisizione di immagini.

Risultati e discussione

Dallo studio microscopico delle sezioni fini realizzate su porzioni di internodi e piccioli, sono emerse differenti caratteristiche, in funzione della sanità del materiale.

Caratteristiche istologiche dei tessuti prima della comparsa dei sintomi dell'Esca.

All'inizio della fioritura delle piante di *Cabernet Sauvignon* (Figura 1 A, D), quando i sintomi fogliari dell'Esca non erano ancora visibili, i tessuti dei piccioli di foglie basali e apicali prelevati da piante che hanno mostrato sintomi l'anno precedente (PAS), erano del tutto simili ai tessuti di controllo (NoS). Nei piccioli basali le pareti cellulari dei vasi e delle fibre del meta-xilema erano lignificate (Figura 1A) presentando una regolare colorazione viola. Nei piccioli apicali gli elementi vascolari mostravano una debole colorazione in accordo con lo stadio giovanile della foglia (Figura 1 D).

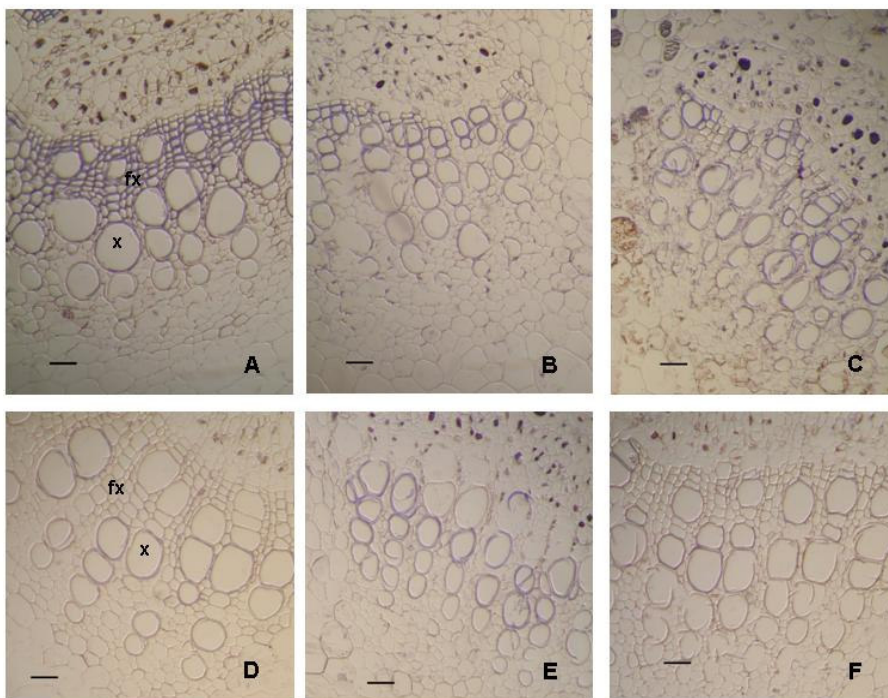


Figura 1. Sezioni trasversali rappresentative porzioni di fasci vascolari di piccioli prelevati da piante di *Cabernet Sauvignon* che nel precedente anno erano risultate sintomatiche. Piccioli campionati dalla parte basale (A, B, C) ed apicale (D, E, F) del germoglio alla fioritura (A, D), allegazione (B, E) e invaiatura (D, F).

x: vasi xilematici del meta-xilema, fx: fibre xilematiche. Barra: 50 μ m

Durante le prime fasi dell'allegazione (Figura 1 B, E) le piante PAS ancora non presentavano sintomi di Esca, mentre i piccioli basali ed apicali mostravano i tessuti xilematici poco lignificati rispetto al rilievo precedente. Questo difetto è evidenziato dalla scarsa intensità della colorazione degli elementi vascolari che denota una minore deposizione di lignina sulle pareti cellulari. Questa stessa caratteristica è stata osservata nei piccioli di foglie sintomatiche le quali presentavano le pareti cellulari dei vasi (x), le fibre xilematiche (fx), e quelle sclerenchimatiche a protezione dei fasci (fs) poco lignificate (Fig. 5 e 6). All'inizio dell'invaiatura (Figura 1 C, F), quando i sintomi fogliari erano chiaramente visibili soltanto nella parte basale del tralcio, i piccioli di foglie apicali ancora asintomatiche mostravano i tessuti vascolari poco lignificati e parzialmente danneggiati.

Caratteristiche istologiche dei tessuti dopo la comparsa dei sintomi dell'Esca.

La caratteristica principale dei tessuti affetti dal Mal dell'Esca, che è stata ritrovata in tutte le cultivars esaminate, è la minore lignificazione dei tessuti, in particolare di quelli vascolari.

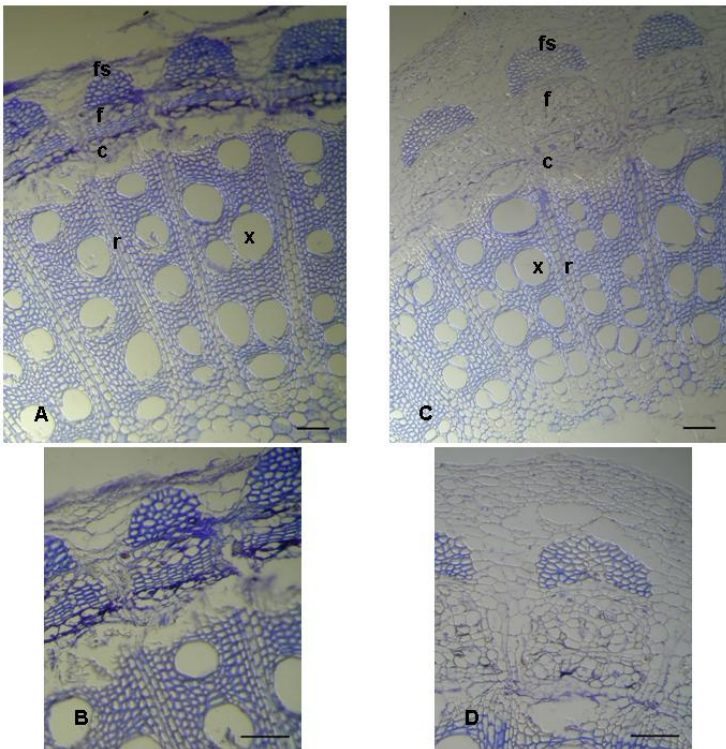


Figura 2. Porzione di sezioni trasversali di internodi mediани prelevati all'invaiaitura da piante di Sangiovese: sane (A), con sintomi di Mal dell'Esca (C) e rispettivi particolari (B e D). fs: fibre sclerenchimatiche; f: floema; c: cambio; x: xilema; r: raggio parenchimatico. Barra: 100 μ m.

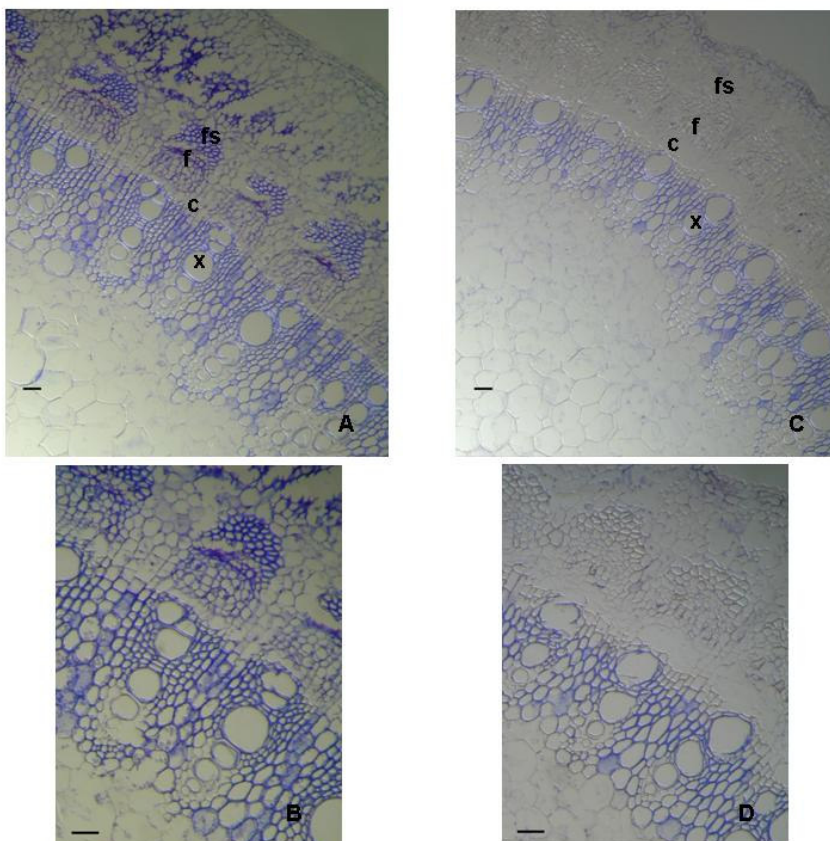


Figura 3. Porzioni di sezioni trasversali di internodi apicali prelevati all'invaiaitura da piante di Sangiovese: sane (A), con sintomi di Mal dell'Esca (C) e rispettivi particolari (B e D). fs: fibre sclerenchimatiche; f: floema; c: cambio; x: vaso xilematico. Barra: 50 μ m.

La minore lignificazione dei tessuti degli internodi era chiaramente visibile dalle sezioni fini di *Sangiovese* campionati all'invaiaitura (Figura 2 e 3), quando sui tralci erano riconoscibili le tipiche striature fogliari. In figura 2 (A) è riportato il particolare di una sezione trasversale rappresentativo di un internodo mediano prelevato da pianta sana. E' possibile notare il regolare ispessimento dei tessuti vascolari e parenchimatici rispetto ai tessuti di germogli danneggiati dall'Esca (Figura 2 C) e caratterizzati da debole colorazione. Situazione analoga è stata osservata nella parte apicale del germoglio (Figura 3 A, C). In particolare nei campioni interessati dalla malattia si notava la minore lignificazione delle fibre sclerenchimatiche, molto marcata nella porzione apicale del germoglio (Figura 3 D) rispetto a quella mediana (Figura 2 D).

Caratteristiche simili erano osservate anche in campioni di internodi mediani prelevati all'allegagione da piante sintomatiche di *Trebbiano* (Figura 4): gli elementi xilematici e le fibre sclerenchimatiche presentavano il minor ispessimento delle pareti cellulari, rilevata attraverso la loro scarsa o assente colorazione.

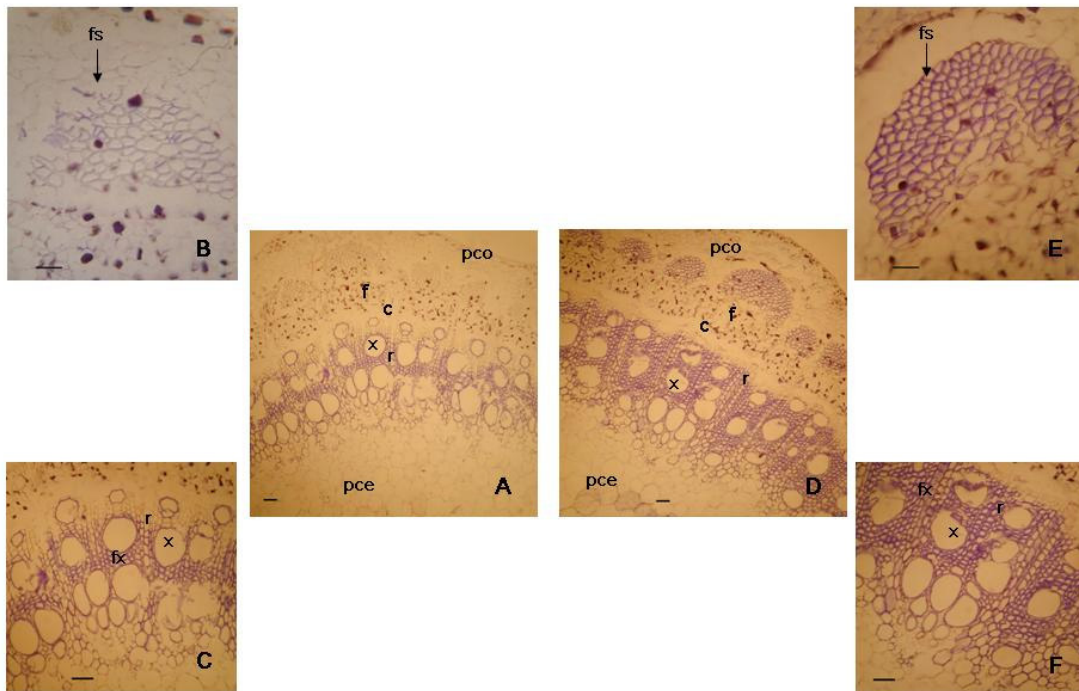


Figura 4. Particolari di sezioni trasversali di internodi mediani prelevati all'invaiaitura da piante di *Trebbiano*: sintomatiche (A, B, C) e sane (D, E, F). pco: parenchima corticale; fs: fibre sclerenchimatiche; f: floema; c: cambio; x: vaso xilematico; r: raggio parenchimatico; fx: fibre xilematiche; pce: parenchima centrale. B, E: barra 30 μ m; A, C, D, F: barra 50 μ m).

L'esame istologico dei piccioli ha confermato quanto osservato a livello degli internodi (Figure 5 e 6). A livello della zona corticale del picciolo di foglie sintomatiche si è osservata inoltre una maggiore disgregazione delle cellule parenchimatiche (Figure 7C); mentre, a livello del parenchima centrale, le cellule apparivano prive di turgore ed in parte collassate (Figura 7D). Al contrario nei piccioli di foglie sane i tessuti si presentavano integri e normalmente lignificati (Figure 5, 6, 7).

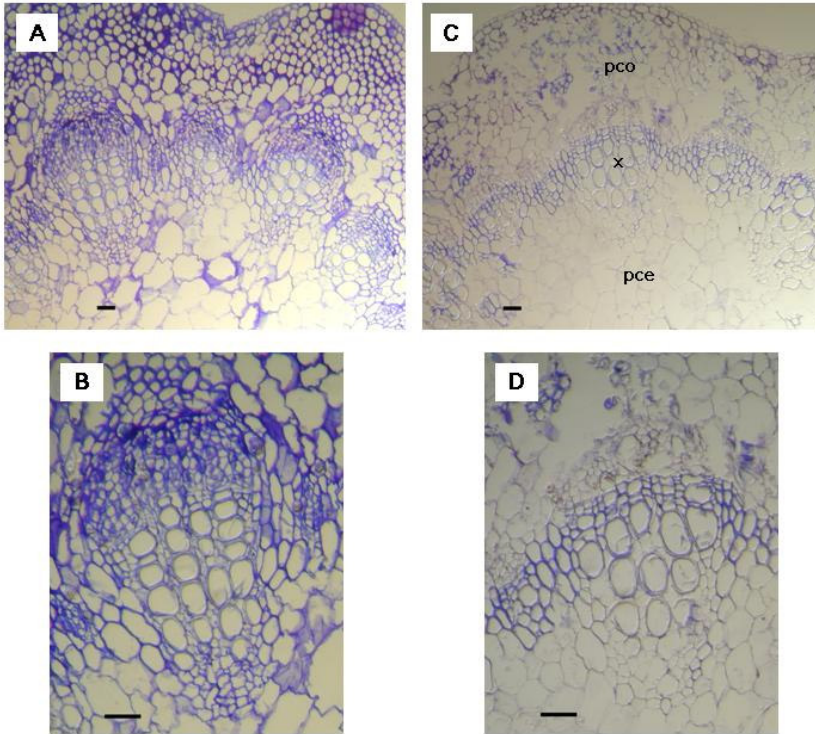


Figura 5. Porzioni di fasci cribro-vascolari in sezione trasversale di piccioli campionati all'invasatura da piante di Sangiovese: sane (A), sintomatiche (C) e rispettivi particolari (B e D). pco: parenchima corticale; x: xilema; pce: parenchima centrale. Barra: 50 μ m.

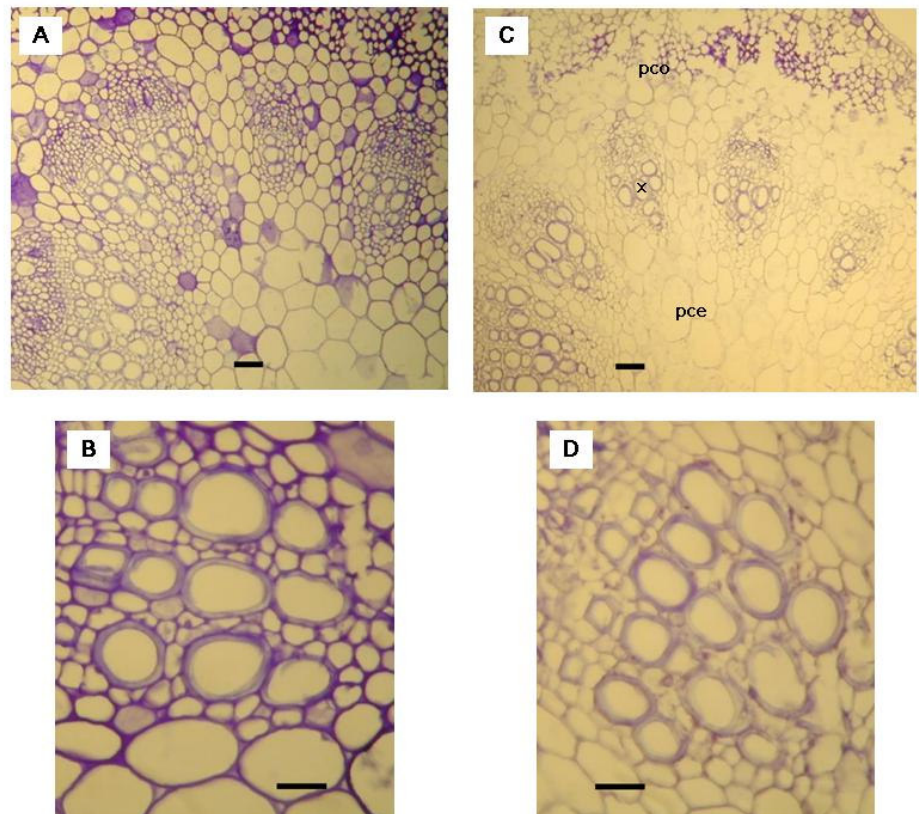


Figura 6. Particolari di fasci cribro-vascolari in sezioni trasversali di piccioli campionati all'invasatura da piante di Cabernet Sauvignon: sane (A, B) e sintomatiche (C, D). pco: parenchima corticale; x: xilema; pce: parenchima centrale. A, C: barra 70 μ m; B, D: barra 30 μ m

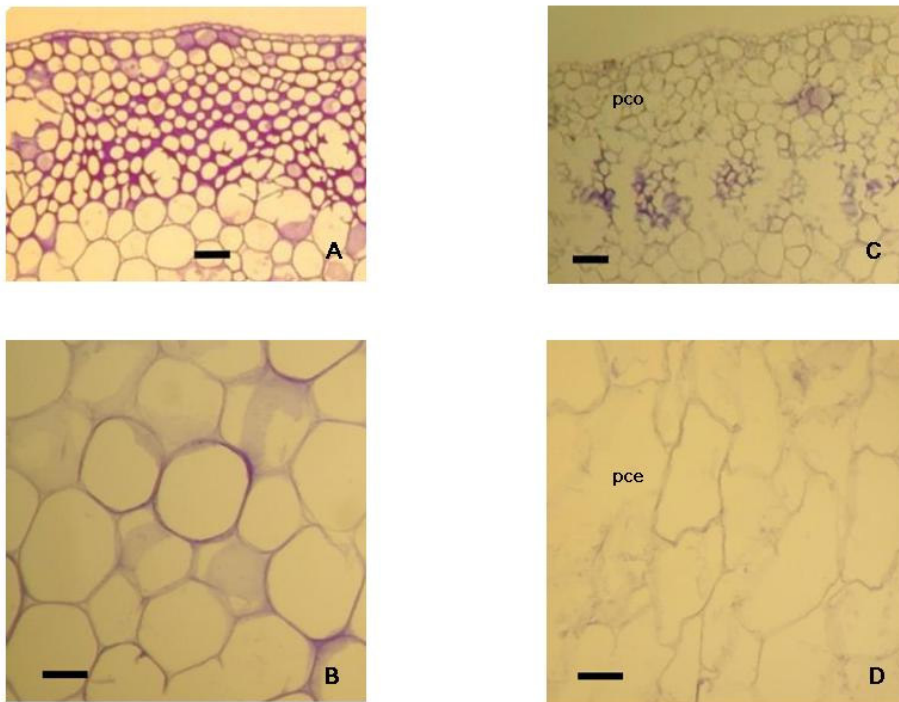


Figura 7. Particolari di cellule del parenchima corticale e centrale in sezioni trasversali di piccioli campionati all'invaiaitura da piante di Cabernet Sauvignon: sane (A, B) e sintomatiche (C, D). pco: parenchima corticale; pce: parenchima centrale. Barra: 50 μ m.

Conclusioni

La peculiarità principale dei tessuti vegetali interessati dal Mal dell'Esca, è rappresentata dalla loro minore lignificazione, in particolare dei tessuti vascolari. Inoltre i tessuti parenchimatici hanno mostrato aree interessate da degradazione cellulare. Queste alterazioni dei tessuti affetti dalla malattia sono state riscontrate in modo analogo nei tre vitigni esaminati e si sono ripetute nei tre anni di sperimentazione. Lo studio istologico dei tessuti di piccioli e internodi di vite affette da Mal dell'Esca ha messo in evidenza queste caratteristiche istologiche in entrambi gli organi studiati.

La minore colorazione delle pareti cellulari e degli elementi vascolari è stata in parte confermata da un'altra colorazione Safranina e Fast Green (dati non riportati) tuttavia si rende necessario di convalidare ulteriormente questo risultato mediante altre specifiche colorazioni per evidenziare la diversa lignificazione delle pareti cellulari. Qualora venisse confermato quanto osservato rimarrebbe da verificare se la minore lignificazione delle pareti degli elementi vascolari, rilevata prima della comparsa dei sintomi fogliari su piante di Cabernet Sauvignon, sia comune agli altri vitigni. In caso positivo l'esame istologico potrebbe rappresentare un metodo utile per rilevare un fattore "spia" dell'insorgenza della malattia.

Ringraziamenti

Ricerca svolta nell'ambito del Progetto interregionale "Ricerca e sperimentazione in vivaio e in campo per il contenimento del mal dell'esca della vite" (MESVIT) commissionato da ARSIA e finanziato dal Ministero per le Politiche Agricole e Forestali.

Bibliografia

- A.A. 1981. Staining procedures. Fourth Edition. Edited by CLARK G. Williams & Wilkins Baltimore, MD, USA.
- DRNOVSEK T., PERDIH A. 2005. Selective staining as a tool for wood fibre characterization. *Dyes and Pigments*, 67: 197-206.
- DUBOS B., 2002. Le syndrome de l'esca. In: *Maladies cryptogamiques de la vigne*. Eds. Féret, (Bordeaux): 127-136.
- LARIGNON P., DUBOS B., 1997. Fungi associated with esca disease in grapevine. *European Journal of Plant Pathology*, 103:147-157.
- MUGNAI L., GRANITI A., G. SURICO, 1999. Esca (Black Measles) and Brown Wood-Streaking: Two Old and Elusive Diseases of Grapevines. *Plant Disease*, 83(5): 404-418.
- SURICO G., MARCHI G., FERRANDINO F. J., BRACCINI P., MUGNAI L., 2000. Analysis of the spatial spread of esca in some Tuscan vineyards (Italy). *Phytopathol. Mediterr.* 39: 211-224.