

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE PER L'AGRICOLTURA, LE
FORESTE, LA NATURA E L'ENERGIA**

DAFNE

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA

Ortofloroarboricoltura XXIV Ciclo

TITOLO TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

**Valutazione del diverso grado di tolleranza di varietà di *Vitis vinifera*
tradizionalmente coltivate in Italia Centrale
a *Plasmopara viticola* ed *Erysiphe necator***

settore scientifico-disciplinare
AGR/03

Coordinatore: Prof. Alberto Graifemberg

Firma

Tutor: Dott. Massimo Muganu

Firma.....

Dottorando: Marco Paolucci

Firma

Riassunto

Negli ultimi anni una maggiore sensibilità verso le problematiche ambientali e una crescente attenzione del consumatore nei confronti degli aspetti nutrizionali e salutistici delle produzioni vitivinicole, hanno stimolato il mondo scientifico ad approfondire lo studio delle relazioni tra la vite e i suoi patogeni per cercare di sviluppare strategie operative in grado di tutelare maggiormente l'ambiente agrario e migliorare la qualità dei prodotti.

Sulla base di osservazioni in campo si evidenzia che, pur non essendo *Vitis vinifera sativa* resistente ai più diffusi patogeni fungini, sono stati rilevati diversi livelli di tolleranza tra varietà e biotipi coltivati. L'obiettivo di questa tesi è stato quello di caratterizzare e studiare la tolleranza di cinque vitigni coltivati nel territorio del Centro Italia nei confronti di due tra le principali malattie parassitarie della vite: la peronospora, *Plasmopara viticola*, e l'oidio, *Erysiphe necator*.

Sono state effettuate sia osservazioni in pieno campo che prove in laboratorio su foglia staccata e su dischi fogliari. Inoltre sono state anche osservate alcune caratteristiche anatomiche dei tessuti fogliari allo scopo di verificare eventuali rapporti con i diversi gradi di tolleranza evidenziati. Sono state studiate le fasi di sviluppo dei patogeni all'interno dei tessuti nel caso della peronospora, e sulla superficie fogliare nel caso dell'oidio. Sono state analizzate le risposte biochimiche messe in atto dalla pianta a seguito dell'infezione di *P. viticola* quantificando con la HPLC le fitoalessine di natura stilbenica.

Le prove di tolleranza a *P. viticola* hanno messo in evidenza differenze significative nella severità dei sintomi tra i vitigni. In particolare livelli apprezzabili di tolleranza sono stati evidenziati per le varietà Trebbiano giallo e Romanesco, mentre le due varietà a bacca nera Aleatico e Canaiolo nero si sono dimostrate molto suscettibili alla malattia. Il confronto tra i risultati ottenuti con le diverse modalità di infezione utilizzate ha permesso di evidenziare il ruolo importante svolto dalla tecnica di inoculazione sull'efficacia dell'infezione, soprattutto in presenza di tessuti molto tomentosi. Nelle prove eseguite, gli inoculi meno concentrati si sono dimostrati meno discriminanti per la valutazione della tolleranza dei singoli vitigni. Le osservazioni condotte con microscopia a fluorescenza a 24 e 48 hpi, hanno confermato la minore suscettibilità di Trebbiano giallo a *P. viticola*, mentre l'elevata diffusione del patogeno a 72 hpi è giustificata dai bassi livelli di viniferine rilevati in questa varietà.

Anche lo studio della tolleranza ad oidio ha evidenziato differenze significative tra i vitigni in prova. Le varietà Trebbiano giallo e Romanesco, sia nelle osservazioni di campo che nelle infezioni condotte in ambiente controllato su dischi fogliari, hanno evidenziato una maggiore tolleranza ad oidio rispetto a tutti gli altri vitigni studiati. Trebbiano toscano, altra varietà a bacca bianca inserita nelle prove, ha evidenziato livelli di tolleranza sicuramente inferiori a Trebbiano

giallo e Romanesco ma comunque superiori alle due varietà a bacca nera Aleatico e Canaiolo nero. All'interno di ogni singola varietà il livello di suscettibilità della vegetazione non è risultato sempre corrispondente a quello dei grappoli. Nel caso di Canaiolo nero, infatti, alla bassa severità rilevata sui grappoli corrisponde un elevato livello di suscettibilità della vegetazione. Le osservazioni per mezzo della microscopia a fluorescenza hanno messo in evidenza che il maggiore grado di tolleranza mostrato da Trebbiano giallo e Romanesco si manifesta nelle prime fasi infettive.

Abstract

The attention for environmental safety and the wide market requirement of wines able to express territory characteristics, increased the interest of researchers and viticulturist for local grape varieties. *Vitis vinifera* local germplasm can includes minor varieties which characteristics are often unknown with respect to genetic profile, viticultural and enological potential and level of resistance to biotic stresses, particularly respect the widespread fungal pathogens downy mildew (*Plasmopara viticola*) and powdery mildew (*Erysiphe necator*). The aim of this study was to characterize the susceptibility to downy and powdery mildew of five grape varieties belonging to the enological tradition of central Italy. Morphological features of leaf were analysed in the different varieties as possible natural defence mechanisms. Field observations and laboratory experiments on leaf disks and detached leaves were carried out to analyse the different susceptibility to the diseases. Epifluorescence microscopy was applied to study pathogens growth on leaf tissues and the content of stilbenes was assessed by HPLC in *P. viticola* inoculated leaves.

Results showed significant differences among grape varieties with respect to susceptibility to *P. viticola* and *E. necator*. Trebbiano giallo and Romanesco varieties showed lower susceptibility to the pathogens compared to Aleatico and Canaiolo nero. Epifluorescence technique allowed us to determine differences among varieties with respect to the primary developmental stages of pathogen infections.

Indice

Introduzione	6
CAPITOLO I	9
Peronospora (<i>Plasmopara viticola</i>)	
Classificazione, ciclo ontogenetico ed esigenze biologiche di <i>Plasmopara viticola</i>	
Sintomatologia	
Lotta	
Meccanismi di resistenza a <i>Plasmopara viticola</i>	
• Meccanismi di difesa costitutivi • Meccanismi di difesa indotti • Produzione di stilbeni	
CAPITOLO II	23
Oidio (<i>Erysiphe necator</i>)	
Sintomatologia	
Classificazione, ciclo ontogenetico ed esigenze biologiche di <i>Erysiphe necator</i>	
Lotta	
Meccanismi di resistenza a <i>Erysiphe necator</i>	
• Meccanismi di difesa costitutivi • Meccanismi di difesa indotti	
CAPITOLO III	38
Obiettivo della tesi	
Vitigni scelti per le prove	
CAPITOLO IV	43
Valutazione della tolleranza dei vitigni a <i>Plasmopara viticola</i>	
• Materiali e metodi	
A) Osservazioni eseguite in pieno campo	
B) Studio delle caratteristiche anatomiche della foglia	
C) Prove di inoculazione in ambiente controllato	

D) *Studio dello sviluppo del patogeno nei tessuti per mezzo della microscopia ottica a fluorescenza*

E) *Quantificazione delle viniferine stilbeniche in tessuti fogliari inoculati*

- **Risultati**

A) *Resistenza alla malattia in pieno campo*

B) *Caratteristiche anatomiche della foglia*

C) *Prove di inoculazione in ambiente controllato*

D) *Sviluppo del patogeno nei tessuti fogliari*

E) *Quantificazione delle viniferine stilbeniche in tessuti fogliari inoculati*

- **Discussione**

CAPITOLO V.....66

Valutazione della tolleranza a *Erysiphe necator*

- **Materiali e metodi**

A) *Osservazioni eseguite in pieno campo*

B) *Prove di inoculazione in ambiente controllato su dischi fogliari*

C) *Studio dello sviluppo del patogeno sui tessuti fogliari mediante microscopia ottica a fluorescenza*

- **Risultati**

A) *Resistenza alla malattia in pieno campo*

B) *Livelli di tolleranza in ambiente controllato su dischi fogliari*

C) *Sviluppo del patogeno sui tessuti fogliari*

- **Discussione**

CONCLUSIONI.....76

BIBLIOGRAFIA.....77

INTRODUZIONE

La storia della viticoltura è legata in maniera indissolubile alla storia dell'uomo, considerati il consumo diretto dei frutti della vite ed il loro utilizzo nella produzione di vino già in epoche preistoriche. Tracce preclare restano non solo nei resti ritrovati negli scavi archeologici che hanno portato alla luce molti semi di vite nei pressi di abitati di epoca villanoviana nell'Italia centrale, ma anche per le numerosissime “pestarole”, ovvero pigiatoi rupestri sparsi in diverse aree del nostro territorio (Figura 1). Questi sono costituiti da grosse vasche, spesso comunicanti su livelli differenti, ottenute scavando grandi rocce affioranti; in particolare nel Lazio sono formati da un bacino destinato alla pigiatura di forma più o meno quadrata, collegato ad un tino, quadrato od ovale, posto ad un livello inferiore. La loro datazione risulta complicata e potrebbe risalire al primo millennio a C., anche se il loro uso è documentato anche in epoca medievale (Brun, 2007).

La produzione del vino è stata dapprima legata alla raccolta dei frutti della vite selvatica, ma ben presto è avvenuta la domesticazione della specie in almeno sei centri differenti che vanno dai più antichi, situati in area anatolica e caucasica, a quelli più recenti del Mediterraneo Occidentale e dell'Europa Centrale. Due di questi centri sono stati localizzati nella penisola italiana. Lo studio della domesticazione della vite è complicato dall'esistenza di areali più ampi, chiamati di paradomesticazione, ove la specie veniva protetta e sfruttata, ma cresceva ancora spontaneamente (Forni, 2007). Questo poteva certamente accadere in virtù anche delle esigenze ecologiche della vite selvatica che crescendo preferibilmente in località umide e fertili trovava habitat favorevoli presso gli accampamenti umani vicini ai corsi d'acqua e soprattutto presso gli “immondezzei” ricchi di sostanze organiche in decomposizione. Anche in Italia la presenza di vite selvatica, *V. vinifera sylvestris*, è documentata in siti archeologici a partire dal Neolitico, mentre vinaccioli di *Vitis vinifera sativa*, datati al IX secolo a.C., sono stati ritrovati nell'area del Gran Carro, località presso Bolsena, in provincia di Viterbo. Studi più recenti hanno poi anticipato fino all'Età del Bronzo la presenza di resti di vite coltivata (Costantini e Costantini Biasini, 1999). Lo sviluppo delle civiltà del Mediterraneo si è poi intrecciato profondamente alla coltivazione di questa pianta che dai paesi del Sud è arrivata a conquistare la gran parte dell'Europa e le zone limitrofe di Asia ed Africa, seguendo gli spostamenti dei popoli e gli scambi commerciali. Basta pensare all'introduzione nell'Italia meridionale delle tecniche colturali e delle pregiate cultivar orientali prima dello sviluppo della Magna Grecia. La vitivinicoltura è stata fondamentale nello sviluppo dell'agricoltura mediterranea triadica, cereali-ulivo-vite, sulla quale poi si è basata prima la civiltà greca, poi quella romana. Nel Medioevo, dopo il crollo dell'Impero Romano ed il tramonto della cultura Classica, la vite, legata alla

liturgia cristiana, è stata protetta e diffusa dai monaci. Nel Basso Medioevo, Pier de Crescenzi, elenca e descrive in Italia numerosissime varietà di vite, di cui molte ancora coltivate, che venivano utilizzate per la produzione di vini pregiati di cui il commercio era tornato molto fiorente. La storia della vite ha una soluzione di continuità nel XIX secolo quando, per quella che oggi chiameremmo globalizzazione, si diffusero in Europa alcuni patogeni e fitofagi fino a quel momento sconosciuti nel Vecchio Continente. In breve tempo divennero endemici dapprima l'oidio probabilmente per l'importazione di specie di interesse ornamentale, poi la fillossera, importata con specie del genere *Vitis* impiegate in programmi di ibridazione con *V. vinifera sativa*, ed infine la peronospora, giunta con materiale di propagazione utile contro la fillossera. Questi eventi, come noto, determinarono la fine di una millenaria tradizione vitivinicola e la necessità di ricercare soluzioni alle nuove problematiche fitopatologiche, ottenute soprattutto con l'introduzione della tecnica di innesto e con l'impiego massiccio di sostanze chimiche. Negli ultimi anni però, una maggiore sensibilità verso problematiche ambientali e una maggiore attenzione del consumatore nei confronti degli aspetti nutrizionali e salutistici delle produzioni vitivinicole, hanno stimolato il mondo scientifico ad approfondire lo studio delle relazioni tra la vite e i suoi patogeni e parassiti per cercare di mettere a disposizione del mondo produttivo strategie operative in grado di tutelare maggiormente l'ambiente agrario, fornendo al contempo prodotti di maggiore qualità valorizzando il legame con il territorio e con la tradizione. Anche l'utilizzo di vitigni o cloni storicamente legati al territorio può rispondere alla necessità di ridurre i costi di produzione e l'impatto ambientale delle tecniche produttive grazie ad una potenziale maggiore tolleranza alle avversità ed un maggior adattamento alla situazione ambientale che alcuni di questi genotipi possono manifestare. A tal proposito la scelta di varietà meno suscettibili ai due principali patogeni della vite, *Plasmopara viticola* ed *Erysiphe necator*, può costituire una strategia importante nell'ambito della difesa integrata ed anche favorire la diminuzione dei quantitativi di fitofarmaci utilizzati. Anche nelle regioni viticole in cui alcuni patogeni legati a condizioni ambientali particolari, come *P. viticola* che necessita di un elevato livello di umidità ambientale e di piogge, non causano danni importanti tutti gli anni, la scelta di genotipi più tolleranti può limitare la diffusione di scoppi epidemici delle malattie.

Negli ultimi anni molti sforzi sono stati rivolti allo studio del genoma della vite europea ed alla comprensione dei meccanismi genetici che regolano le risposte di difesa nei confronti dei patogeni. *Vitis vinifera* però non possiede geni di resistenza contro gli agenti causali di oidio e peronospora, al contrario di specie di origine americana appartenenti allo stesso genere, che con questi patogeni si sono evolute, e con alcune specie asiatiche. Già nel XIX secolo tuttavia, in concomitanza con l'esplosione delle malattie giunte dal continente americano, le osservazioni

degli ampelografi avevano messo in evidenza diversi gradi di suscettibilità ai vari patogeni tra le varietà di *Vitis vinifera*. Mentre però la comparazione dei livelli di resistenza tra specie diverse del genere *Vitis* o fra ibridi interspecifici è stata spesso indagata a diversi livelli (Staud e Kassemeyer, 1995; Dai *et al.*, 1995 Wang *et al.*, 1995; Sotolář, 2007; Staudt, 1997; Plavoušek, 2007; Liu *et al.* 2008; Cadle-Davidson, 2008; Jürges *et al.*, 2009; Cadle-Davidson *et al.*, 2011), minore attenzione è stata rivolta allo studio dei vitigni tradizionali ed alle loro caratteristiche di tolleranza a patogeni. La comprensione dei meccanismi che regolano le risposte di difesa nell'ambito delle varietà di *Vitis vinifera* potrebbe invece favorire sia protocolli di breeding più rapidi che strategie di lotta più efficaci e questo permetterebbe al contempo di valorizzare il grande e variegato patrimonio di vitigni minori e/o autoctoni presente in Paesi come il nostro di antichissima tradizione viticola, e di favorire tecniche produttive con costi di gestione minore e più sostenibili anche dal punto di vista ambientale.



Figura 1: “pestarola” rinvenuta nel territorio di Soriano nel Cimino (Viterbo)

CAPITOLO I

Peronospora (*Plasmopara viticola*)

L'agente causale della peronospora della vite è *Plasmopara viticola* (Berk et Curt.) Berlese et de Toni, patogeno originario del Nord America arrivato in Europa probabilmente con il materiale vivaistico importato in Francia per le attività di ibridazione successive all'avvento distruttivo della fillossera. L'anno della prima segnalazione nel Vecchio Continente è stato il 1878 mentre l'anno successivo fu segnalata nel Nord Italia. Nel giro di pochissimi anni la malattia si diffuse in tutto il continente ed in Turchia. La prima vera dimostrazione del suo potenziale distruttivo fu nel 1893, quando il 50% della produzione francese andò persa per un attacco epidemico. Dall'inizio del secolo successivo, la malattia iniziò a manifestarsi in maniera regolare in dipendenza delle condizioni meteorologiche, causando danni gravissimi ai vigneti e forti flessioni della produzione soprattutto nei Paesi dell'Europa continentale, ma non risparmiando l'Italia. Prima dell'introduzione dei principi attivi di sintesi solo l'utilizzo massiccio di rame ha limitato i danni della malattia.

Classificazione, ciclo ontogenetico ed esigenze biologiche di *Plasmopara viticola*

L'oomicete *P. viticola* appartiene all'ordine *Peronosporales*, composto da circa duemila specie quasi tutte parassite di piante superiori. A questo ordine appartengono tre famiglie molto importanti per la patologia vegetale: *Pythiaceae*, cui appartiene il genere *Phytophthora*, *Albuginaceae* e *Peronosporaceae*. L'ultima famiglia comprende, tra gli altri, agenti causali di marciumi, tra cui anche *P. viticola*. Il primo a descrivere la malattia ed il patogeno che la causa è stato Farlow nel 1876, che lo chiamò *Peronospora viticola*. Nella prima metà del secolo era stato chiamato *Botrytis cana*, poi *Botrytis viticola*. De Bary, che ha anche classificato *Phytophthora infestans*, la peronospora della patata, chiarendone anche il ciclo, ha descritto il ciclo riproduttivo della peronospora della vite, rinominando il suo agente come *Peronospora viticola*. Solo successivamente dal genere *Peronospora* è stato separato il genere *Plasmopara*. Molto più recente è la separazione degli Oomiceti dal regno dei Funghi dai quali si differenziano per molti aspetti, tra i quali la parete cellulare composta di cellulosa e non chitina, nuclei diploidi e non aploidi o dicariotici e per la presenza di zoospore biflagellate. Nel 1880 Millardet ha identificato per primo le oospore del patogeno in Europa, mentre l'intero ciclo è stato descritto nei primi decenni del '900.

P. viticola sverna per mezzo delle oospore presenti nei tessuti fogliari in decomposizione. Durante la stagione fredda le oospore hanno bisogno sia di temperature basse che di abbondanza di precipitazioni. In primavera, le oospore mature germinano con temperature minime al suolo di

12°C e sufficiente umidità, producendo un macrozoosporangio. La germinazione si può protrarre anche per alcuni mesi, anche se ha un picco in primavera. Sono stati messi a punto molti modelli previsionali per la determinazione del momento in cui le oospore cominciano a germinare e l'entità della loro germinazione: questi modelli considerano le condizioni atmosferiche dell'inverno, i gradi giorno accumulati, i millimetri di pioggia in primavera (Rossi *et al.*, 2008; Caffi *et al.*, 2009). Già nel 1947 Baldacci (Baldacci, 1947) aveva messo a punto la regola chiamata “dei tre dieci”: per l'inizio della infezione primaria occorrono almeno 10°C di temperatura dell'aria e 10 millimetri di pioggia, oltre a foglie di almeno 6-8 cm² che corrispondono ad un germoglio di circa 10 cm di sviluppo. Tra i modelli più recenti si può citare “*Vitimeteo Plasmopara*” molto utilizzato in Svizzera e Germania (Viret *et al.*, 2005) e quello dinamico per predire le infezioni primarie di Caffi *et al.* (2009), ma ancora vengono utilizzati soprattutto modelli previsionali più vecchi come “Plasmo”, “Pro”, “Freiburg” e “Winemild”. Il macrozoosporangio una volta giunto sulla superficie fogliare, grazie agli schizzi di pioggia ed al vento, rilascia le zoospore che danno origine all'infezione primaria. Le zoospore penetrano attraverso le aperture stomatiche della pagina inferiore delle foglie all'interno della camera sottostomatica e cominciano lo sviluppo del micelio che si ramifica velocemente e produce le strutture austoriali necessarie a sottrarre nutrienti alle cellule del mesofillo senza però determinarne la morte. Il rapporto parassitario instaurato, infatti, si basa essenzialmente su una continuità tra la membrana plasmatica delle cellule della pianta ospite e gli austori che assorbono le molecole necessarie allo sviluppo del patogeno: il parassita, biotrofo obbligato, può sopravvivere dunque solo sfruttando cellule viventi. A temperature medie ed umidità relativa ottimali, l'oomicete colonizza tutto lo spazio intercellulare grazie alle ife ramificate ed in 6-7 giorni, è in grado di produrre rami sporangiofori che fuoriescono dalle aperture stomatiche, portando all'apice zoosporangi limoniformi. La sporulazione del patogeno richiede un minimo di umidità relativa del 98% ed almeno 4 ore di buio. L'intervallo di temperatura, invece, deve essere compreso tra 13 e 19° C. La sporulazione avviene al buio ed è completata in 7 ore ed è inibita da luce bianca o verde (Rumbolz *et al.*, 2002). La produzione di zoosporangi per ciascuna area di infezione non diminuisce con l'invecchiamento della stessa se non si verificano le condizioni per la sporulazione, ma cicli di sporulazione successivi ne diminuiscono la produttività. Gli zoosporangi sono dispersi dagli schizzi di pioggia e rilasciano in presenza di acqua libera da quattro a otto zoospore ciascuno (Riemann *et al.*, 2002). Le zoospore sono biflagellate e nuotano nel film liquido sulla superficie vegetale fino a raggiungere le aperture stomatiche attraverso le quali avviene la loro penetrazione, come già verificato nel 1911 da Müller-Thurgau, che aveva notato che inoculazioni della pagina superiore non producevano

sintomi. Con temperature ottimali di 22-24°C il rilascio delle zoospore, l'arrivo presso l'apertura stomatica e la penetrazione sono realizzati in 2 ore. Le zoospore nuotano verso le aperture stomatiche aperte in maniera attiva, facilitate da un'attrazione chemiotattile da parte degli stomi stessi, la cui natura non è stata tuttavia chiarita: sostanze candidate potrebbero essere amminoacidi, isoflavoni, pectine o frammenti della parete cellulare (Kiefer *et al.*, 2002); in altri patogeni è stata dimostrata l'influenza del campo elettrico (Morris e Nar, 1993). Inoltre è stata anche rilevata l'attrazione preferenziale di stomi già infetti sulle zoospore ancora libere, questo fenomeno chiamato adelfotattismo, causa l'attrazione e la germinazione di più spore nei pressi dello stesso stoma (Lalancette *et al.*, 1987; Thomas e Peterson, 1990). Una volta raggiunto lo stoma le zoospore si incistano, perdendo i flagelli, e germinano producendo un tubetto germinativo che raggiunta la cavità sottostomatica, si allarga in una vescicola. Da questa vescicola si origina successivamente un'ifa primaria dalla quale si sviluppa un micelio che si ramifica velocemente nello spazio intercellulare del parenchima spugnoso. Le zoospore sono molto delicate, sprovviste di parete e facilmente dissecano in mancanza di acqua: per questo la loro vita al di fuori dei tessuti dell'ospite è molto limitata. Di conseguenza questo periodo molto vulnerabile del ciclo vitale del patogeno deve essere ridotto al minimo: è per questo motivo che *Bremia lactucae*, peronospora della lattuga, non avendo più lo stadio di zoospora, è considerata la specie più evoluta.

Affinché la patogenesi abbia successo il primo austorio prodotto deve essere funzionale ed assicurare al parassita biotrofo le molecole necessarie al suo metabolismo. Le ife del patogeno si sviluppano allora rapidamente e producono a loro volta gli austori, particolari strutture di nutrizione, che entrano in stretto contatto con la membrana plasmatica delle cellule dell'ospite dopo aver superato la parete cellulare. Le ife sono di forma cilindrica nei tessuti più lassi mentre in quelli più compatti formano filamenti nodulosi e nelle vicinanze delle nervature sono finemente ramificate ed in grado di insinuarsi negli elementi sclerificati. I tessuti lacunosi sono colonizzati molto più rapidamente di quelli più lignificati. I vasi conduttori delle foglie, soprattutto quelle adulte, costituiscono una barriera fisica alla crescita del patogeno mentre nelle foglie giovani questo può vincere le barriere meccaniche e diffondersi anche nelle zone adiacenti. Nelle foglie adulte, in condizioni ottimali di crescita per il patogeno, il micelio riempie gli spazi intercostali in 96 ore dall'inizio dell'infezione (Unger *et al.*, 2007). La massima sensibilità da parte delle foglie è quando raggiungono un diametro di circa 3 cm, con la maturazione poi divengono meno suscettibili (Boso *et al.*, 2005).

L'esplosione epidemica della malattia è legata ai cicli asessuati che si ripetono durante la stagione vegetativa in presenza di condizioni favorevoli, quindi con estati umide e temperate. A

fine stagione, nelle foglie con “peronospora a mosaico”, il patogeno si riproduce per via sessuata eterogamica; lo spermatocista feconda l’oosfera contenuta nell’oogonio che dunque si trasforma in oospore. Le oospore, poi, restano nelle foglie morte che cadono al suolo e durante l’inverno maturano se sottoposte a condizioni ambientali freddo-umide, mantenendo la loro vitalità per almeno due anni.

Dopo poco più di un secolo dalla sua introduzione in Europa, *P. viticola* ha mostrato una grande variabilità genetica soprattutto nelle regioni viticole del Centro Europa, ed in minor misura in Italia ed in Grecia. Sono state messe a punto analisi genetiche, basate su marcatori molecolari RAPD e SSR, che hanno permesso di distinguere le infezioni derivanti da oospore e da conidi (Matasci *et al.*, 2010). Le differenze genetiche riscontrate lasciano supporre l’esistenza di razze fisiologiche (patotipi), confermata anche dall’esistenza di isolati resistenti ad alcuni principi attivi. Nelle regioni con inverni sfavorevoli alla maturazione delle oospore, la variabilità genetica del patogeno è limitata e le infezioni successive sono causate da pochi genotipi per riproduzione asessuata. In Francia ed Italia è stata riscontrata una maggiore variabilità genetica in primavera, quindi durante lo sviluppo delle infezioni primarie derivate dalle oospore (Matasci *et al.*, 2010), come evidenziato anche in areali viticoli di Germania e Svizzera. Invece nel restante periodo della stagione vegetativa della vite è stato rilevato nei vigneti un numero inferiore di genotipi del patogeno (Pertot *et al.*, 2003), generalmente uno o due genotipi dominanti. Ciò evidenzia che la maggior parte delle infezioni primarie non danno luogo ad infezioni secondarie e che nei vigneti sono presenti molte popolazioni clonali. Tuttavia prove di patogenicità eseguite impiegando isolati differenti del patogeno su varietà di *V. vinifera* con diversi gradi di suscettibilità, hanno determinati livelli di infezione leggermente diversi (Kast *et al.*, 2009), in parte attribuibili anche alla non completa resistenza dei vitigni (Kortekamp *et al.*, 1998), che quindi possono venir attaccati in particolari condizioni ambientali e biologiche particolari.

Sintomatologia

Il sintomo visibile dell’avvenuta infezione sulle foglie di vite è la classica presenza di “macchie d’olio” traslucide che compaiono dopo un periodo di incubazione variabile a seconda della temperatura ambientale e della natura dei tessuti vegetali. Ai limiti delle macchie d’olio si formano delle marginature brunastre, poi i tessuti imbruniscono, disseccano e le foglie infine cadono. Sulle foglie vecchie a causa della minore diffusione del patogeno, le macchie sono molto piccole e poligonali, imbruniscono velocemente formando il tipico mosaico. Con umidità ambientale elevata in corrispondenza delle macchie, sulla pagina inferiore delle foglie, compaiono i rami conidiofori che formano un tipico feltro biancastro facilmente riconoscibile.

Solo quando le condizioni ambientali sono molto umide, i rami conidiofori appaiono prima delle macchie traslucide. I danni causati dalle infezioni del patogeno sono molteplici e riguardano vari organi. Infatti, se è vero che il patogeno può attaccare solo i tessuti verdi della vite, ove sono presenti gli stomi, le conseguenze di infezioni gravi possono compromettere il metabolismo generale delle piante. La diminuzione dell'attività fotosintetica è ovviamente la conseguenza più evidente della colonizzazione delle foglie e si ripercuote sia sulla nutrizione dei grappoli in accrescimento che sulle riserve negli organi legnosi e nelle radici. La malattia ha però anche effetti sulla fisiologia generale della pianta, ad esempio sugli scambi gassosi. Studi sulla regolazione stomatica hanno dimostrato che gli stomi dei tessuti infetti restano aperti anche al buio e durante stress idrici, aumentando molto i livelli di traspirazione. Questo fenomeno, non sistemico, è stato collegato alla produzione, da parte del patogeno o dei tessuti colonizzati della vite, di una sostanza che agisce sulla regolazione stomatica alterandola o all'anormale livello di pressione delle cellule epidermiche: osservazioni istologiche hanno verificato infatti che la presenza di vescicole del patogeno nella camera sottostomatica non è responsabile dell'alterato funzionamento delle cellule guardia (Allègre *et al.*, 2007). Anche i germogli erbacei possono venire colpiti dalle infezioni: in tal caso l'agostamento dei tralci è impedito con conseguenti danni da gelo in inverno.

A carico delle infiorescenze le infezioni possono essere gravi e causare forti perdite nelle annate più umide; sui peduncoli e sui fiori compaiono macchie olivastre e successivamente un feltro miceliare biancastro. Anche i germogli erbacei possono venire colpiti dalle infezioni: in tal caso l'agostamento dei tralci è impedito con conseguenti danni da gelo in inverno. I danni diretti sui grappoli colpiti possono essere gravi nelle annate favorevoli allo sviluppo della malattia, anche quando le infezioni sono tardive. Sui giovani grappoli si ha la formazione di un "marciume grigio" con la produzione di un feltro biancastro sugli acini ed una caratteristica curvatura del rachide ad S o ad uncino, mentre sui grappoli prossimi all'invaiaatura, si evidenzia un "marciume bruno" poiché i tessuti imbruniscono e gli acini si spaccano, marciscono e cadono. Questa seconda forma è conseguente ad attacchi su acinelli più grandi in cui gli stomi sono degenerati in lenticelle, dunque il patogeno non vi può penetrare. Penetra perciò attraverso gli stomi del rachide e il micelio negli acini non riesce ad evadere e produrre i tipici rami sporangiofori; è quindi, questa, una forma larvata che conferisce agli acini il caratteristico colore bruno ("uva col negron") e più rara dato che si verifica solo in annate molto favorevoli al patogeno. La resistenza ontogenetica degli acinelli però si manifesta in maniera variabile in funzione sia della cultivar e delle variazioni stagionali che influenzano i tempi della fioritura (Kennelly, 2005).

Lotta

La lotta alla peronospora ha fin da subito potuto sfruttare l'efficacia del rame metallo, dapprima utilizzato sotto forma di solfato di rame. Le soluzioni acquose di solfato di rame sono fitotossiche per la vite a causa della forte acidità, perciò il solfato di rame viene utilizzato insieme ad una base, generalmente idrossido di calcio, fino a raggiungere la neutralità: il miscuglio ottenuto è tradizionalmente conosciuto come "poltiglia bordolese" ed in epoche passate ha permesso di salvare la viticoltura europea. A differenza di *E. necator*, che si sviluppa sulla superficie della pianta ospite, *P. viticola* colonizza i tessuti internamente perciò il rame ha un'azione di copertura ed è efficace se utilizzato prima dell'infezione. Il rame agisce probabilmente a livello della membrana di cui modifica la permeabilità, si sostituisce a ioni calcio e magnesio nella parete cellulare, ma soprattutto interferisce con i processi ossidoriduttivi e respiratori; la sua azione è dunque multisito quindi è molto difficile per i patogeni sviluppare resistenze. Negli ultimi decenni la chimica ha messo a disposizione dei viticoltori molte molecole di sintesi, tra cui i ditiocarbammati, le fenilammidi, le acetammidi e gli analoghi delle strobilurine; alcune sono efficaci anche nel combattere lo sviluppo del patogeno dopo la sua penetrazione nei tessuti della pianta poiché transaminari o sistemiche, ma l'elevata specificità di molti principi attivi può causare l'insorgenza di resistenze nel patogeno. Tuttavia l'utilizzo del rame rimane ancora elevato in viticoltura, particolarmente nella conduzione in biologico, anche se da tempo sono stati evidenziati i suoi effetti negativi sugli agroecosistemi, in particolar modo a livello del suolo, ove si accumula. L'Unione Europea ha legiferato in questa direzione con il Regolamento E.C. n. 473/2002 che fissa i quantitativi massimi di rame utilizzabili per ettaro e per anno, per cui la ricerca di prodotti con una percentuale ridotta del metallo o principi attivi alternativi al rame stesso è sempre più urgente, soprattutto per la gestione in biologico (Dagostin *et al.*, 2006; Muganu *et al.*, 2007; La Torre *et al.*, 2007; Hofmann *et al.*, 2008). Molti prodotti derivati da estratti di piante, di alghe, da batteri e funghi antagonisti, da proteine, da miscugli di batteri lattici e lieviti sono stati testati sia in campo che in laboratorio al fine di valutarne l'efficacia contro la peronospora, l'oidio e la muffa grigia (Gindro e Viret, 2007). Solo pochi estratti di piante hanno dimostrato in prove di laboratorio di possedere azione elicitante in grado di attivare velocemente da parte della pianta di reazioni di difesa, ma mancano ancora dati affidabili sulla loro efficacia in condizioni di pieno campo che tengano conto della frequenza di applicazione e della influenza di fattori ambientali come temperatura ed intensità della radiazione solare. Tra gli estratti vegetali testati, l'estratto di radice di *Rheum palmatum* e quello di corteccia di *Frangula alnus* hanno dimostrato un'efficacia elevata in test di laboratorio, non solo per la loro tossicità nei confronti del patogeno, ma anche per l'inibizione dei primi stadi

dello sviluppo ifale ed il contestuale accumulo nei tessuti vegetali trattati di viniferine stilbeniche, aumento dell'attività perossidasi e reazione di ipersensibilità rilevate in varietà suscettibili alla plasmopara (Godard *et al.*, 2009). Tra le molecole fenoliche identificate in questi estratti l'emodina ha mostrato la capacità di inibire lo sviluppo dell'oomicete e di stimolare la produzione di fitoalessine. Anche l'estratto di salvia, *Salvia officinalis*, ha mostrato una protezione dalla peronospora simile a quella di trattamenti rameici convenzionali, tuttavia in annate molto piovose la sua efficacia è stata molto limitata (Dagostin *et al.*, 2010). In altre prove, molte sostanze chimiche o di origine naturale, sono state saggiate per verificare, oltre alla diminuzione dell'incidenza della malattia, anche l'aumento della concentrazione di sostanze di difesa delle piante, dovuto alla loro azione di elicitori, come perossidasi, polifenol-ossidasi, β -1,3-glucanasi, stilbene sintetasi ed altre proteine PR, legate anche all'accumulo di viniferine stilbeniche. Tra le molte sostanze saggiate però, solo l'acido 3-DL- β -ammino butirrico (BABA), il benztiodiazolo (BTH) e l'estratto di *Solidago canadensis* hanno dimostrato una buona efficacia protettiva (Harm *et al.*, 2011). In particolare trattamenti con BABA hanno causato molto rapidamente la formazione di spot necrotici nei tessuti fogliari e aumento delle proteine PR, senza però aver nessun effetto inibitore sulle zoospore. Al contrario l'acido linoleico, pur inibendo le zoospore e causando un aumento della produzione di sostanze di difesa non ha causato una diminuzione significativa dell'incidenza della malattia (Harm *et al.*, 2011). Tali casi confermano la necessità di test approfonditi, non solo per verificare l'effettiva efficacia delle sostanze, ma anche per studiare i loro meccanismi di azione. Anche l'applicazione di preparati biodinamici a base di infusi di piante con zolfo e rame ha mostrato livelli discreti di efficacia, ma soltanto in caso di applicazioni più frequenti rispetto alle molecole di sintesi, con i rischi conseguenti per l'accumulo nel suolo del rame, che è un metallo pesante. Non secondario è anche lo studio dei mezzi e dei tempi di applicazione delle molecole di difesa, allo scopo di ottimizzarne l'azione per diminuirne le quantità utilizzate (Viret *et al.*, 2007). Negli ultimi anni, anche la selezione per il carattere della resistenza è tornata ad essere un'arma di lotta contro i patogeni, così come a fine XIX secolo aveva stimolato, soprattutto in Francia, una intensa attività di ibridazione con le specie americane, resistenti o tolleranti nei confronti dell'oomicete. Gli ibridi produttori introdotti nei secoli scorsi hanno alta produttività e caratteristiche di resistenza alla malattia talvolta elevate, ma scarsa qualità delle uve e contenuti di pectine nella polpa molto alti, con i rischi conseguenti per la produzione in fase di fermentazione di metanolo. Anche l'aroma volpino o foxy di alcune uve di questi ibridi è alla base della scarsa richiesta dei vini prodotti. A tutt'oggi la produzione di vino di qualità è permessa nei Paesi dell'Unione Europea solo con uve provenienti esclusivamente da *V. vinifera*, anche se sono disponibili ibridi molto

tolleranti o addirittura resistenti (Spring *et al.*, 1998; Spring, 2001; Spring, 2005) in grado di dare vini apprezzati nei mercati locali.

Molta attenzione è stata riposta alla validazione di protocolli selettivi riguardo alla tolleranza ai patogeni in grado di accorciare i tempi di selezione di vitigni migliorati. I semenzali provenienti da ibridazione vengono studiati già nelle fasi di post emergenza e selezionati in base a marker biochimici o a caratteristiche istologiche che permettono di selezionare solo quelli con caratteri interessanti riguardo la resistenza a patogeni (Gindro *et al.*, 2003; Gindro *et al.*, 2007). Studi preliminari su biomarkers per la resistenza a patogeni fungini nelle foglie di vite hanno permesso l'identificazione di 16 metaboliti di varia natura da utilizzare nei piani di selezione (Batovska *et al.*, 2008). Tuttavia la vite europea è una specie con elevata eterozigosi e l'ibridazione con specie resistenti non è generalmente associata a caratteristiche di qualità delle uve. La selezione con markers biochimici può senz'altro costituire uno strumento fondamentale in mano ai selezionatori, soprattutto se unita agli studi sul genoma della vite in grado di fornire i mezzi necessari a comprendere il funzionamento dei geni e la loro ereditarietà, come nel caso di caratteri a base genetica complessa come i QTL (Quantitative Trait Loci), e può permettere l'individuazione di marcatori molecolari utili alla MAS (Marker Assisted Selection) (Moreira, 2005). Lo studio della risposta a *P. viticola*, nella progenie proveniente da un incrocio tra una varietà suscettibile ed una ibrida resistente, associata alla produzione di molecole stilbeniche, ha già evidenziato il coinvolgimento di 57 geni solo nei genotipi resistenti, aprendo la strada a successive ricerche di carattere molecolare (Malacarne *et al.*, 2011). Contemporaneamente alle ricerche di carattere molecolare, lo studio della suscettibilità e dei meccanismi che regolano la tolleranza anche nelle varietà tradizionalmente coltivate in Europa può migliorare la conoscenza del patrimonio viticolo, fornendo risposte migliori ad esigenze specifiche (Boso *et al.*, 2011). Nel vasto germoplasma viticolo esistente sono infatti riscontrabili livelli molto diversi di suscettibilità al patogeno la cui caratterizzazione può fornire sia materiale utile nei programmi di selezione genetica che nella scelta dei vitigni da utilizzare nella viticoltura di qualità, eventualmente anche nel regime di coltivazione in biologico.

Meccanismi di resistenza a *Plasmopara viticola*

I meccanismi di difesa nelle piante possono essere distinti in meccanismi costitutivi ed indotti. Le resistenze costitutive sono già presenti nelle piante prima del contatto con il patogeno e sono riconducibili a fattori morfo-anatomici della foglia, del grappolo e dell'acino ed alla presenza di composti con attività antifungina preformati, come ad esempio composti fenolici (Gabler *et al.*, 2003). Nel caso di resistenza indotta l'attivazione di meccanismi di difesa è determinata dall'attacco del patogeno, quindi l'espressione della reazione di difesa è preceduta dal

riconoscimento del patogeno da parte della pianta (Prell *et al.*, 2001). *V. vinifera*, specie di origine eurasiatica non si è coevoluta con *P. viticola* prima della fine del XIX secolo e non possiede basi genetiche di resistenza. All'interno del genere *Vitis* sono state osservate differenti interazioni ospite-patogeno che corrispondono a diverse strade evolutive (Jürges *et al.*, 2009) causate anche dalla coevoluzione di *P. viticola* solo con le specie nordamericane *V. riparia*, *V. rupestris* e *V. californica*. In queste, ma anche nella specie di origine asiatica *V. amurensis*, l'inibizione dello sviluppo del patogeno è molto rapida e si verifica dopo l'incistamento delle zoospore. Nelle specie asiatiche non siberiane, *V. coignetiae*, *V. ficifolia*, *V. quinquangularis* e *V. jacquemontii*, l'interazione con il patogeno non ha successo e le zoospore non si incistano nei pressi degli stomi, lo sviluppo del micelio è aberrante, si formano solo ife in superficie che però non producono sporangiofori funzionali. Al contrario in entrambe le sottospecie di vite europea, *V. vinifera sativa* e *V. vinifera sylvestris* la colonizzazione del mesofillo non incontra ostacoli. Queste osservazioni confermano che l'interazione ospite-patogeno è sotto il controllo di specifici segnali legati alla diversificazione dovuta all'evoluzione. Lo studio comparato dell'infezione e dello sviluppo del patogeno nei tessuti fogliari di *V. vinifera* e *V. rupestris*, ha evidenziato che nella seconda specie, resistente, la penetrazione avviene con gli stessi tempi riscontrati nella specie suscettibile (Unger *et al.*, 2007). Tuttavia la crescita invasiva del patogeno è dapprima più lenta, poi cessa prima che gli spazi intercostali siano riempiti dal micelio mentre dagli stomi è stata osservata la fuoriuscita di ife non ramificate e sterili che non producono sporangi.

- **Meccanismi di difesa costitutivi**

Le interazioni pianta-ambiente iniziano quando gli organi di moltiplicazione dei patogeni vengono in contatto con la pianta. In questo caso alcune caratteristiche dei tessuti dell'ospite possono interferire con le modalità di contatto e penetrazione del patogeno. Le difese costitutive sono rappresentate da tutte quelle barriere fisiche o biochimiche presenti nella pianta indipendentemente dall'infezione e capaci di bloccare il processo di patogenesi nei primi stadi. Fondamentali sono le prime fasi del processo infettivo, quando i propaguli del patogeno arrivano sui tessuti della pianta ospite e devono aderire e penetrare superando le barriere fisiche o biochimiche che incontrano. Relativamente alla peronospora, poiché la penetrazione avviene per via stomatica nella pagina inferiore della foglia, molta attenzione è stata rivolta a comprendere il possibile ruolo dei tricomi presenti nel contrastare o meno il movimento delle zoospore che devono raggiungere l'apertura stomatica. In effetti i peli sulla superficie vegetale, specialmente nei tessuti giovani oltre a proteggere la pianta meccanicamente, da un'eccessiva traspirazione e dalla radiazione solare, possono limitare i danni causati dagli erbivori e in particolar modo dagli insetti. In alcuni casi è stato dimostrato che il feltro idrofobico costituito dai peli costituisce una

strategia difensiva molto importante poiché l'infezione dipende sostanzialmente dalla bagnatura fogliare. Il feltro che copre la superficie abassiale delle foglie di alcune specie o varietà di vite è costituito da peli lunghi ed intricati che intrappolano facilmente l'aria e riducono la superficie di contatto tra l'acqua e la lamina fogliare. L'angolo di contatto delle gocce di acqua che giungono sulla superficie fogliare inferiore è determinante nel permettere o meno la bagnatura dei tessuti epidermici; nel caso di superfici molto tomentose, generalmente, le piccole gocce che si formano hanno un angolo di contatto maggiore che ostacola la bagnatura e facilita al contrario l'evaporazione dell'acqua, lasciando le spore maggiormente esposte a disidratazione (Kortekamp e Zyprian, 1999; Kortekamp *et al.*, 1999). Le specie *V. doaniana* e *V. davidii*, mediamente tomentose, resistenti a *P. viticola*, se trattate con un detergente evidenziano livelli più elevati di infezione, e il patogeno a fine ciclo può normalmente sporulare. In particolare in queste specie è stata osservata la capacità di peli e tricomi di catturare le gocce di acqua, impedendo la liberazione delle zoospore e causando la germinazione degli zoosporangi che producono direttamente le ife: questo fatto rende il fungo incapace di raggiungere la superficie fogliare a causa della distanza elevata dalla superficie fogliare. Il trattamento con sostanze bagnanti favorisce, al contrario, la normale produzione di zoospore da parte degli zoosporangi. In altre specie resistenti, come *V. cinerea* e *V. labrusca*, quest'ultima molto tomentosa, il blocco della crescita del patogeno è stato messo in relazione a meccanismi riferibili ad una risposta induttiva più che a fattori costitutivi come la elevata tomentosità (Kortekamp *et al.*, 1999). In definitiva quindi il ruolo dei tricomi nel limitare l'infezione non è ancora del tutto chiarito e una loro forte presenza non assicura automaticamente una bassa suscettibilità (Boso *et al.*, 2010). Anche il numero degli stomi presenti sulla superficie abassiale della foglia può giocare un ruolo importante nella fase di infezione, ma i dati ottenuti anche in questo caso non hanno dimostrato una correlazione positiva tra densità stomatica e suscettibilità al patogeno (Boso *et al.*, 2010).

- **Meccanismi di difesa indotti**

Come accennato le risposte di difesa indotte sono attivate dalle cellule vegetali dopo il contatto con il patogeno. Possono essere classificate in base alla velocità con la quale si manifestano. La risposta di difesa precoce si basa sul riconoscimento da parte della cellula vegetale attaccata di segnali del patogeno: tali segnali attivano la traduzione a livello genico che porta ad una rapida morte cellulare. Tale risposta ipersensibile (Hypersensitive Response, HR), caratteristica anche delle interazioni patogeno-ospite incompatibili, determina un blocco della crescita e diffusione del patogeno che non può colonizzare i tessuti circostanti. La reazione ipersensibile è generalmente associata ad un solo gene dominante, è però razza-specifica e viene chiamata resistenza verticale (Flor, 1971) che il patogeno può facilmente superare sviluppando geni di

avirulenza. Sono state poi descritte reazioni di tipo sistemico (Systemic Active Reaction, SAR). In questo caso la risposta di difesa si basa su l'attivazione di una risposta genica localizzata e coinvolge cellule adiacenti a quella direttamente attaccata attraverso la produzione attiva di molecole che vanno a rinforzare le barriere strutturali, come la parete cellulare, o che inibiscono direttamente il patogeno. Risposte di difesa sistemica si basano anche sull'attivazione di geni che codificano per la produzione di proteine legate alla patogenesi (Pathogenesis Related Protein, PR) come glucanasi e chitinasi che agiscono direttamente sul patogeno.

Tra le risposte indotte dall'infezione del patogeno a livello istologico e biochimico, la produzione di callosio è stata studiata con approcci diversi. Il callosio è un glucano non ramificato formato da β -1,3-D-glucosio presente nei tessuti floematici, nei peli radicali, nelle cellule epidermiche ed anche nei tessuti parenchimatici di diverse specie a seguito di infezioni fungine. Nella vite, in concomitanza di infezioni di *P. viticola*, la deposizione di callosio è stata rilevata solo dopo cinque giorni, quando ormai il patogeno aveva colonizzato i tessuti della pianta ospite e raggiunto la fase di sporulazione. Tale ritardo, anche nelle specie resistenti in cui lo sviluppo dell'oomicete è bloccato a 3-4 giorni dopo l'inoculazione (dpi), è spiegabile con altri meccanismi di difesa (Kortekamp *et al.*, 1997). Sempre nella vite, indagini relative alla deposizione di callosio a livello delle aperture stomatiche hanno, invece, dimostrato un ruolo determinante di questo polimero nella resistenza all'infezione fin dalle prime fasi (Gindro *et al.*, 2003). La produzione del glucano da parte degli stomi è in grado di bloccare la penetrazione delle zoospore nella camera sottostomatica: già 7 ore dopo l'infezione (hpi) depositi di callosio inglobano le zoospore in germinazione e a 24 hpi gli stomi infetti sono circondati da aree necrotiche, come avviene per la reazione ipersensibile. A 120 hpi, infine, gli stomi adiacenti a quelli infettati contengono depositi di callosio, ma non sono circondati da aree necrotiche. I segnali che determinano questa reazione negli stomi vicini per prevenire le infezioni secondarie sono sconosciuti, ma sono riferibili alla resistenza sistemica indotta (SAR). La determinazione della percentuale di stomi infettati con produzione di callosio a 48 hpi è utilizzata come marker istologico della resistenza delle varietà di vite (Gindro *et al.*, 2006). Dal momento che la penetrazione del patogeno è avvenuta, le difese induttive possono riguardare anche la produzione di molecole di difesa. Le piante, quali organismi viventi immobili, hanno sviluppato strategie di difesa basate sulla produzione di sostanze che possono proteggerle da stress biotici ed abiotici, contrastando la diffusione di molecole estranee o lo sviluppo degli stessi patogeni. Tra queste sostanze di difesa vi sono i flavonoidi che sono costitutivi in alcuni tessuti vegetali ed il loro aumento spiegherebbe anche la maggiore resistenza alle patologie nei frutti che ne contengono a più alte concentrazioni (Treutter, 2006). L'accumulo di flavonoidi può essere anche indotto e

correlato a stress abiotici, come i raggi UV, ma anche ai meccanismi di difesa attivati dall'ingresso dei patogeni. Inoltre molti elicitori chimici o fisici possono elicitare la produzione (Treutter, 2006). Studi istochimici comparativi hanno evidenziato le differenti risposte di tre specie del genere *Vitis* (Dai *et al.*, 1995). In *V. rotundifolia*, appartenente alla sezione *Muscadinia*, altamente resistente, le infezioni di peronospora sono state bloccate molto velocemente: è stata osservata la formazione di piccoli spot necrotici, assenza di sporulazione e soprattutto a 2 dpi sono stati riscontrati alti livelli di flavonoidi nelle cellule stomatiche infette ed in quelle circostanti. Nella specie mediamente tollerante *V. rupestris*, invece sono state osservate necrosi e sporulazione limitata; a 5 dpi sono stati rilevati sia resveratrolo che attività perossidasi, e a 8 dpi accumulo di flavonoidi. I tessuti circostanti le necrosi hanno poi formato lignina a 15 dpi. Al contrario nella specie *V. vinifera* non sono state osservate necrosi, la sporulazione è stata abbondante e sono stati rilevati solo flavonoidi a 8 dpi. I flavonoidi sembrano dunque avere un ruolo chiave nei meccanismi di resistenza a *P. viticola*, ma la loro produzione è efficace nel bloccare l'infezione solo se molto rapida.

Studi sulla patogenesi a livello istologico in varietà resistenti, hanno evidenziato, a seguito dell'inoculazione di vite con *P. viticola*, sia la formazione della vescicola nella camera sottostomatica che quella di un austorio funzionale, ma lo sviluppo ifale è stato bloccato 3-4 dpi dalla risposta indotta nelle piante. Contestualmente è stata rilevata una forte attività perossidasi nei tessuti infetti ed un accumulo di fenoli ossidati (Kortekamp *et al.*, 1998). L'enzima perossidasi è tra l'altro responsabile della formazione di viniferine a partire dal resveratrolo; con il nome generico di "viniferine", infatti, vengono chiamate le molecole appartenenti ad un gruppo ristretto di fenoli a basso peso molecolare, gli stilbeni, che derivano dalla oligomerizzazione ossidativa del *trans*-resveratrolo.

- **Produzione di stilbeni**

Gli stilbeni sono composti a basso peso molecolare naturalmente presenti in molte famiglie del regno vegetale e in molte specie del genere *Vitis*, compresa *V. vinifera* caratterizzati da bassa solubilità in acqua ed elevata in solventi organici. Comprendono numerose sostanze: la prima e più studiata è il resveratrolo, con forme isomeriche *cis* e *trans* (Langcake e Pryce, 1977), i glucosidi del resveratrolo, piceide e resveratrolside (Mattivi *et al.*, 1995), le numerose molecole derivate dalla polimerizzazione del resveratrolo (Mattivi *et al.*, 2011), tra cui le più importanti le viniferine e lo pterostilbene (Bavaresco *et al.*, 1997; Pezet *et al.*, 2003).

Il resveratrolo è stato scoperto e studiato fin dalla prima metà del XX secolo, ma solo di recente è stato riscontrato anche nel vino ed è stata messa in relazione la sua assunzione nella dieta umana con la protezione da molte malattie, tra cui quelle legate al sistema cardio-circolatorio e al

cancro (Aggarwal *et al.*, 2004; Aggarwal e Shishodia, 2006; Gatto *et al.*, 2008). Oltre all'uva, fonti di stilbeni sono i mirtilli rossi e neri e le arachidi (Bavaresco e Fregoni, 2001). La stilbene-sintasi è l'enzima chiave per la formazione di resveratrolo, precursore monometrico degli oligostilbeni; esiste una competizione tra questo e l'enzima calcione-sintasi, necessario alla produzione dei flavonoidi, poiché utilizzatori dello stesso substrato. Il resveratrolo è prodotto costitutivamente nelle bucce di acini sani, ma i suoi livelli sono aumentati dalla presenza di elicitori biotici o abiotici. Il contenuto nelle uve e nei vini è tuttora oggetto di studio, così come le pratiche agronomiche e le condizioni climatiche che ne influenzano la sintesi (Bavaresco, 2003; Bavaresco *et al.*, 2007; Bavaresco *et al.*, 2008). Il contenuto in resveratrolo è stato visto aumentare dall'invasatura alla maturazione e variare anche notevolmente in funzione del genotipo (Gatto *et al.*, 2008), tuttavia altri lavori hanno evidenziato anche una diminuzione dei contenuti degli stilbeni nella fase di maturazione e accumulo degli zuccheri (Bavaresco *et al.*, 1997).

Tra i meccanismi di difesa indotti, la produzione di fitoalessine di natura stilbenica è stata osservata già da molto tempo in tessuti di vite infettati da *P. viticola* (Langcake e Pryce, 1976; Langcake e Pryce, 1977; Langcake, 1981). Questi composti sono presenti in maniera costitutiva negli organi legnosi della vite, compresi i semi, ma sono anche sintetizzati come fitoalessine in organi o tessuti erbacei della pianta in seguito a risposta indotta. Essi hanno, infatti, sia attività antifungina che più generalmente di difesa nei confronti di stress di varia natura. Come fitoalessine, cioè come composti antibiotici sintetizzati *de novo* dai tessuti delle piante dopo le infezioni microbiche e non preformati o rilasciati da sostanze precostituite, sono prodotti dalla vite in seguito a differenti stress biotici e abiotici. Tra gli agenti patogeni in grado di produrre elicitori biotici, *Botrytis cinerea*, l'agente causale della muffa grigia è stato uno dei primi studiati (Langcake e McCarthy, 1979; Bavaresco *et al.*, 1997), altri sono stati scoperti successivamente, tra cui *Phomopsis viticola*, *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus* spp., *Trichoderma viride* (Sarig *et al.*, 1997; Bavaresco *et al.*, 2008). Tra gli elicitori abiotici sono stati studiati gli UV, l'ozono, il fosetyl-alluminio, il metil-giasmonato, il benzotiodiazolo, gli oligomeri del chiosano, le ciclodestrine e l'acido salicilico (Bavaresco *et al.* 2009). Gli stilbeni sono stati correlati anche alla risposta all'infezione di *E. necator* (Belhadj *et al.*, 2006; Schnee *et al.*, 2008). Molti lavori hanno indagato la produzione di stilbeni e la resistenza a *P. viticola*, mettendo in luce l'azione tossica nei confronti del patogeno di due dimeri del resveratrolo, la δ -viniferina e la ϵ -viniferina (Pezet *et al.*, 2003; Gindro *et al.*, 2006). Al contrario la formazione del piceide, sempre a partire dal resveratrolo, o l'accumulo di quest'ultimo, sono legati alla suscettibilità alla malattia. Prove istochimiche comparate su varietà ed ibridi con diversa suscettibilità a peronospora e sulla specie

resistente *Muscadinia rotundifolia*, hanno evidenziato un differente sviluppo del patogeno all'interno dei tessuti ed un accumulo di varie molecole. In particolare nel vitigno Chasselas, suscettibile a peronospora, l'oomicete ha colonizzato il mesofillo già a 72 hpi, non sono state osservate necrosi e la sostanza riscontrata in concentrazioni maggiori è stata il piceide, privo di azione tossica. Al contrario nelle varietà resistenti lo sviluppo del micelio è stato molto limitato, si sono osservate necrosi diffuse e le molecole accumulate nei tessuti infetti sono state le viniferine, come nella varietà resistente Solaris, o, nella varietà IRAC 2091, lo pterostilbene, la cui azione tossica è probabilmente legata alla presenza di particelle cellulari elettrondense sia nelle cellule infette che negli austori del patogeno (Alonso-Villaverde *et al.*, 2011). In questi genotipi resistenti il patogeno ha formato gli austori, ma non ha completato il suo ciclo di sviluppo. Ancora più evidente è stata la rapida reazione evidenziata in *M. rotundifolia*: sia materiale cellulare del patogeno che della stessa pianta è stato espulso attraverso gli stomi dopo la penetrazione di *P. viticola*. Tale reazione non è stata associata a necrosi diffuse, mentre invece l'accumulo di molecole stilbeniche è stato riscontrato molto accentuato, con quantità dieci volte maggiori di quelle prodotte nei tessuti anche delle varietà resistenti (Alonso-Villaverde *et al.*, 2011). Nei confronti delle zoospore i livelli di maggiore tossicità sono stati riscontrati per la δ -viniferina e lo pterostilbene, mentre il resveratrolo e il piceide non hanno dimostrato alcuna tossicità (Pezet *et al.*, 2004).

CAPITOLO II

Oidio (*Erysiphe necator*)

L'oidio o mal bianco (agente causale *Erysiphe necator* Schwein, forma anamorfa *Oidium tuckeri* Berk) è una malattia fungina che colpisce *V. vinifera* praticamente in tutti gli areali di coltivazione, causando gravi decrementi produttivi e qualitativi (Gadoury *et al.*, 2001; Calonnec *et al.*, 2004; Stummer *et al.*, 2005), con perdite economicamente rilevanti. La sua virulenza è accentuata dalla notevole adattabilità alle condizioni ambientali: ampio range di sviluppo termico, diffusione dei propaguli per via anemofila, minore dipendenza dalle condizioni di umidità. Queste caratteristiche rendono la diffusione della infezione più rapida e meno dipendente dalle condizioni atmosferiche. Per questo, sebbene la gravità di questa malattia possa variare di anno in anno, la sua incidenza è piuttosto costante nella maggior parte dei vigneti, obbligando i produttori a numerosi interventi di difesa. L'incidenza delle infezioni di oidio è recentemente aumentata in Europa ed i cambiamenti climatici e la diminuzione dell'efficacia dei fungicidi sono state ipotizzate come possibili cause di ciò (Staud, 1997). D'altra parte l'efficacia di molti principi attivi utilizzati è stata ridotta da meccanismi di resistenza sviluppati dal fungo (Savocchia *et al.*, 2004).

V. vinifera risulta particolarmente sensibile ad *E. necator*: come nel caso della suscettibilità a peronospora, è da evidenziare che la sua evoluzione è avvenuta lontano dall'agente causale *E. necator*, che è originario del Nord America. *E. necator* è un patogeno biotrofo obbligato, ciò significa, quindi, che la sua sopravvivenza è legata ai prodotti che sottrae alle cellule viventi e che non può crescere, almeno allo stato attuale delle conoscenze, su substrati artificiali in laboratorio. Questo fungo è un ectoparassita, per cui il micelio si sviluppa unicamente sulla superficie della pianta ospite. Esso produce delle strutture trofiche specializzate, gli austori, che entrano in contatto solo con le cellule epidermiche alle quali sottraggono nutrienti e molecole organiche alterandone la fisiologia. Il rapporto parassitario che si instaura, però, finisce per modificare tutta la fisiologia della pianta ospite, in cui viene ridotta l'efficienza fotosintetica e la regolare maturazione dei frutti (Lakso *et al.*, 1982; Brems *et al.*, 1986). Infezioni anche limitate sui grappoli sono state associate all'aumento di microrganismi dannosi, allo sviluppo di infestazioni di insetti e dell'incidenza di *Botrytis cinerea* alla raccolta (Gadoury *et al.*, 2007). Per questi motivi la moderna viticoltura non può prescindere dall'uso costante e massiccio di fungicidi nel tentativo di ridurre i danni alla coltura, ma con un conseguente aumento dei costi anche in termini ambientali. Solo in Francia, ad esempio, in un solo anno, la spesa sostenuta dai viticoltori per la difesa dall'oidio si aggira intorno ai 75 milioni di Euro senza considerare

peraltro il costo dei carburanti necessari (Dry *et al.*, 2009). Anche i legislatori si sono interessati all'argomento, soprattutto per la maggiore sensibilità riguardo le ricadute ambientali dei processi produttivi e le conseguenze sulla salute sia dei consumatori che degli operatori. La stessa Commissione Europea ha proposto la messa al bando di molti principi attivi dal 2013, compresi alcuni di quelli comunemente utilizzati contro l'oidio (Pesticides Safety Directorate 2008). L'analisi complessiva della situazione rende necessario l'ampliamento delle strategie di difesa diretta mediante lo studio dei meccanismi parassitari naturali di resistenza alla malattia.

Sintomatologia

L'oidio colpisce tutti gli organi verdi delle piante ospiti. Il fungo sverna come ascospore, derivante dalla riproduzione gamica e protetta all'interno di particolari strutture durevoli, i cleistoteci, e nelle regioni meno fredde anche come micelio all'interno delle gemme dormienti. Da queste, poi, in primavera le infezioni si sviluppano molto precocemente colpendo i germogli che risultano deformati, assumendo una tipica "forma a bandiera" poiché le foglioline ricoperte dal micelio biancastro si ripiegano verso l'alto. In primavera si possono rinvenire le colonie, originate dalle ascospore, anche sulla pagina inferiore delle prime foglioline distese dei germogli vicini alla corteccia, in corrispondenza di queste sulla pagina superiore sono visibili delle macchie tondeggianti clorotiche. Generalmente, durante la stagione vegetativa, le colonie si sviluppano sulla pagina superiore delle foglie, sono circolari e possono essere grandi da pochi millimetri a più di un centimetro, ma risultano maggiormente visibili sulla pagina inferiore del lembo fogliare. Nelle infezioni più gravi, poi, le colonie coalescono fino a ricoprire tutta la foglia. Le foglie mature sono meno suscettibili di quelle giovani, sia in cultivar suscettibili che resistenti (Doster e Schnathorst, 1985), ma in queste ultime la maturazione e l'invecchiamento dei tessuti sono accompagnati da una resistenza più marcata (Péros *et al.*, 2006). Nella fase iniziale dell'infezione i sintomi possono essere confusi con quelli della peronospora poiché le decolorazioni clorotiche somigliano alle classiche macchie d'olio di quest'ultima. Le colonie senescenti, invece, diventano grigiastre ed hanno un tipico odore di fungo e di muffa. In esse si possono vedere i cleistoteci scuri in formazione, mentre nella pagina inferiore delle foglie si evidenziano piccole necrosi delle cellule epidermiche. Generalmente le foglie colpite necrotizzano e cadono anticipatamente. Le infezioni sugli steli sono simili a quelli sulle foglie, ma la formazione del periderma e la lignificazione dei tralci blocca definitivamente il loro sviluppo (Gadoury *et al.*, 2011). Le infiorescenze e gli acini sono molto suscettibili nelle prime settimane e se infettati possono venir ricoperti interamente dal micelio biancastro. Gli acinelli colpiti più severamente finiscono per arrestare la loro crescita. A partire da 3-4 settimane dopo la fioritura gli acini acquistano una resistenza ontogenetica e non sono più suscettibili alla malattia;

nella fase di passaggio però possono ancora esser infettati dal patogeno che forma colonie diffuse non visibili ad occhio nudo, ma non riesce a sporulare e le eventuali colonie successivamente possono morire. Nella stessa varietà è risultata essere elevata in molti casi la correlazione, tra severità delle infezioni sulle foglie e severità sui grappoli (Doster e Schnathorst, 1985).

Classificazione, ciclo ontogenetico ed esigenze biologiche di *Erysiphe necator*

L'agente causale dell'oidio della vite è *E. necator*, un ascomicete appartenente all'ordine delle *Erysiphales* di cui fanno parte altri patogeni agenti di importanti malattie che colpiscono alcune colture economicamente rilevanti. Il fungo è un ectoparassita, le spore, trasportate dal vento giungono sulla superficie superiore delle foglie o su tutti gli altri organi verdi della vite ove in poche ore (4 hpi) germinano producendo un tubetto germinativo che termina in un appressorio trilobato che le ancora all'epidermide (6-8 hpi). Nell'intervallo di temperatura che va da 20 a 30°C la percentuale di conidi germinati non subisce variazioni significative (Doster e Schnathorst, 1985), confermando la plasticità del patogeno. Dall'appressorio si origina uno stiletto di penetrazione, una particolare ifa, che determina la formazione di un poro di penetrazione (0,5 µm) vincendo le barriere della cuticola e della parete cellulare della pianta ospite. La formazione dello stiletto di penetrazione precede l'instaurazione del vero e proprio rapporto parassitario. Al di sotto dell'appressorio, poi si sviluppa un austorio lobato, una particolare struttura di nutrizione del fungo che invagina la membrana cellulare ed instaura il rapporto parassitario (Gadoury *et al.*, 2011). La continuità tra la membrana della cellula e dell'austorio permette il passaggio di molecole tra i due organismi ed in particolare delle sostanze che il fungo sottrae al metabolismo cellulare per la propria crescita. Successivamente solo se si è instaurato un rapporto parassitario compatibile, e dunque il patogeno può assorbire i nutrienti di cui ha bisogno per svilupparsi, dalla spora si origina, generalmente dal polo opposto al tubetto germinativo, un'ifa primaria (20 hpi) che si allunga, emette il primo appressorio ifale e poi ramifica (Leinhos *et al.*, 1997). Con la crescita dell'ifa primaria, adiacenti al primo appressorio se ne sviluppano fino ad altri tre (formazione di un appressorio multiplo), probabilmente per supportare lo sviluppo dei conidiofori con nuovi appressori che subentrano al primo, la cui funzionalità diminuisce con l'invecchiamento. Successivamente, dalla spora emerge una seconda ifa, generalmente dalla parte opposta alla prima (24 hpi). Per questo lo sviluppo di un'ifa secondaria è considerato un indice indiretto del successo dell'infezione (Schnee *et al.*, 2008). Un'ifa terziaria emerge in prossimità del tubetto germinativo tra 24 e 48 hpi. Le ife ialine hanno un diametro di 4-5 µm. Il micelio cresce sull'epidermide fogliare, le ife producono appressori che assicurano l'ancoraggio ad intervalli regolari; la temperatura che

favorisce la crescita ifale è di 25°C (Doster e Schnathorst, 1985). Infatti una caratteristica dell'ordine *Erysiphales* è la produzione di un micelio aderente alla superficie dell'ospite e la produzione di appressori è necessaria ad assicurare una penetrazione intracellulare efficace e lo sviluppo del fungo. Al di sotto del micelio, soprattutto in corrispondenza degli appressori, sono stati osservati dei materiali mucilluginosi extracellulari, che quindi facilitano l'adesione alla cuticola degli ospiti (Leinhos *et al.*, 1997). Il micelio forma delle colonie diffuse dalle quali emergono, perpendicolarmente alla superficie fogliare, rami conidiofori multisettati (4-5 dpi), molto densi sulle foglie di ospiti suscettibili e più rarefatti in quelli tolleranti. All'estremità, ciascuno di essi produce un conidio ialino e ovoidale (6-7 dpi); quando le condizioni atmosferiche sono calme, si formano catene di conidi di cui il più vecchio è quello distale. La dispersione delle spore è facilitata dal vento, in particolare è proporzionale alla velocità del vento, mentre è inversamente proporzionale all'umidità atmosferica. Tuttavia pochi millimetri di pioggia, 1-2 mm, favoriscono la dispersione dei conidi, ugualmente i trattamenti per la difesa che utilizzano pressioni elevate ed altre operazioni colturali, come la potatura verde, che muovono la vegetazione. Piogge forti, invece, diminuiscono la concentrazione delle spore nell'aria, questa è infatti è massima nei giorni sereni che seguono un periodo piovoso (Willocquet e Clerjeau, 1998). *E. necator* si riproduce anche per via sessuata essendo un fungo eterotallico; quando le ife di due organismi compatibili entrano in contatto si formano cleistoteci entro 24 ore in condizioni favorevoli (Gadoury e Pearson, 1991) il cui ancoraggio alle colonie è assicurato da ife specializzate denominate fulcri. In 7 giorni gli ascocarpi diventano gialli per l'accumulo di lipidi pigmentati, successivamente la parete degli stessi imbrunisce e dopo 4-5 settimane sia le ife generatrici che quelle di ancoraggio necrotizzano cosicché essi non sono più connessi alle colonie. I cleistoteci contengono da 4 a 6 aschi a maturità, ciascuno dei quali contiene da 4 a 7 ascospore ialine ovato-globose. Gli ascocarpi giungono a maturità morfologica in 4 settimane, mentre non raggiungono la maturità fisiologica prima di molti mesi, soprattutto nei climi freddi (Gadoury e Pearson, 1988). I cleistoteci maturi deisciono a contatto con l'acqua libera permettendo agli aschi di liberare le ascospore che germinano sulla superficie vegetale, in maniera del tutto simile a quella dei conidi, producendo un singolo tubetto germinativo che termina in un appressorio lobato. L'inoculo primario, soprattutto nei climi con inverni miti, è costituito dalla gemme laterali infette che originano a primavera i cosiddetti "germogli a bandiera". L'assenza di "germogli a bandiera" nei climi più freddi è stata attribuita alla minore resistenza delle gemme laterali infette (Pearson e Gadoury, 1992) o alla scarsa resistenza alle basse temperature del patogeno nei tessuti delle gemme dormienti negli stadi iniziali di sviluppo del micelio (Gadoury *et al.*, 2011). Il patogeno sopravvive, però, anche attraverso i cleistoteci

(Rügner *et al.*, 2001) che costituiscono una fonte addizionale di inoculo primario nelle regioni a clima mite in cui sopravvive nelle gemme infette, e l'unica fonte dove non ci sono "germogli a bandiera". I cleistoteci morfologicamente maturi sono dispersi dalle piogge e dai forti venti e arrivano negli anfratti della corteccia delle viti o al suolo. Nelle zone con climi molto miti, come la California e l'Italia, i cleistoteci possono rilasciare le ascospore già nella tarda estate causando così infezioni tardive nella stessa stagione vegetativa (Gadoury *et al.*, 2011; Rossi *et al.*, 2010). I cleistoteci nei climi freddi non sopravvivono al suolo, ma solo nella corteccia delle piante, in quelli miti e poco piovosi, invece, possono sopravvivere anche nelle foglie cadute al suolo. In primavera le ascospore sono rilasciate dagli ascocarpi quando questi vengono bagnati dalla pioggia, dalla nebbia o dalle irrigazioni, in un periodo compreso tra il germogliamento e la fioritura della vite (Rossi *et al.*, 2010). L'infezione delle ascospore è favorita da temperature al di sopra dei 10°C e da 2-3 mm di pioggia (Gadoury e Pearson, 1990). Per il rilascio delle ascospore è necessaria la presenza di acqua libera, ma la bagnatura delle superfici vegetali non serve per la germinazione e infezione. Le colonie fungine crescono e si sviluppano molto rapidamente a temperature comprese tra 23 e 30°C con un optimum a 26°C, ma i limiti termici dello sviluppo sono ben più ampi, andando da 6 a 32°C. Temperature di 36°C possono devitalizzare le colonie più esposte in alcune ore, ma nelle parti più interne ed ombreggiate della chioma della pianta, le colonie possono sopravvivere e tornare successivamente a sporulare: nelle foglie più esposte, infatti, la temperatura delle superficie può essere più alta di 15°C rispetto alle foglie più ombreggiate (Gadoury *et al.*, 2011). In effetti anche l'esposizione ai raggi solari può danneggiare il fungo: in particolare i raggi UV riducono la germinazione dei conidi, la formazione dell'appressorio e lo sviluppo delle ife e prolungano il periodo di latenza. Per tale motivo, le parti della vegetazione più ombreggiate sono maggiormente attaccate dal patogeno (Austin, 2010). Anche l'umidità relativa favorisce lo sviluppo del patogeno che ha il suo optimum all'85% di UR, con aria più secca il fungo diminuisce sensibilmente il suo sviluppo. Tuttavia la presenza di acqua libera è dannosa per la germinazione dei conidi e ne può causare anche la lisi; talvolta però, le epidemie più severe si sviluppano nelle stagioni più piovose, probabilmente per l'effetto delle temperature più moderate, la minore insolazione e lo sviluppo vegetativo (Gadoury *et al.*, 2011). Le foglie sono più suscettibili all'infezione quando sono completamente distese, ma la loro suscettibilità diminuisce con la loro maturazione (Doster e Schnathorst, 1985), anche se non diventano mai immuni visto che anche foglie vecchie possono presentare estese colonie. Al contrario gli acini hanno un periodo di suscettibilità piuttosto breve e acquistano una resistenza ontogenetica in 3-4 settimane dopo la fioritura in *V. vinifera* e più precocemente in altre specie di *Vitis* (Ficke *et al.*, 2003; Gadoury *et al.*, 2001). Per quanto riguarda la correlazione tra il grado di

suscettibilità delle foglie a *E. necator* e quello dei grappoli è stata trovata piuttosto alta solo in alcune stagioni, quelle con condizioni molto favorevoli al patogeno; tuttavia la relazione tra queste due variabili è sembrata finora non sufficientemente consistente (Gaforio *et al.*, 2011). Le infezioni sugli acini sono poi associate ad un incremento della severità dei danni causati da *Botrytis cinerea* ed a diminuzioni della qualità del vino. Relativamente alla specializzazione patogenetica di *E. necator*, definita come l'abilità differenziale di isolati diversi del patogeno di infettare le specie ospiti, è stata riscontrata in molti casi: come in isolati ottenuti da *Parthenocissus* spp. e *V. rotundifolia* (*Muscadinia rotundifolia*). Molti isolati raccolti da specie di *Vitis* non hanno mostrato capacità di infettare alcune specie del genere *Parthenocissus*, così come isolati da *P. quinquefolia* hanno mostrato un lungo periodo di latenza e spesso non hanno raggiunto la sporulazione in *Vitis* spp. (Gadoury e Pearson, 1991). Tuttavia è stata riscontrata anche una specificità di razza, molto simile alla specializzazione patogenetica, ma conferita da un singolo gene di resistenza (R genes) presente solo in alcuni individui di una specie ospite. Infatti isolati raccolti dalla stessa specie ospite hanno mostrato la capacità o meno di superare la resistenza conferita da un singolo gene R (Gadoury e Pearson, 1991); sono però necessari altri studi per chiarire nei diversi casi se ciò è dovuto alla specificità di razza o all'effetto di più complesse barriere di tutti i genotipi di una data specie. Analisi sulle differenze genetiche nelle popolazioni del patogeno sono state fatte soprattutto in Europa ed in Australia. Siano stati identificati, grazie a marcatori molecolari RAPDs e AFLPs, due distinti gruppi denominati A e B (Délye *et al.*, 1997, Délye e Corio-Costet, 1998), il significato biologico della diversità non è ancora stato chiarito: in particolare è stato riscontrato che il gruppo A è spesso associato ai “germogli a bandiera” in primavera ed è presente nelle infezioni precoci, al contrario il gruppo B, associato anche alle infezioni derivate dalle ascospore, è stato riscontrato nelle infezioni tardive ed è molto più eterogeneo al suo interno. Ciò ha fatto ipotizzare che le popolazioni del gruppo A siano clonali, mentre quelle del B derivino dalla riproduzione sessuata. Allo stesso modo si potrebbero spiegare la diversa distribuzione dei due gruppi nelle regioni viticole europee e le differenze nella virulenza. Anche l'applicazione di fungicidi potrebbe selezionare le popolazioni resistenti (Miazzi *et al.*, 2008). Studi preliminari sui differenti isolati dei due gruppi genetici europei, hanno indicato che, in media, il gruppo A ha una patogenicità meno elevata (Péros *et al.*, 2006).

Lotta

Il controllo in campo di questa malattia è per ora possibile solo con l'utilizzo di massicce dosi di fungicidi; la comparsa in Europa del patogeno, in Inghilterra nel 1845, poi in Francia nel 1848, ha causato una vera e propria rivoluzione nella viticoltura. All'inizio per le gravi perdite causate,

poi, per la messa a punto di vere e proprie tecniche di lotta, fino ad allora sconosciute. Nel giro di sei soli anni i viticoltori francesi avevano cominciato ad utilizzare lo zolfo in più di 2,5 milioni di ettari vitati (Campbell, 2006). Ancora oggi lo zolfo è largamente utilizzato contro questo patogeno in tutto il mondo per la sua indiscutibile efficacia, i costi contenuti e la percezione che di esso ha il pubblico dei consumatori: è infatti visto come una molecola “naturale” e poco dannosa per l’ambiente. Ha una funzione sia protettiva che di contrasto delle colonie già sviluppate, la sua azione si esplica in un range ampio di temperature, ma con giornate molto calde può danneggiare anche le cellule vegetali. A temperature molto basse ed alta umidità ambientale o in presenza di piogge la sua azione è meno efficace. Lo zolfo agisce come vapore, allo stato elementare, sia sul micelio fungino che sulle spore, penetrando nelle cellule e danneggiando la membrana plasmatica, cosicché queste muoiono per disseccamento. Differentemente dal rame, l’impiego dello zolfo non è stato ancora limitato nemmeno in agricoltura biologica, ma sono motivo di dibattito sia la sua pericolosità nei confronti di alcuni insetti ed altri artropodi utili, che nei confronti dell’uomo, in particolar modo per gli operatori agricoli. Tuttavia l’impiego dello zolfo deve essere sospeso almeno sei settimane prima della raccolta a causa dei problemi che può causare in fase di fermentazione ed alla qualità dei vini. Un grosso punto di vantaggio è che, a tutt’oggi, lo zolfo non è stato superato da resistenze sviluppate da *E. necator*: la sua azione è infatti multisito, poiché colpisce diverse parti del metabolismo fungino, al contrario di quanto è avvenuto già dagli anni ’80, con molte molecole organiche, all’inizio molto efficaci. A proposito di questi ultimi prodotti per la difesa tra le più utilizzate ci sono i benzimidazoli, gli inibitori della biosintesi dell’ergosterolo, le strobilurine, le quinoline, gli inibitori della succinato-deidrogenasi. La maggior parte dei principi attivi, però, ha un meccanismo di azione unisito che viene facilmente superato dalla resistenza del fungo, soprattutto quando utilizzate ripetutamente nel corso della stessa stagione. Per questo i fungicidi di sintesi vengono spesso utilizzati alternati allo zolfo. Anche l’applicazione dei trattamenti nelle fasi più sensibili può diminuire molto l’incidenza della malattia e le quantità utilizzate. Infatti, trattamenti effettuati due settimane dopo la fioritura hanno mostrato un’efficacia maggiore nel ridurre le infezioni a carico dei grappoli rispetto a trattamenti effettuati cinque settimane dopo l’antesi, dopo lo sviluppo quindi, della resistenza ontogenetica degli acini (Austin e Wilcox, 2011). Queste considerazioni impongono agli operatori un’attenzione particolare nel gestire questa malattia in campo soprattutto in relazione alle fasi fenologiche della vite. Anche nel caso di assenza di germogli a bandiera e di foglie giovani con sintomi evidenti, possono scoppiare in maniera epidemica le infezioni a carico dei grappoli nella fase di maggiore suscettibilità compresa tra allegagione e pre-invaiaitura. Quindi sono importanti trattamenti mirati a prevenire i

danni a carico dei frutti proprio in queste fasi critiche. La conoscenza della zona di coltivazione e la diffusione del patogeno nelle stagioni vegetative passate è fondamentale per orientare i piani di difesa secondo linee più o meno aggressive nei confronti dell'oidio. Nelle aree ad alto rischio, per esempio quelle collinari, è fondamentale attuare piani di lotta basati sia su trattamenti specifici nei momenti di maggiore rischio per la coltura, sia su un attento monitoraggio dell'andamento dei sintomi in campo e della situazione climatica. Altrettanta importanza hanno, però, anche le pratiche agronomiche che possono ridurre l'incidenza dell'oidio o migliorare l'efficacia dei trattamenti. In particolare la gestione della chioma è una componente fondamentale nei programmi integrati di lotta. La potatura invernale e soprattutto quella verde devono essere finalizzate ad assicurare un miglior arieggiamento della vegetazione e dei grappoli, anche la defogliazione dei tralci in prossimità dei grappoli riducendo l'umidità, favorisce la penetrazione dei trattamenti ed aumenta l'esposizione degli acini alla radiazione solare, che ha un effetto positivo nel contrastare lo sviluppo del patogeno (Austin e Wilcox, 2011; Austin *et al.*, 2011). Lo studio di differenti sistemi di gestione della chioma ha evidenziato l'influenza sul microclima nella zona dei grappoli e l'effetto sull'incidenza e la severità della malattia (Zahavi *et al.*, 2001). È stato anche dimostrato che gli acini di piante con gestione verticale dei tralci, quindi con un'esposizione maggiore alla radiazione solare, sono meno suscettibili anche in prove di infezione condotte in laboratorio (Zahavi e Reuveni, 2012). Tali prove hanno separato l'effetto della radiazione solare sul fungo da quello sugli acini, che dunque sono probabilmente stimolati a produrre sostanze che li proteggono dal patogeno. Queste considerazioni sono utili anche riguardo all'impostazione di altre pratiche agronomiche come ad esempio la gestione del suolo, che influenzando il vigore delle piante, può favorire o meno lo sviluppo della malattia (Valdés-Gómez *et al.*, 2011). Anche la gestione delle irrigazioni può molto influenzare la malattia che aumenta notevolmente con volumi irrigui maggiori (Austin e Wilcox, 2011). In particolare la gestione del suolo con inerbimenti permanenti e temporanei ha causato un minor sviluppo vegetativo della vite, evidenziato dal minor numero di foglie per germoglio, e minore severità dei sintomi della malattia soprattutto sui grappoli, rispetto alle gestioni con controllo chimico delle infestanti. Come già detto precedentemente, *V. vinifera* non possiede basi genetiche di resistenza al patogeno che invece sono presenti in alcune specie, soprattutto nord-americane. Tuttavia l'impiego di varietà ibride, franco-americane, è attualmente limitato a coltivazioni hobbistiche, sia per restrizioni imposte dalla legislazione che per le caratteristiche qualitative dei vini ottenuti da esse, poco amate dai consumatori. Un problema non secondario di alcune di queste varietà ibride o derivate dalle specie americane è anche la grande quantità di pectine presenti nelle bacche che in fase di fermentazione danno origine a

quantità pericolose di metanolo. Per quanto riguarda l'utilizzo di mezzi biologici di lotta, non sono ancora sufficienti a garantire una difesa efficace del vigneto contro questa patologia. Ugualmente, i nemici naturali del patogeno, pur limitandone lo sviluppo, non bastano a mantenerlo al di sotto di livelli economicamente accettabili. Finora l'antagonista più efficace a disposizione è il fungo *Ampelomyces quisqualis*, presente nel preparato AQ10. Questo fungo è un micoparassita che generalmente ha una modesta efficacia durante la stagione estiva. La sua azione distruttiva sulle colonie e sui cleistoteci di *E. necator* è invece più marcata in stagioni molto umide e soprattutto all'inizio dell'autunno (Falk *et al.*, 1995), quando però le infezioni hanno già causato danni. Anche l'artropode *Orthotydeus lambi* che vive su *V. riparia* nel suo ambiente naturale nel Nordamerica, può ridurre nelle piante non trattate l'oidio a livelli molto bassi: l'artropode si nutre delle ife del fungo danneggiandole e causandone così il disseccamento ed il collasso; in tal modo l'espansione delle colonie fungine viene molto ridotta così come la sporulazione. Generalmente però l'utilizzo di zolfo ed altri fungicidi di sintesi, come Carbaryl e Mancozeb sono risultati altamente tossici per l'acaro micofago e riducono fortemente le sue popolazioni in vigneto (Melidossian *et al.*, 2005).

Meccanismi di resistenza a *Erysiphe necator*

V. vinifera, è altamente suscettibile al patogeno *E. necator*, tuttavia, come in specie americane considerate al contrario resistenti, i livelli intraspecifici di suscettibilità sono molto diversi (Cadle-Davidson *et al.*, 2010). L'oidio è un patogeno originario del Nord America ed è arrivato in Europa a metà del secolo XIX, causando nel giro di pochi decenni danni gravissimi a tutta la viticoltura del Vecchio Mondo, proprio per la suscettibilità della specie europea, mettendone a rischio la sopravvivenza in molti comprensori tradizionalmente vocati. Al contrario, alcune specie nordamericane, che si sono coevolute con il patogeno, come *V. riparia* e *V. aestivalis*, presentano una minore suscettibilità (Cadle-Davidson *et al.*, 2010; Staud, 1997): per questo già nel XIX secolo sono stati ottenuti molti ibridi interspecifici tra le viti americane e quella europea che sono interfertili; in particolare una certa diffusione e notorietà nel passato è stata quella degli ibridi franco-americani come Vignoles e Baco Noir. Sfortunatamente, però, la scarsa qualità dei vini ottenuti con le varietà ibride ne ha limitato la diffusione e ristretto molto l'utilizzo a scopi enologici delle loro uve. Attualmente la coltivazione per scopi produttivi di questi ibridi franco-americani è limitata solo ad alcune zone orientali e centrali degli Stati Uniti. Fonti di resistenza genetica all'oidio sono state trovate anche tra le specie asiatiche. In effetti delle circa 70 specie del genere *Vitis*, più di un terzo sono originarie solo della Cina, alcune dell'Asia Centrale ed altre ancora della Siberia; studi su alcune delle specie cinesi hanno messo in evidenza la presenza di molte accessioni resistenti soprattutto fra quelli delle specie *V.*

bryoniifolia, *V. davidii* e *V. piasezkii*, anche se differenze intraspecifiche sono state osservate (Wang *et al.*, 1995). Oltre alle potenziali fonti di resistenza nei programmi di breeding, le specie asiatiche hanno il vantaggio di non possedere l'aroma foxy che ha molto limitato l'utilizzo delle specie americane nei programmi di ibridazione. Molte altre specie del genere *Vitis*, asiatiche e americane, ed altre della famiglia delle *Vitaceae* sono suscettibili a *E. necator*. Tra queste alcune appartenenti ai generi *Parthenocissus*, *Cissus* e *Ampelopsis* (Boubals, 1961; Cadle-Davidson *et al.*, 2010). I meccanismi grazie ai quali le specie più tolleranti o resistenti possono difendersi dall'attacco del patogeno possono essere molteplici. Generalmente si suole dividerli in meccanismi costitutivi ed induttivi.

- **Meccanismi di difesa costitutivi**

I meccanismi di difesa costitutivi afferiscono a quella categoria di barriere fisico-chimiche che prevengono ed impediscono la penetrazione della maggior parte dei patogeni. Tra queste, ad esempio, le cere presenti sulla superficie fogliare e i metaboliti secondari con azione antimicrobica e/o antifungina, presenti nei tessuti vegetali a prescindere dall'attacco dei patogeni, denominate fitoanticipine. Nel caso di altre specie di oidio ad esempio, sono stati messi in relazione con la resistenza lo spessore della cuticola, la composizione delle cere delle foglie e le caratteristiche osmotiche delle cellule epidermiche (Martin *et al.*, 1957; Mence *et al.*, 1966; Schnathorst, 1959), tuttavia nel caso della vite non sono stati trovati ancora meccanismi di resistenza di questo tipo. Anche le caratteristiche morfo-anatomiche dei differenti organi della pianta sono state messe in relazione con il diverso grado di suscettibilità al patogeno, tuttavia recenti indagini su molti caratteri ampelografici hanno dimostrato solo una leggera correlazione negativa tra la resistenza degli acini e la densità del grappolo e tra le depressioni del lembo e la resistenza delle foglie (Gaforio *et al.*, 2011). Questi due effetti possono essere giustificati con la scarsa ventilazione e la modifica del microclima di foglie e grappoli, che quindi risultano più esposti alle infezioni. Tuttavia la bassa correlazione riscontrata non sembra offrire certezze sulla resistenza nella selezione per questi caratteri nelle cultivar.

- **Meccanismi di difesa indotti**

Le difese induttive, denominate dagli anglosassoni "Triggered Immunity", sono messe in atto dalle piante per contrastare le infezioni già in atto allo scopo di bloccarle ed evitare che i patogeni possano colonizzare i tessuti. In particolare le strategie di difesa evolute dalle piante sono due e si basano su due livelli diversi di risposta, come anche confermano gli studi effettuati su orzo e *Arabidopsis* (Dry *et al.*, 2009; Wan *et al.*, 2008). La prima strategia, denominata Pathogen-Associated Molecular Pattern (PAMP)-Triggered Immunity (PTI), si basa sul riconoscimento della chitina fungina da parte dei recettori di membrana. Questo riconoscimento

attiva il pathway PTI che si esplica nella secrezione di molecole che vanno a rinforzare le difese a livello della parete cellulare o bloccano la penetrazione già nello spazio extra-cellulare. In pratica, contro l'oidio la PTI riduce la percentuale di conidi che formano un austorio ed è esemplificata dalla resistenza posseduta dalle piante non ospiti. In questi casi specie di oidio ospite-specifiche, su piante non ospiti possono solamente germinare per formare un appressorio e raramente si sviluppano ulteriormente. Nelle piante ospiti le difese basate sulla PTI sono superate dalle specie di oidio ospite-specifiche che hanno sviluppato la capacità di secernere “effettori”, molecole specifiche che sopprimono la risposta difensiva dell'ospite e manipolano le funzioni cellulari allo scopo di facilitare il processo infettivo (Dry *et al.*, 2010). Le piante ospiti hanno evoluto un secondo livello di resistenza denominato Effector-Triggered Immunity (ETI): in questo caso le molecole che sopprimono la PTI, gli “effettori”, sono riconosciute da geni R (Resistance genes) che attivano a loro volta una serie di risposte che bloccano lo sviluppo del fungo, tra queste anche la morte cellulare programmata (PCD) che grazie ad una reazione ipersensibile puntiforme molto rapida riesce a fermare l'avanzata del patogeno biotrofo. La resistenza di tipo ETI entra in atto dopo la formazione delle strutture austoriali di nutrizione e la secrezione di “effettori” di natura proteica all'interno delle cellule epidermiche ospiti, impedendo con la necrosi cellulare lo sviluppo della colonia fungina. La resistenza di tipo ETI è spesso superata da episodi di delezione o mutazione di un singolo effettore, in tal modo il processo parassitario può procedere senza le difese che la pianta, prima resistente, metteva in atto. Tra le specie di origine nordamericana *V. rotundifolia* è considerata resistente a *E. necator* grazie a un singolo locus dominante Run1 (Resistance to *Uncinula necator* 1) che è stato trasferito anche a *V. vinifera*, con sei incroci successivi, conferendo agli ibridi una resistenza completa (Pauquet *et al.*, 2001). La resistenza mediata da Run1 produce la PCD nelle cellule epidermiche penetrate dal fungo fermando il suo sviluppo a partire dalla formazione dell'ifa secondaria, appena dopo 12-24 ore la penetrazione. La resistenza basata su un solo gene, però, è facilmente superabile, come dimostrato da isolati di *E. necator* raccolti nell'ambiente naturale di *V. rotundifolia* (Ramming *et al.*, 2011). Sono state identificate razze diverse di *E. necator* e questo può giustificare il superamento dei geni per la resistenza ETI in pochi anni; sia Run1 che Ren1 (Resistance to *Erysiphe necator* 1, recentemente isolato in *V. vinifera*), potrebbero avere un'utilità agronomica di breve durata considerato il lungo ciclo produttivo delle colture arboree (Dry *et al.*, 2010). Questa considerazione unita ai lunghi tempi necessari per ottenere e studiare nuovi individui a partire dal seme, rendono necessario il perseguimento di una resistenza durevole quando si sviluppano nuove cultivar di vite. Nella specie di origine nordamericana *V. cinerea* e nell'ibrido interspecifico Regent, sempre di origine americana, di cui però non sono

stati individuati i parentali sono stati individuati altri geni in grado di conferire una resistenza parziale all'oidio della vite. Di questi geni di tipo QTL (Quantitative Trait Loci), come Ren2 e Ren3, scoperti in questi genotipi, non è stato chiarito il meccanismo fisiologico che determina la resistenza. In vite questa resistenza potrebbe avere una utilità agronomica più duratura (Welter, 2007), anche se gli ibridi interspecifici finora ottenuti sono associati a caratteristiche qualitative dei frutti piuttosto negative. Geni di resistenza sono stati trovati anche nelle specie selvatiche di origine cinese come *V. romanetii* cui appartiene il locus Ren4 (Resistance to *Erysiphe necator* 4), *V. amurensis*, *V. piasezkii*, *V. davidii*, *V. liubanensis* e *V. bashanica* (Wan *et al.*, 2007). Questo tipo di resistenza contro un patogeno non nativo delle stesse aree geografiche ed i livelli molto variabili di resistenza tra genotipi della stessa specie, devono essere però ancora sufficientemente indagati. E' stata studiata la segregazione del gene Ren4 nella progenie di *V. vinifera* x *V. romanetii* (Ramming *et al.* 2011): il singolo locus dominante conferisce una resistenza rapida e non razza-specifica e non tessuto-dipendente che si esplica nella riduzione della percentuale di penetrazione del patogeno e soprattutto nella marcata diminuzione nella percentuale di successo dell'infezione, evidenziata dalla mancata formazione di un'ifa secondaria. Come avvalorato da moltissime osservazioni tutti i vitigni del Mediterraneo e delle regioni vicine dell'Asia derivati da *V. vinifera* sono stati sempre considerati suscettibili all'oidio. La nulla o scarsa probabilità di trovare cultivar resistenti è dovuta al tempo relativamente poco disponibile per permettere una coevoluzione tra ospite vegetale e patogeno recentemente introdotto ed alla propagazione agamica delle varietà. Quindi, molto più interessante, anche ai fini della comprensione dei meccanismi che regolano lo sviluppo delle basi genetiche della resistenza, è la recente scoperta di due cultivar di *V. vinifera*, Kishmish vatkana e Dzhandzhal kara, appartenenti alla specie *V. vinifera* subsp. *sativa* proles *orientalis* subproles *antasiatica*, originarie dell'Uzbekistan, in Asia Centrale, che hanno mostrato un alto livello di PCD grazie al locus singolo dominante Ren1 (Hoffman *et al.*, 2008). In Armenia, Iran, regioni attorno al Mar Nero e nelle Repubbliche dell'Asia Centrale la presenza di un vasto patrimonio di varietà di vite (This *et al.*, 2006) in parte propagate anche sessualmente al di fuori delle coltivazioni, potrebbe aver favorito una maggiore evoluzione a partire dall'arrivo di *E. necator* rispetto a quanto avvenuto nelle varietà mediterranee. Queste risorse genetiche sono state ignorate dagli ibridatori europei, anche per l'isolamento delle regioni di origine, poi nel 1977 è stata identificata da Filippenko e Stin l'accessione Dzhandzhal kara, resistente alla malattia e successivamente, dopo una lunga indagine nel germoplasma proveniente dalle regioni dell'Asia Centrale, la cultivar Kishmish vatkana, attualmente ancora coltivata nell'Est dell'Uzbekistan per le uve consumate fresche, in cui la forte pressione di malattia non produceva sintomi

apprezzabili. Studi recenti hanno verificato che foglie e acini non mostrano sintomi di malattia durante la stagione vegetativa e solo le foglie senescenti permettono la crescita di limitate colonie del fungo. Lo sviluppo della malattia è stato studiato in Kishmish vatkana in parallelo ad un vitigno suscettibile e non sono state evidenziate differenze nella penetrazione del patogeno. Infatti la germinazione dei conidi, la formazione del tubetto germinativo e lo sviluppo dell'appressorio sono stati del tutto simili, così come la formazione di un'ifa primaria, indice del successo della penetrazione cellulare e dell'instaurazione di una relazione compatibile tra ospite e patogeno. La proliferazione ifale, al contrario, superate le 72 hpi, è stata limitata nella varietà resistente, cosicché la densità di conidiofori, 120 ore dopo l'inoculazione, è stata alla fine significativamente più bassa (circa di 10 volte) rispetto a quella rilevata nella cultivar sensibile. A livello cellulare, infatti, la varietà resistente ha mostrato degli imbrunimenti particolari a partire dalla parete cellulare che poi hanno interessato l'intera cellula e talvolta quelle vicine (Hoffmann *et al.*, 2007). La spiegazione ipotizzata per la manifestazione di questa resistenza in varietà di *V. vinifera*, oltre alla propagazione per via gamica di questi vitigni è la presenza in Asia ed Australia di patogeni endemici molto vicini a *E. necator*. Di altri geni correlabili alla resistenza in *V. vinifera* sono poco chiari i meccanismi che regolano la risposta all'attacco parassitario e soprattutto la risposta stessa non determina efficaci livelli di resistenza. Ad esempio nel caso delle proteine PR (pathogenesis-related proteins), livelli maggiori di chitinasi e di β -1,3-glucanasi, che hanno mostrato in vitro un'attività litica nei confronti dei tubetti germinativi di *E. necator*, sono stati estratti sia in foglie infette di vite che in acini nella fase di preinvaiatura (Giannakis *et al.*, 1998). Inoltre le stesse proteine presenti in quantità elevate costitutivamente potrebbero essere le responsabili della bassa suscettibilità in specie nordamericane del genere *Vitis*. Sempre riguardo alla resistenza negli acini è stato evidenziato che il gene GLP (germin-like proteins), denominato VvGLP3, viene indotto in acini più vecchi, ontologicamente resistenti, e non in giovani, non ontologicamente resistenti, a seguito dell'infezione con *E. necator* (Ficke *et al.*, 2004). Al contrario il gene VvPR-1, Pathogenesis Related, viene espresso in maniera maggiore negli acini suscettibili a seguito dell'inoculazione. In effetti gli acini, che sono molto suscettibili nel periodo post-allegagione, diventano del tutto immuni 2-4 settimane dopo la fioritura (Ficke *et al.*, 2003), anche se la resistenza ontogenetica delle differenti parti del grappolo, acini, pedicelli e rachide, si manifesta in maniera diversificata (Gadoury *et al.*, 2001). Il meccanismo che regola tale tipo di resistenza ontogenetica negli acini più vecchi non è ancora chiaro e non sembra correlabile a modifiche morfo-anatomiche. È stato dimostrato infatti che i conidi del patogeno cessano la germinazione prima di penetrare la cuticola degli acini, ma sebbene la cuticola incrementi il suo spessore con lo sviluppo degli acini,

non sembra essere questo a bloccare la penetrazione, che è già arrestata prima della formazione del poro (Ficke *et al.*, 2004). Inoltre anche lo spessore della parete cellulare non aumenta nelle prime quattro settimane post-allegagione, periodo nel quale gli acinelli da altamente suscettibili divengono resistenti. Anche la produzione di chitinasi e di thaumatin-like protein negli acini durante l'invasione non può essere legata, come si credeva, all'acquisizione della resistenza, in quanto gli acini diventano immuni ben prima di questo stadio fenologico (Gadoury *et al.*, 2003). Allo stesso modo l'accumulo di sostanze polifenoliche durante l'infezione, generalmente legato alle difese induttive (Treutter, 2006), non sembra essere la causa dell'arresto dello sviluppo del patogeno. I composti polifenolici autofluorescenti sono accumulati con maggiore frequenza in prossimità degli appressori formati sugli acini molto suscettibili e la loro ossidazione, indicata dalla decolorazione cellulare, avviene in misura maggiore negli acini non resistenti. La formazione di papille al di sotto degli appressori formati dai conidi in germinazione è stata rilevata con maggiore frequenza negli acini di 2-5 giorni rispetto a quelli di 30-31 giorni, ma in questi ultimi il maggior numero è situato al di sotto degli appressori che hanno fallito la penetrazione, al contrario di quanto accade negli acini più giovani (Ficke *et al.*, 2004). Si può quindi dire che mentre l'adesione dei conidi, la loro germinazione e la formazione dell'appressorio non sono influenzati dall'età dell'acino, il successo della penetrazione, la formazione di austori e lo sviluppo di ife secondarie diminuiscono fino ad annullarsi man mano che la resistenza ontogenetica viene espressa (Ficke *et al.*, 2003). Dato che il patogeno in molti casi viene fermato prima della formazione di pori di penetrazione visibili i meccanismi della resistenza ontogenetica operano nell'interfaccia tra appressorio e cuticola dell'acino; ma se lo spessore di questa non sembra implicato nella resistenza, altri possibili cambiamenti strutturali o biochimici, costitutivi o indotti, a carico della stessa cuticola o della parete potrebbero essere responsabili del blocco dell'infezione. Mentre negli acini giovani, suscettibili alla malattia, sono messi in moto meccanismi anatomici e biochimici che forse sono solo parzialmente efficaci contro *E. necator*, di cui viene rallentata solo la crescita, negli acini più sviluppati la resistenza ontogenetica è sufficiente per bloccare l'insediamento del fungo sulla superficie vegetale entro le 24 ore dall'arrivo dell'inoculo. Anche nelle foglie la cuticola e la parete cellulare sono le prime barriere che il patogeno deve superare per insediarsi ed avviare la patogenesi; lo spessore di entrambe è stato messo in correlazione con il livello di tolleranza a *E. necator* in differenti cultivar di vite (Heintz *et al.*, 1989; Heintz *et al.*, 1990) e a *Sphaeroteca pannosa* in rosa anche se in questo caso la cuticola non sembra essere una barriera alla penetrazione (Mence *et al.*, 1966). Nel caso delle foglie, sia di specie di *Vitis* che di ibridi interspecifici, la maturazione implica una riduzione della penetrazione e dello sviluppo ifale (Stein *et al.*, 1985). Lo studio

dell'interazione tra ospite e patogeno ha messo in luce un accumulo di polifenoli sia nella parete cellulare che nelle cellule adiacenti legato all'attività delle perossidasi. Questo ha suggerito che la penetrazione dell'appressorio nella cellula induca meccanismi difensivi legati a fenomeni ossidativi, reazione ipersensibile, accumulo di metaboliti come proteine PR o stilbeni (Heintz *et al.*, 1990). La tossicità delle fitoalessine di natura stilbenica è stata dimostrata da molto tempo nei confronti di altri funghi, come *Botrytis cinerea*, agente della muffa grigia, o *P. viticola* (Langcake e Pryce, 1976; Adrian *et al.*, 1997). Più recentemente è stato osservato che un pretrattamento con metil-giasmonato, tre giorni prima dell'inoculazione delle foglie del vitigno suscettibile Cabernet-Sauvignon, riduce fortemente l'infezione e lo sviluppo dell'oidio. Contestualmente è stato rilevato che nelle cellule epidermiche delle foglie la stessa sostanza induce la sintesi di resveratrolo, piceide, ϵ e δ -viniferina e in minor misura di pterostilbene. Per questo motivo tali molecole sono state associate anche all'aumento di tolleranza della vite nei confronti di *E. necator* (Belhadj *et al.*, 2006). Tuttavia l'estrazione e la quantificazione delle viniferine stilbeniche in differenti cultivar di vite con livelli diversi di tolleranza, tra le quali *V. candidans* resistente, ha dato risultati non del tutto chiari; i dati espressi in rapporto al peso fresco sembrano essere in contraddizione con l'ipotesi che gli stilbeni siano implicati nei meccanismi di resistenza. Tuttavia ciò potrebbe essere spiegato con la presenza di molte cellule sane, libere da fitoalessine, che causano una diluizione dei quantitativi trovati, considerando che la sintesi e la mobilitazione dei metaboliti di difesa sono limitate alle cellule adiacenti al sito di infezione (Schnee *et al.*, 2008). Ciò ha confermato anche la mancanza di un segnale sistemico delle cellule infette verso le cellule sane circostanti. In effetti mentre *P. viticola* sviluppa un micelio intercellulare che invade tutto il mesofillo, *E. necator* limita l'infezione solo al primo strato epidermico. Conseguentemente nel primo caso il numero esponenziale di cellule in contatto con il patogeno aumenta molto l'induzione della sintesi degli stilbeni. Per questo, per avere un più realistico quadro del ruolo delle viniferine nella resistenza all'oidio e con l'obiettivo di identificare un marker per valutare il potenziale di resistenza dei genotipi soggetti a programmi di selezione, è stata proposta una quantificazione degli stilbeni riferita al numero degli appressori, piuttosto che al peso fresco (Schnee *et al.*, 2008).

CAPITOLO III

Obiettivo della tesi

La difesa della vite dagli attacchi dei patogeni, soprattutto fungini, è certamente un aspetto fondamentale nella gestione del vigneto, particolarmente nell'ambito della conduzione in biologico. L'ottenimento di uve in ottimo stato sanitario è importante per il miglioramento delle caratteristiche qualitative del prodotto che si vuole ottenere, ma anche per l'impatto sull'ambiente, la salute degli operatori agricoli ed il contenimento dei costi di produzione. A questo proposito la scelta dei vitigni o dei cloni per l'impianto assume un notevole rilievo dato che questi devono possedere contemporaneamente le caratteristiche qualitative, agronomiche e tecnologiche richieste. L'obiettivo di questa tesi è stato quello di caratterizzare e studiare la tolleranza di alcuni vitigni autoctoni o coltivati da lungo tempo nel territorio del Centro Italia nei confronti di due tra le principali malattie parassitarie della vite, la peronospora e l'oidio.

I vitigni per le prove sono stati scelti in base alle notizie storiche raccolte, sia in funzione della loro effettiva diffusione passata, che del loro grado di suscettibilità a patogeni riportato dagli ampelografi. Sulla base di queste osservazioni in campo si evidenzia che, pur non essendo *V. vinifera sativa* resistente ai due patogeni, nell'ambito della variabilità esistente tra le varietà ed all'interno di queste, sono stati rilevati diversi livelli di tolleranza (Boso *et al.*, 2004; Boso *et al.*, 2006; Boso *et al.*, 2011; Boso e Kassemeyer 2008; Gaforio *et al.*, 2011). Test in campo ed in laboratorio hanno classificato 22 accessioni di *V. vinifera* da resistenti a molto suscettibili (Cadle-Davidson, 2010). La conoscenza del diverso grado di suscettibilità ai patogeni dei vitigni è un presupposto fondamentale non solo per i programmi di breeding, ma anche per permettere scelte razionali al momento dell'impianto dei vigneti nelle diverse situazioni. Soprattutto in viticoltura biologica, l'impiego di cultivar meno suscettibili agli stress biotici può costituire un fattore decisivo sia per la riduzione dei trattamenti che per garantire livelli qualitativi soddisfacenti, specialmente in quelle aree in cui le condizioni climatiche sono favorevoli allo sviluppo delle malattie.

Considerate queste premesse le attività sono state perciò indirizzate all'approfondimento delle caratteristiche di tolleranza/suscettibilità di alcuni vitigni a *P. viticola* ed *E. necator*. Sono state effettuate sia osservazioni in pieno campo, che prove condotte in laboratorio su foglia staccata intera e su dischi fogliari. Inoltre sono state osservate alcune caratteristiche anatomiche dei tessuti fogliari allo scopo di verificare eventuali rapporti con i diversi gradi di tolleranza. Obiettivo delle prove è stato anche quello di studiare le fasi di sviluppo del patogeno all'interno dei tessuti, nel caso della peronospora, o sulla superficie fogliare, nel caso dell'oidio, e

conseguentemente analizzare le risposte biochimiche messe in atto dalla pianta per mezzo della determinazione con la HPLC delle fitoalessine di natura stilbenica.

Vitigni scelti per le prove

I vitigni scelti per le prove sono stati: Aleatico e Canaiolo nero, a bacca nera, Romanesco, Trebbiano giallo e Trebbiano toscano a bacca bianca.

- **Aleatico**

È un vitigno a bacca nera, considerato una mutazione del Moscato, introdotto secondo alcuni in Italia dagli antichi Greci (Acerbi, 1825). Il suo nome potrebbe derivare da “iouliatico”, da luglio, il mese in cui invaia e comincia la maturazione. È diffuso soprattutto nel Centro Italia, in particolare in Toscana con i nomi di Uva liatica, Aliatico, Liatico, Uva dei Gesuiti, Lacrima Christi (Molon, 1906); famoso è l’Aleatico dell’Isola d’Elba. È utilizzato soprattutto per vini dolci e aromatici da dessert, proprio in virtù del suo gradevole aroma moscato e già nei secoli scorsi le sue produzioni, limitate nella quantità, erano destinate a vini liquorosi da fine pasto. Anche in provincia di Viterbo è piuttosto diffuso, anche se meno rispetto al passato quando veniva coltivato sia per la produzione di vini di pregio per il consumo familiare che per la produzione di uva da tavola (Gallesio, 1833; Cinelli 1884; Mengarini, 1888; Mancini, 1893) . È coltivato soprattutto nella parte settentrionale della provincia per la produzione del vino DOC “Aleatico di Gradoli”. Sensibile alle crittogame, era coltivato in località ariose ed asciutte (Marzotto, 1925; Dalmaso 1946).

- **Canaiolo nero**

Vitigno a bacca nera, già citato da Gallesio nel 1839 con il nome di *Vitis vinifera etrusca*. Il suo nome deriva probabilmente dai “dies caniculares”, i giorni più caldi dell’anno, quando questa varietà comincia ad invaiare. La sua diffusione è ampia in tutto il Centro Italia, fin da tempi lontani (Acerbi, 1825), soprattutto in Toscana dove è vinificato insieme ad altre uve come “uva da governo”, molto raramente è infatti vinificato da solo. In provincia di Viterbo è coltivata la Cannaiola di Marta, un biotipo del Canaiolo (Natali e Bignami, 1988; Muganu *et al.* 2009), utilizzato per i vini a denominazione di origine “Colli Etruschi Viterbesi Canaiolo” e “Colli Etruschi Viterbesi Cannaiola” solo per le uve provenienti da i comuni di Marta e Capodimonte. Già nella seconda metà del XIX secolo la Cannaiola era considerata una varietà tipica dei territori di Marta e Capodimonte sulle rive del lago di Bolsena (Cinelli, 1884; Mengarini, 1888). Relativamente alle malattie fungine, già in passato veniva considerato piuttosto suscettibile sia alla peronospora che all’oidio (Breviglieri e Casini, 1964) e veniva coltivato in ambienti di

collina più esposti e meno soggetti a ristagni di umidità (Vannuccini, 1882); tuttavia per alcuni la sua resistenza all'oidio era discreta, ma richiedeva diligenti zolfature (Molon, 1906).

- ***Romanesco***

È un vitigno a bacca bianca, appartenente alla famiglia varietale dei “Belli”, conosciuto in passato anche col nome di Pagadebiti o Scassadebiti per la sua produttività elevata, o Uva Pane per il suo utilizzo come uva da tavola. Diffuso in tutto il Lazio con molti sinonimi tra i quali Cacchione, Zinnavacca, Arciprete, Campanaro, Piciocchione, Bellobuono, Pampanaro, Cencione, Mostosa (Mancini, 1893) comprendeva biotipi diffusi localmente con caratteristiche ampelografiche del grappolo e vigore variabili (Acerbi, 1825; Marzotto, 1925). Nel XIX secolo era molto diffuso nella provincia viterbese soprattutto per le sue buone doti produttive (Mengarini, 1888). Al contrario la qualità risultava inferiore a quella delle uve del Rossetto, l'altro vitigno più diffuso del Viterbese (Cinelli, 1894). Veniva descritto come poco tollerante al marciume e alla peronospora (Prosperi, 1939).

- ***Trebbiano giallo***

Con questo nome è iscritto al Registro Nazionale delle Varietà un vitigno a bacca bianca diffuso, anche nel passato (Acerbi, 1825) soprattutto nel Centro Italia, in particolare nel Lazio, soprattutto nella zona dei Castelli Romani. Nel Viterbese è conosciuto col sinonimo ufficiale di Rossetto ed era anche nel passato una delle varietà più rappresentative della zona (Mengarini, 1888; Mancini, 1893). Tra i nomi con i quali veniva e viene chiamato soprattutto nelle zone meridionali della provincia, c'è quello di “Greco”, derivato probabilmente dalle caratteristiche dei vini con esso prodotti. Già Gallesio nel 1833 ne sottolineava le qualità ed anche Cinelli (1884) ne consigliava una più ampia diffusione. Veniva utilizzato per la produzione di vinsanto, dolce e liquoroso, sia per il consumo familiare, in particolari occasioni, che per destinazioni commerciali. I grappoli venivano raccolti e lasciati appassire in locali coperti ed arieggiati o addirittura lasciati sulle piante dopo la torsione del rachide. La pratica dell'appassimento per questa varietà trova ancora oggi giustificazione per le sue buone qualità (Muganu *et al.*, 2010; Muganu *et al.*, 2011). Veniva descritta anche nel passato la sua buona tolleranza all'oidio ed alla peronospora (Prosperi, 1939).

- ***Trebbiano toscano***

È il vitigno, tra tutti quelli appartenenti alla grande famiglia dei Trebbiani, più diffuso e conosciuto, soprattutto per la sua elevata produttività e per la buona tolleranza alle avversità parassitarie. È coltivato su 60000 ettari ed è presente in decine di DOC, tuttavia le sue uve non hanno caratteristiche elevate di qualità poiché possiedono un'acidità elevata e scarsa dotazione in aromi. Pur essendo molto coltivato in Italia Centrale ed in particolare in Toscana, ove partecipa

alla produzione del vinsanto dopo l'appassimento su graticci, è probabilmente originario del Mediterraneo Orientale. Molti sono i sinonimi con i quali è conosciuto in Italia, tra questi Bubiano, Santoro, Albano e Procanico in Umbria e soprattutto nell'Alto Lazio e molte sono le differenze ampelografiche tra i suoi cloni e biotipi, soprattutto legate a forma e dimensioni del grappolo. Anche in Francia è molto diffuso fin dal Basso Medioevo quando vi giunse con i papi durante la cattività avignonese; ivi è conosciuto col nome di Ugni Blanc o Saint-Emilion ed è utilizzato per la produzione del Cognac e dell'Armagnac, in Provenza è invece chiamato Roussan per il colore rosseggiante dei grappoli alla maturazione. In Spagna invece serve per produrre il brandy. Attualmente viene vinificato col Rossetto e con la Malvasia bianca lunga per ottenere il vino Est! Est!! Est!!!, produzione tipica del viterbese. Già a fine XIX secolo veniva descritto come più tollerante alle malattie rispetto ai vitigni a bacca nera e per questo più adatto anche alle giaciture più basse e umide (Vannuccini, 1892), tuttavia per alcuni richiedeva diligenti inzolfature a causa di una elevata sensibilità all'odio (AA. VV., 1885).



Aleatico



Canaiolo n.



Romanesco



Trebbiano g.



Trebbiano t.

Figura 2: grappoli maturi dei cinque vitigni scelti per le prove

CAPITOLO IV

Valutazione della tolleranza dei vitigni a *Plasmopara viticola*

Materiali e metodi

I vitigni scelti per le prove sono stati: Aleatico e Canaiolo nero, a bacca nera, Romanesco, Trebbiano giallo e Trebbiano toscano a bacca bianca.

Le piante sono coltivate nel vigneto dell'Azienda Agricola Didattico-Sperimentale dell'Università degli Studi della Tuscia (42°25'21"N-12°04'45"E). Per ciascun vitigno sono presenti cinque piante, innestate su 420 A (Millardet e De Grasset), allevate a spalliera (1,5m x 3m), con orientamento Nord-Sud delle file e potatura a Guyot. Le piante sono state tutte sottoposte alle stesse pratiche agronomiche e durante le prove non sono stati effettuati trattamenti fitosanitari. Da queste piante sono state prelevate talee per la produzione di piante in vaso da impiegare in prove condotte in ambiente controllato. Le talee prelevate a fine inverno da tralci di un anno sono state fatte radicare in substrato torboso e trasferite in vasi container 16x16 cm in ambiente protetto con fotoperiodo naturale e trattate settimanalmente con zolfo per evitare contaminazioni da parte di *E. necator*. Come varietà controllo sono state utilizzate Solaris (resistente) e Chasselas (suscettibile).

A) Osservazioni eseguite su piante in pieno campo

Le osservazioni in pieno campo sono state condotte nel triennio 2009-2011, su piante non trattate delle cinque varietà oggetto dello studio. Per la determinazione del grado di resistenza alla *Plasmopara* è stata utilizzata la scala di valutazione OIV (descrittore n° 452 OIV, 2007); i rilievi sono stati effettuati su foglia nel periodo compreso tra la fioritura e l'invasiatura tenendo conto delle condizioni climatiche (temperatura, piovosità, evapotraspirazione e umidità relativa) che influenzano la malattia, monitorate per mezzo di data logger Campbell Mod CR 10X1 presente nella stazione meteorologica dell'Azienda Agraria sede delle prove. I dati ottenuti sono stati sottoposti all'analisi della varianza (ANOVA).

B) Studio delle caratteristiche anatomiche

1) *Livello di tomentosità della superficie abassiale delle foglie per mezzo della microscopia elettronica a scansione.*

Nella prima decade di luglio tre foglie per ciascuna cultivar sono state campionate al 7-8 nodo apicale dalle piante coltivate in pieno campo. Da ciascuna foglia sono stati prelevati quattro campioni di superficie di circa 25 mm² con l'ausilio di un bisturi. Le porzioni di tessuto sono state adagiate su una griglia in rame e sottoposte ad un trattamento con tetrossido di osmio al 2%

in tampone cacodilato 0.1M a pH 7.2 per quattro ore a temperatura ambiente. Successivamente i campioni sono stati posti in tampone cacodilato 0.1M a pH 7.2 per una notte a 4°C, successivamente disidratati mediante trattamento con acetone a concentrazioni crescenti dal 50% al 100% ed essiccati mediante il metodo del punto critico con CO₂ liquida in un apparato CPD 020 (Balzer), (Gindro *et al.*, 2003). Ciascun campione essiccato è stato ricoperto con uno strato di oro usando l'evaporatore Union MED 010 (Balzer). Sui campioni così preparati sono state condotte osservazioni al microscopio elettronico a scansione Jeol JSM 5200 (Tokyo, Giappone). I campioni sono stati fotografati con una macchina Mamiya applicata al microscopio utilizzando una pellicola TMAX 100 ASA.

La tomentosità dei cinque vitigni è stata inoltre valutata per mezzo dei descrittori OIV (2009), relativi al livello di densità dei peli striscianti presenti tra le nervature della pagina inferiore della foglia giovane (descrittore OIV 053) e della foglia adulta (OIV 084). Le scale vanno da 1 (assenza di peli striscianti) a 9 (densità dei peli striscianti molto elevata).

2) Determinazione del numero medio di stomi per unità di superficie mediante microscopia a fluorescenza.

Le sezioni fogliari dei cinque vitigni sono state immerse per 15 min a 60°C in una soluzione 1M di KOH, successivamente lavate e messe per 1 min. in una soluzione allo 0,02% di blu di anilina in buffer di sodio bicarbonato al 5% (Kortekamp *et al.*, 1997; Diez-Navajas *et al.* 2007). Ai vitigni in osservazione sono stati aggiunti i due vitigni Solaris (resistente) e Chasselas (suscettibile). Le osservazioni sono state condotte su 24 aree diverse ciascuna di 0,16 mm² mediante microscopio a fluorescenza Leica DLMB (filtro UV Leitz, eccitazione a 340 nm, emissione a 380 nm, filtro di stop LP 430nm).

C) Prove di inoculazione in ambiente controllato

1) Prove su foglia staccata

Dalle piante coltivate in ambiente protetto sono state staccate le foglie al quinto/sesto nodo apicale, e successivamente risciacquate in acqua distillata. Le inoculazioni sono state effettuate con 6 differenti sospensioni di zoosporangi alle seguenti concentrazioni crescenti: 2.5×10^4 (inoculo A), 5×10^4 (inoculo B), 7.5×10^4 (inoculo C), 1×10^5 (inoculo D), 2.5×10^5 (inoculo E), 5×10^5 (inoculo F). L'inoculo è stato ottenuto raccogliendo da piante in campo non trattate foglie con sintomi di *P. viticola*. Avvenuta la sporulazione è stata verificata la presenza del patogeno per mezzo della microscopia ottica. L'inoculo è stato poi propagato su foglie delle cultivar Malvasia del Lazio e Cardinal, due vitigni suscettibili e successivamente crioconservato a -80°C. Al momento dell'inoculo gli zoosporangi conservati sono stati sospesi in acqua distillata. La concentrazione dell'inoculo è stata valutata per mezzo della Cella di Thoma.

Per ogni varietà e per ogni concentrazione sono state inoculate tre foglie, spruzzando uniformemente la pagina inferiore con le sospensioni fino allo sgocciolamento. Le foglie sono state successivamente poste su carta bibula saturata con acqua distillata, in piastre Petri di vetro del diametro di 20 cm, chiuse con parafilm e mantenute in ambiente controllato a $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperiodo di 16 ore di luce. Come controllo sono state utilizzate 2 foglie per ciascun vitigno e le procedure di inoculo hanno previsto l'uso di sola acqua distillata.

Sette giorni dopo l'inoculazione (days post inoculation = dpi) sono stati osservati i sintomi della malattia e per ciascuna foglia è stata determinata la percentuale di superficie interessata dalla sintomatologia. L'esperimento è stato ripetuto tre volte. I dati ottenuti sono stati trattati statisticamente tramite l'analisi della varianza (ANOVA), previa conversione in arcoseno.

2) Prove di inoculazione su dischi fogliari

Le foglie, campionate al 5° e 6° nodo apicale delle piante delle cinque varietà in prova allevate in ambiente protetto, sono state abbondantemente risciacquate con acqua distillata e asciugate delicatamente con carta da filtro. Con l'ausilio di un foratappi sono stati prelevati dei dischi fogliari di 16 mm di diametro che sono stati poggiati su carta bibula saturata con acqua distillata in piastre Petri. Per ogni vitigno sono stati inoculati 20 dischi fogliari deponendo sulla superficie abassiale 5 gocce di soluzione inoculante contenente 5×10^4 zoosporangi/ml. Per queste prove l'inoculo è stato preparato con le modalità descritte in precedenza. Le piastre Petri sono state poi sigillate con parafilm e poste in ambiente controllato alle stesse condizioni descritte per le foglie. Al settimo giorno dopo l'inoculazione i sintomi sono stati osservati con uno stereomicroscopio e la diffusione della malattia sul tessuto è stata valutata per mezzo del descrittore OIV 452-1 relativo al grado di resistenza alla *Plasmopara* (test su dischi fogliari), che prevede l'impiego di una scala da 1 (grado di resistenza debole) a 9 (grado di resistenza molto elevato). Come controllo sono stati utilizzati 5 dischi per ciascun vitigno in cui le procedure di inoculo hanno previsto l'uso di sola acqua distillata.

Le prove sono state ripetute tre volte ed i risultati sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA).

D) Studio dello sviluppo del patogeno nei tessuti per mezzo della microscopia ottica a fluorescenza

E' stata effettuata una prova di inoculo su foglia staccata secondo le modalità operative descritte al punto 2 utilizzando due inoculi di $2,5 \times 10^4$ e di 5×10^5 zoosporangi/ml rispettivamente.

Le sezioni fogliari sono state campionate in corrispondenza delle gocce di inoculo e preparate per l'osservazione al microscopio a fluorescenza secondo le modalità descritte precedentemente.

Lo sviluppo del patogeno all'interno dei tessuti fogliari è stato effettuato utilizzando la

microscopia a fluorescenza, secondo il protocollo descritto da Diez-Navajas *et al.* (2007). Per valutare eventuali differenze di velocità nello sviluppo del patogeno sono state campionate per ogni vitigno 4 sezioni di tessuto fogliare a 24 e 48 ore dopo l'inoculazione (hours post inoculation = hpi); per ogni sezione sono state osservate due aree di 0,16 mm². I campionamenti sono stati ripetuti tre volte per un totale di 24 aree di saggio. La percentuale di stomi infetti è stata calcolata e la corrispondente frequenza relativa di ciascuno stadio di sviluppo da S1 a S4 è stata valutata sia a 24 che a 48 hpi (Unger *et al.*, 2007). I risultati sono stati espressi come media della percentuale di stomi infetti e come media della percentuale di ciascun stadio di sviluppo. È stato inoltre calcolato il numero di zoospore del patogeno penetrate con successo per ogni stoma infetto ed il numero di zoospore penetrate con successo negli stomi per unità di superficie. Contestualmente alle determinazioni sul patogeno è stata quantificata anche la densità stomatica media per ciascun vitigno.

E) Quantificazione delle viniferine stilbeniche in tessuti fogliari inoculati

A 72 hpi da foglie infettate con i due diversi inoculi è stata prelevata una porzione di tessuto in corrispondenza della goccia di inoculo. Ciascun campione è stato trasferito in un tubo da 1,5 ml in cui sono stati aggiunti 50 µl di metanolo. I tubi chiusi sono stati posti in agitazione per 10 minuti a 60°C, e successivamente raffreddati in un bagno di ghiaccio per 5 min. Per la determinazione degli stilbeni 30 microlitri dell'estratto metanolico sono stati analizzati con la cromatografia HPLC (Pezet *et al.*, 2003; Jean-Denis *et al.*, 2006). Come controlli sono stati impiegati i due vitigni Solaris (resistente) e Chasselas (suscettibile). Per ogni vitigno sono state effettuate tre ripetizioni.

Risultati

A) Resistenza alla malattia in pieno campo

Le osservazioni in pieno campo condotte nei tre anni hanno messo in evidenza valori più elevati di resistenza, pur se in misura non statisticamente significativa all'analisi della varianza, nelle varietà a bacca bianca, in particolar modo di Trebbiano giallo, e che sembrano quindi avere una maggiore tolleranza alla malattia rispetto a quelle a bacca nera utilizzate in queste prove (Figura 3). Tali rilievi confermano le tendenze che già gli ampelografi del XIX secolo avevano annotato nelle descrizioni di questi vitigni.

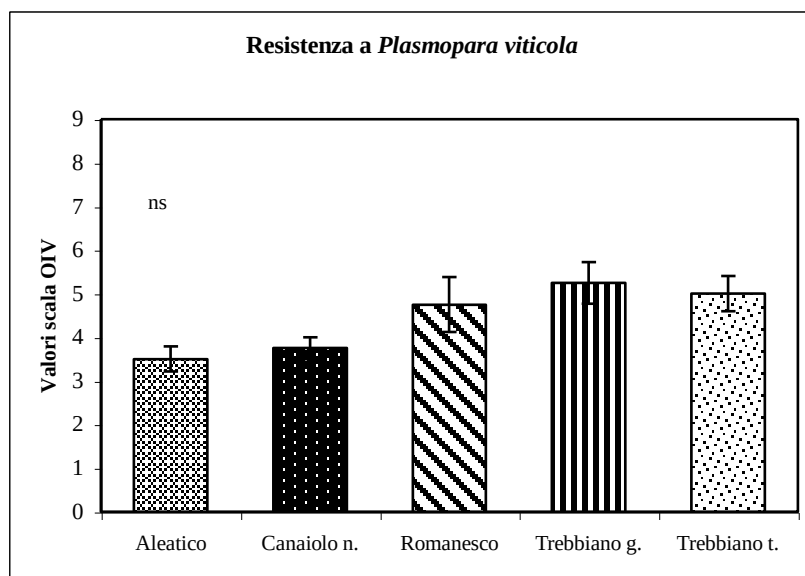


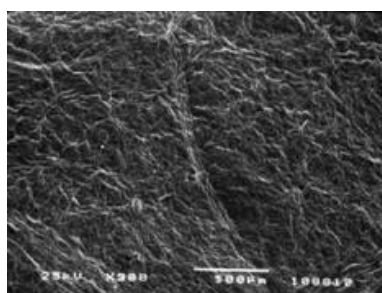
Figura 3: grado di resistenza alla Plasmopara in pieno campo dei cinque vitigni secondo il descrittore OIV n°453. I risultati sono espressi come media dei rilievi nel triennio 2009-2011, le barre rappresentano l'errore standard; ns = differenze non significative secondo il test di Tukey ($p < 0.05$)

B) Caratteristiche anatomiche della foglia

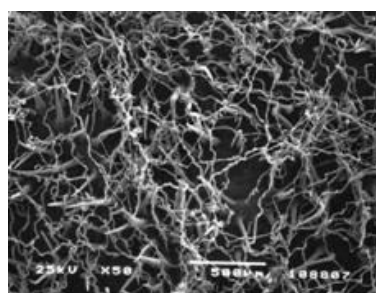
Lo studio delle caratteristiche anatomiche ha messo in evidenza un livello di tomentosità molto differente tra i vitigni. In particolare Canaiolo nero e Romanesco hanno mostrato una tomentosità molto elevata, mentre in Aleatico la tomentosità è risultata completamente assente (Tabella 1). Nella figura 4 sono riportate le immagini al microscopio elettronico a scansione della superficie fogliare abassiale delle varietà in prova.

Tabella 1: densità dei peli striscianti sulla pagina inferiore della foglia giovane e della foglia matura nei diversi vitigni, secondo la scala OIV (OIV, 2009).

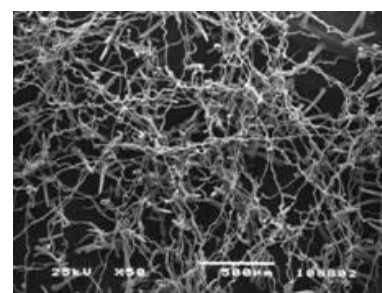
Descrittore OIV	Aleatico	Canaiolo n.	Romanesco	Trebbiano g.	Trebbiano t.
Livelli di espressione					
OIV 053 Foglia giovane: densità dei peli striscianti tra le nervature principali della pagina inferiore del lembo	1	9	7	6	6
OIV 084 Foglia adulta: densità dei peli striscianti tra le nervature delle pagina inferiore del lembo	1	7	7	3	5



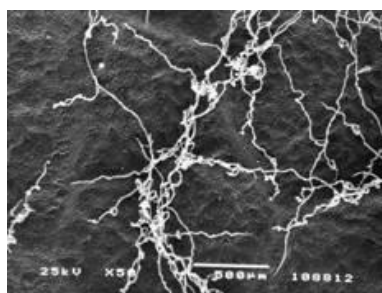
Aleatico



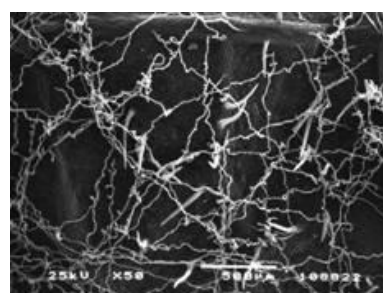
Canaiolo n.



Romanesco



Trebbiano g.



Trebbiano t.

Figura 4: immagini al microscopio elettronico a scansione delle pagina fogliare inferiore dei cinque vitigni, che evidenziano i diversi livelli di tomentosità

La determinazione del numero medio di stomi per unità di superficie ha mostrato differenze significative ($p < 0,001$) tra i vitigni, pur nei limiti dei valori riportati per la specie *V. vinifera* (Paliotti *et al.*, 2000). In particolare la varietà con il numero minore di stomi è risultata Trebbiano giallo, mentre Aleatico, Canaiolo nero e Trebbiano toscano hanno mostrato i valori maggiori e tra essi simili. Solaris, ha evidenziato, invece, una densità stomatica più elevata delle cultivar di *V. vinifera*.

Tabella 2: numero di stomi per unità di superficie fogliare determinato per mezzo della microscopia a fluorescenza nei cinque vitigni studiati e in quelli di controllo. I risultati sono espressi come media di 24 osservazioni $\pm$ la deviazione standard

	Aleatico	Canaiolo n-	Romanesco	Trebbiano g.	Trebbiano t.	Chasselas	Solaris
Numero stomi/mm ²	205.4 $\pm$ 19	176.3 $\pm$ 88.9	116.2 $\pm$ 12.1	72.7 $\pm$ 15.7	167.2 $\pm$ 27.9	195.2 $\pm$ 23.0	345.1 $\pm$ 38.9

C) Prove di inoculazione in ambiente controllato

1) Prove su foglia staccata

Le prove di inoculazione su foglia staccata hanno evidenziato differenze molto significative nella tolleranza alla malattia tra le cinque varietà oggetto dello studio. In particolare le varietà a bacca nera Aleatico e Canaiolo nero hanno mostrato la maggiore suscettibilità alla malattia mentre tra quelle a bacca bianca, Trebbiano giallo ha evidenziato le minori percentuali di superficie fogliare interessata dai sintomi (Figura 6, 7, 8 e 9). I risultati ottenuti nei test su foglia staccata, pur evidenziando in generale livelli maggiori di severità rispetto ai sintomi rilevati in vigneto, confermano il diverso grado di suscettibilità alla malattia nei cinque vitigni già osservati in pieno campo. Tali differenze di tolleranza tra vitigni, evidenziano l'eterogeneità dei comportamenti nei confronti delle malattie all'interno di *V. vinifera sativa* come verificato in studi precedenti sia in pieno campo che in laboratorio (Boso *et al.*, 2006; Boso *et al.*, 2011; Cadle-Davidson, 2010). Altrettanto significative sono state le differenze nello sviluppo della malattia al variare della concentrazione di inoculo. I risultati ottenuti indicano chiaramente che all'aumento del numero di zoosporangi corrisponde un incremento della superficie fogliare con sporulazione (Figure 5, 6, 7, e 8). Tuttavia concentrazioni superiori a $7,5 \times 10^4$ - 1×10^5 zoosporangi/ml non producono infezioni più gravi e non aumentano la severità dei sintomi (Figura 5, 8 e 9).

Infine occorre evidenziare che le maggiori differenze di suscettibilità rilevate tra i vitigni si manifestano con le concentrazioni di inoculo più alte confermando risultati già ottenuti in prove riguardanti vitigni resistenti e suscettibili (Alonso-Villaverde *et al.*, 2011).

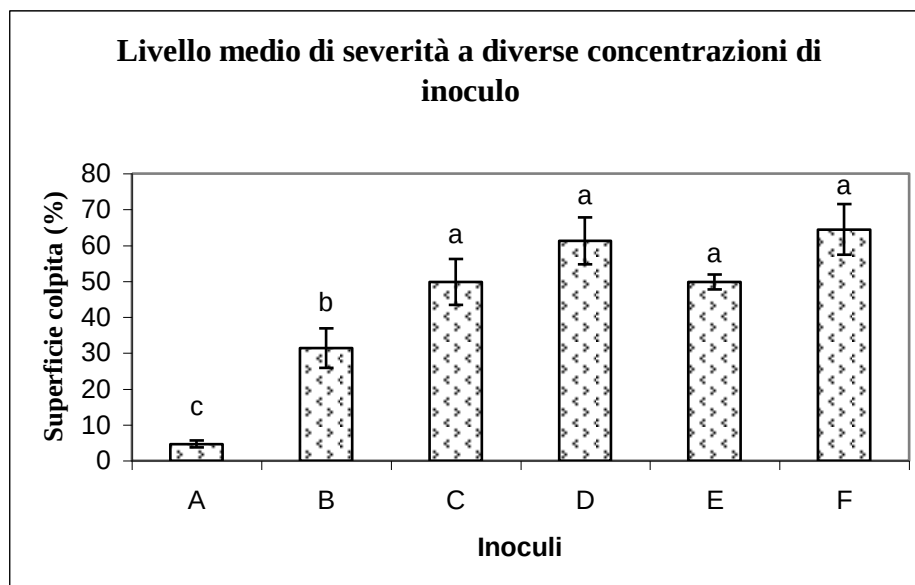


Figura 5: livello medio di severità (valutato come percentuale di superficie fogliare colpita) nei cinque vitigni in funzione dei differenti inoculi a concentrazione crescente di zoosporangi/ml. I risultati sono espressi come media di 15 foglie per inoculazione e di tre ripetizioni, per un totale di 45 foglie per densità di inoculo; le barre rappresentano l'errore standard. Valori con la stessa lettera non differiscono in maniera significativa secondo il test di Tukey ($p < 0.05$)

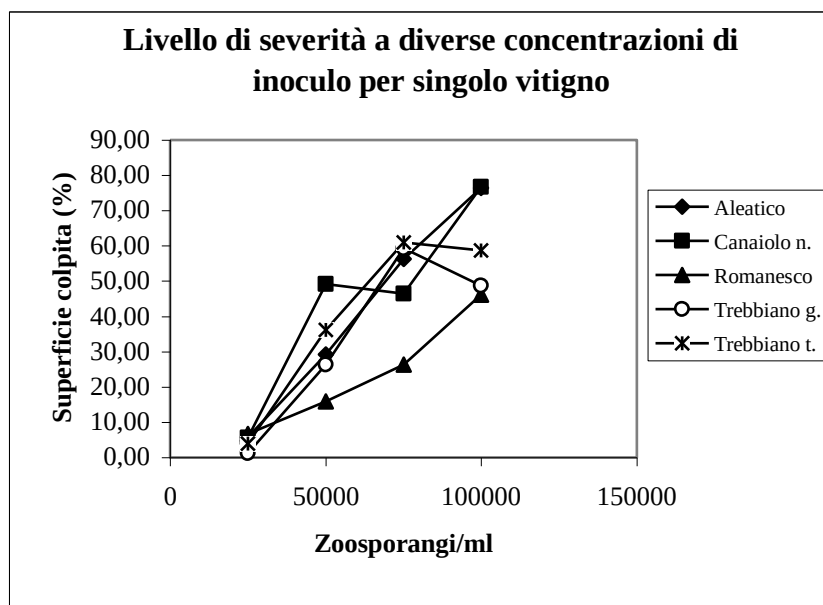


Figura 6: livello di severità (valutato come percentuale di superficie fogliare colpita) in ciascun vitigno in funzione dei diversi inoculi (da A a D) a concentrazioni crescenti di zoosporangi/ml. I risultati sono espressi come media di tre foglie per esperimento, per tre ripetizioni.

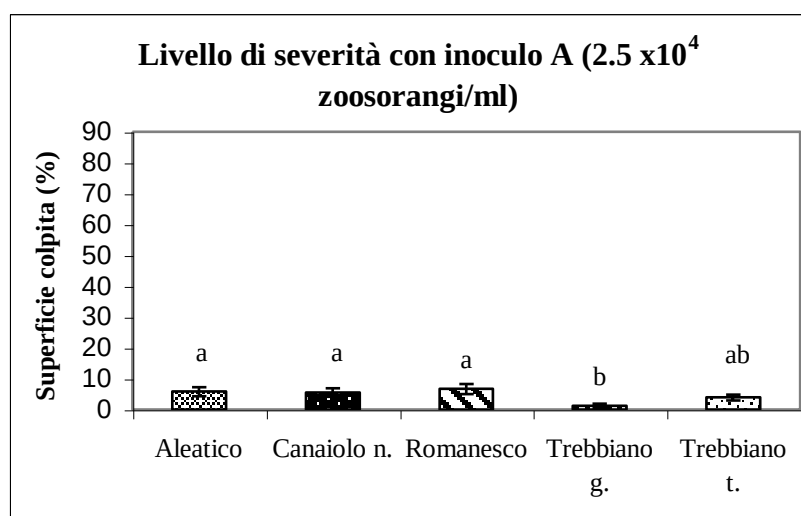


Figura 7: livello di severità (valutato come percentuale di superficie fogliare colpita) in ciascun vitigno con inoculo A ($2,5 \times 10^4$ zoosporangi/ml). I risultati sono espressi come media di tre foglie per esperimento, per tre ripetizioni; le barre rappresentano l'errore standard. Valori con stessa lettera non differiscono in maniera significativa secondo il test di Tukey ($p < 0.05$)

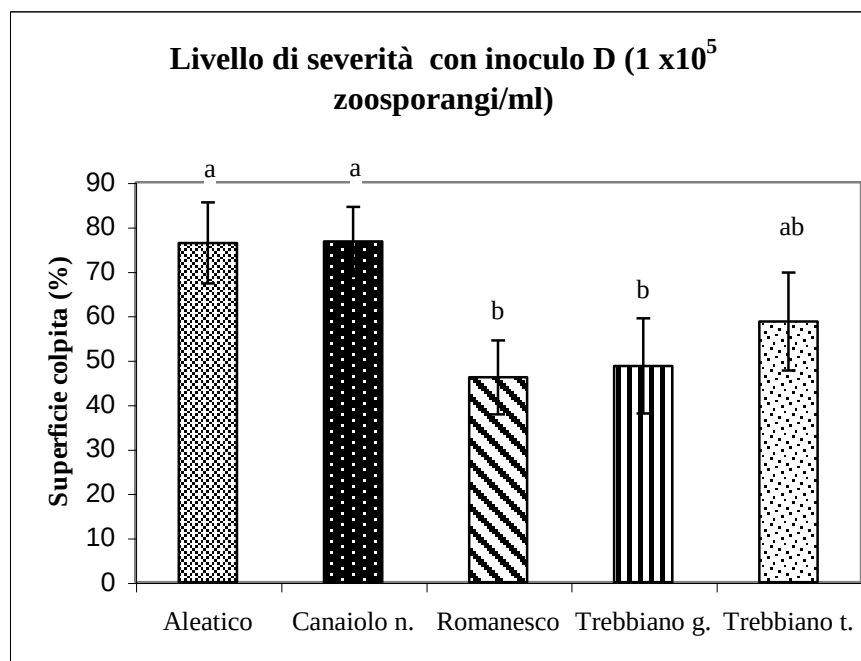


Figura 8: livello di severità (valutato come percentuale di superficie fogliare colpita) in ciascun vitigno con inoculo D (1×10^5 zoosporangi/ml). I risultati sono espressi come media di tre foglie per esperimento, per tre ripetizioni; le barre rappresentano l'errore standard. Valori con la stessa lettera non differiscono in maniera significativa secondo il test di Tukey ($p < 0.05$)

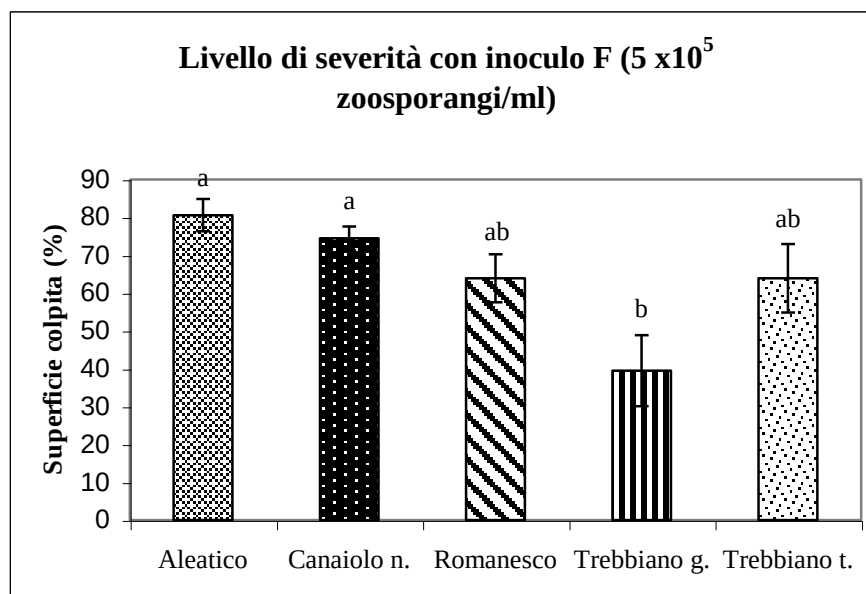


Figura 9: livello di severità (valutato come percentuale di superficie fogliare colpita) in ciascun vitigno con inoculo F (5×10^5 zoosporangi/ml). I risultati sono espressi come media di tre foglie per esperimento, per tre ripetizioni, le barre rappresentano l'errore standard. Valori con la stessa lettera non differiscono in maniera significativa secondo il test di Tukey ($p < 0.05$)

2) Prove di inoculazione su dischi fogliari

I risultati delle prove di inoculazione su dischi fogliari hanno confermato l'elevato grado di resistenza del vitigno Romanesco, anche se con questo metodo si manifesta in misura ancora maggiore, e quello debole di Aleatico. Nelle altre varietà sono stati evidenziati livelli di suscettibilità diversi rispetto a quelli ottenuti nelle prove precedenti. In particolare Trebbiano giallo, che dai dati ottenuti in pieno campo e nelle prove su foglia staccata risultava il vitigno più tollerante tra quelli in osservazione, nelle prove su dischi fogliari ha evidenziato suscettibilità al patogeno. La varietà che maggiormente si è discostata rispetto ai risultati precedenti è stata Canaiolo nero: la sua resistenza è risultata abbastanza elevata in questa prova, contrariamente alla forte suscettibilità mostrata nelle prove su foglia staccata. (Figura 10). Infine Trebbiano toscano ha dimostrato nelle prove su disco suscettibilità a *P. viticola*.

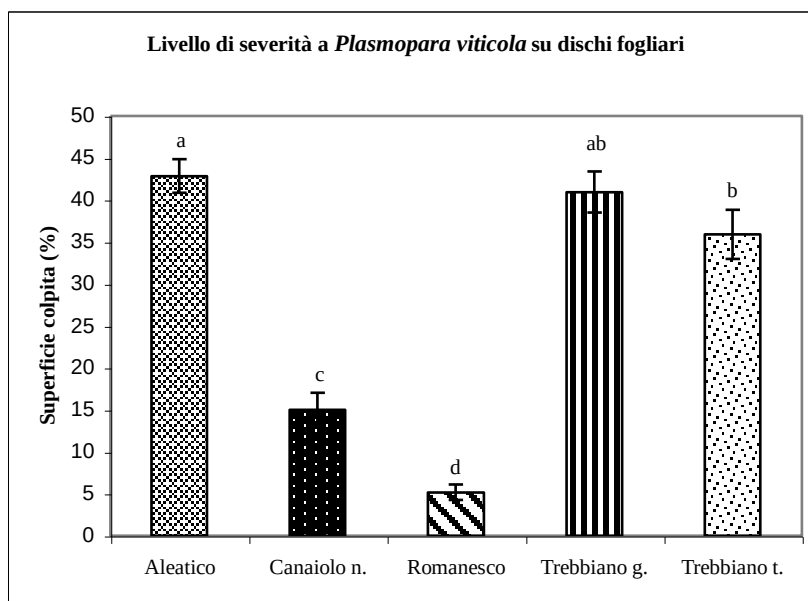


Figura 10: livello di severità (valutato come percentuale di superficie fogliare del disco colpita) in ciascun vitigno con inoculo di 5×10^4 zoospore/ml. I risultati sono espressi come media di 20 dischi per esperimento, per tre ripetizioni, le barre rappresentano l'errore standard. Valori con la stessa lettera non differiscono in maniera significativa secondo il test di Tukey ($p < 0.05$)

D) Sviluppo del patogeno nei tessuti fogliari

La percentuale di stomi infetti è stata significativamente influenzata sia dal vitigno che dalla concentrazione dell'inoculo. Con inoculo basso le differenze tra le varietà sia in termini di zoospore penetrate per unità di superficie che di percentuale di stomi infetti sono state poco significative, mentre l'impiego di un inoculo più alto ha permesso di evidenziare differenze significative tra i vitigni relativamente ai parametri osservati. Significativa ($p < 0,001$) è risultata anche l'interazione vitigno x inoculo. In particolare le differenze tra le varietà si sono evidenziate impiegando l'inoculo più concentrato: in queste condizioni nella varietà resistente Solaris ed in Trebbiano giallo la percentuale di stomi infettati da *P. viticola* è risultata significativamente più bassa rispetto a tutte le altre varietà, addirittura prossima ai valori ottenuti usando l'inoculo meno concentrato. I vitigni con la maggiore percentuale di stomi infetti sono stati Canaiolo nero ed Aleatico (Figura 11).

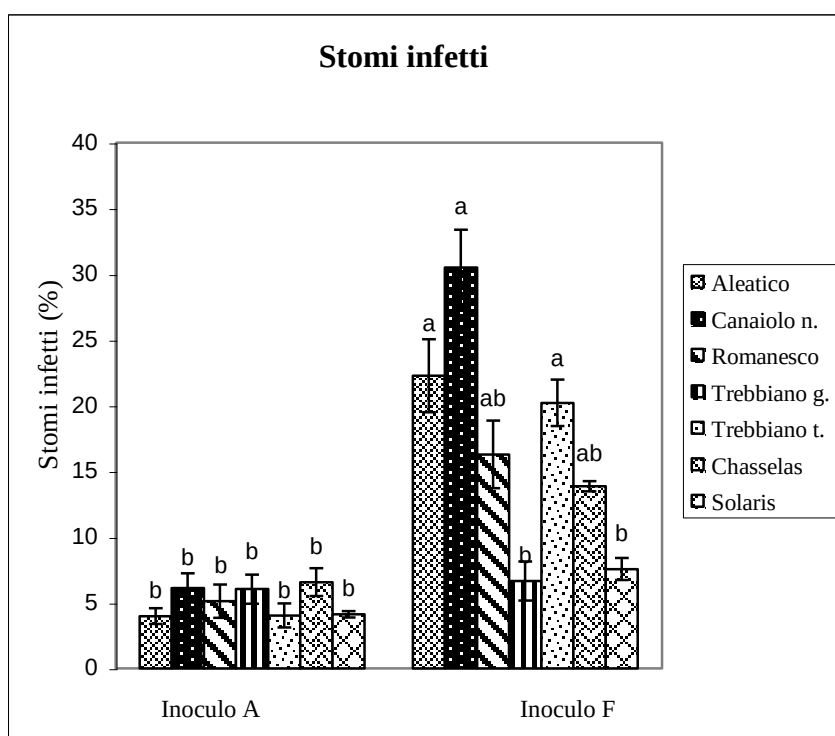


Figura 11: percentuale di stomi infettati da *P. viticola* in ciascun vitigno a due inoculi: A ($2,5 \times 10^4$ zoosporangi/ml) e F (5×10^5 zoosporangi/ml). I risultati sono espressi come media di 8 osservazioni per tre ripetizioni, le barre rappresentano l'errore standard. Valori con la stessa lettera non differiscono in maniera significativa secondo il test di Tukey ($p < 0.05$)

La determinazione del numero medio di zoospore penetrate per ogni stoma infetto ha evidenziato differenze significative tra i vitigni nelle infezioni realizzate con inoculo più alto. In Trebbiano giallo sono stati rilevati i valori maggiori (circa 5 zoospore in media per singolo stoma); valori via via decrescenti si sono avuti in Canaiolo nero e Romanesco (circa 2 zoospore/stoma) e in Trebbiano toscano e Solaris (circa 1 zoospora/stoma). Nel caso delle infezioni con inoculo meno concentrato, invece, non ci sono state differenze di alcun tipo: infatti per ogni stoma infettato è stata riscontrata sempre una sola zoospora penetrata (Figura 12).

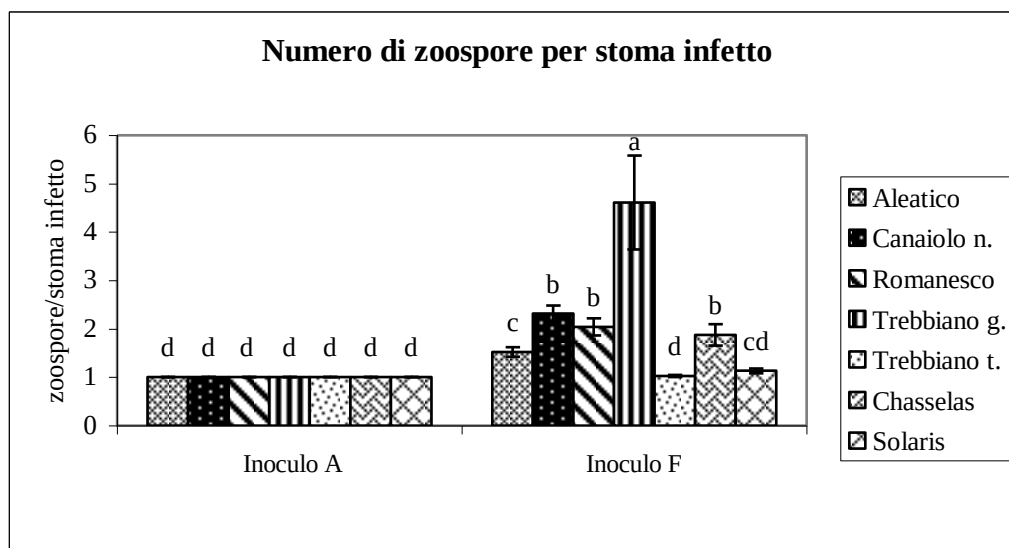


Figura 12: numero di zoospore per stoma infettato da P. viticola in ciascun vitigno a due inoculi: A ($2,5 \times 10^4$ zoosporangi/ml) e F (5×10^5 zoosporangi/ml). I risultati sono espressi come media di 8 osservazioni per tre ripetizioni, le barre rappresentano l'errore standard. Valori con la stessa lettera non differiscono in maniera significativa secondo il test di Tukey ($p < 0.05$)

Il numero di zoospore penetrate con successo per unità di superficie fogliare è stato significativamente differente ($p < 0,001$) sia in funzione delle varietà che della concentrazione dell'inoculo e altrettanto significativa è risultata l'interazione vitigno x inoculo. Le osservazioni effettuate sui tessuti infettati con inoculo meno concentrato hanno messo in evidenza una sostanziale uniformità tra i vitigni; al contrario impiegando un inoculo più concentrato le varietà Trebbiano giallo e Solaris hanno manifestato un numero di zoospore per mm^2 significativamente inferiore alle altre varietà impiegate, mentre Aleatico e Canaiolo nero maggiore di tutte le altre (Figura 13).

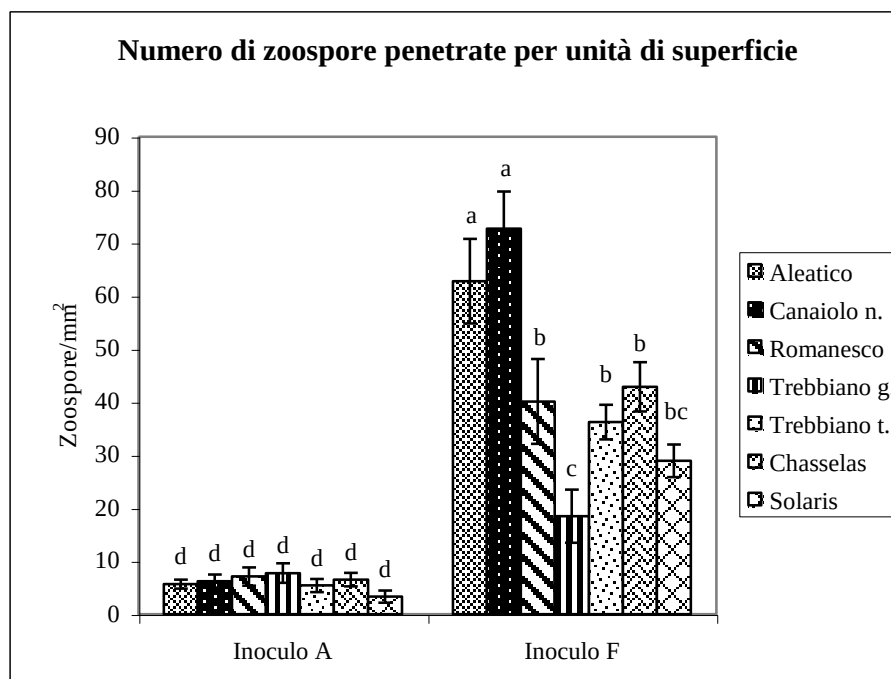


Figura 13: numero di zoospore penetrate per unità di superficie fogliare in ciascun vitigno a due inoculi: A ($2,5 \times 10^4$ zoosporangi/ml) e F (5×10^5 zoosporangi/ml). I risultati sono espressi come media di 8 osservazioni per tre ripetizioni; le barre rappresentano l'errore standard. Valori con la stessa lettera non differiscono in maniera significativa secondo il test di Tukey ($p < 0.05$)

La determinazione delle percentuali relative di ciascuno stadio di sviluppo del patogeno all'interno del tessuto fogliare ha messo in luce a 24 hpi una maggiore rapidità di sviluppo nei tessuti delle varietà Aleatico, Canaiolo nero e Chasselas (Figure 14 e 15). Tuttavia le differenze tra le varietà si sono ridotte nelle osservazioni a 48 hpi in cui soltanto nella varietà Trebbiano giallo si è evidenziata una progressione più lenta della infezione (Figure 16 e 17). Le osservazioni effettuate a 72 hpi non hanno mostrato differenze tra i tessuti delle varietà oggetto di studio in cui gli spazi intercostali sono riempiti dal micelio del patogeno che è limitato solo dalla presenza dei vasi. Ha fatto eccezione solo Solaris in cui ad uno sviluppo iniziale del patogeno del tutto paragonabile a quello avvenuto negli altri vitigni è seguito un blocco della crescita ifale evidente a partire da 72 hpi.

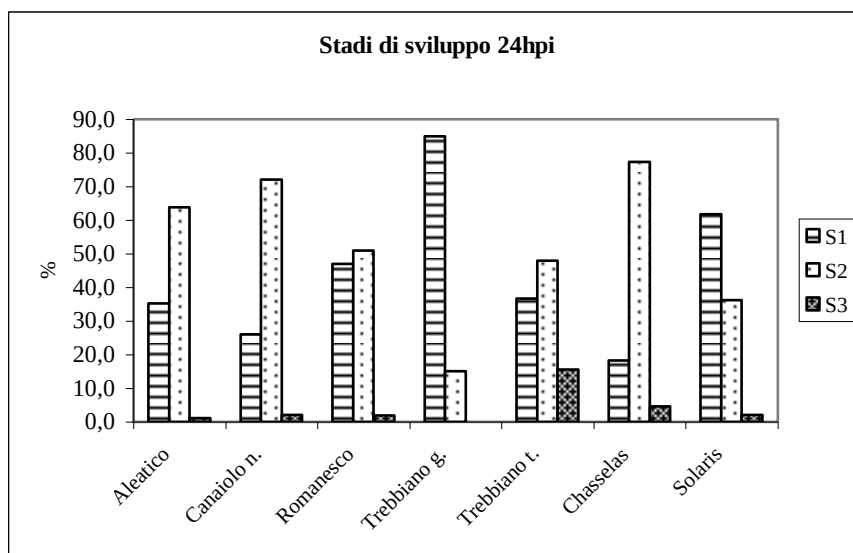
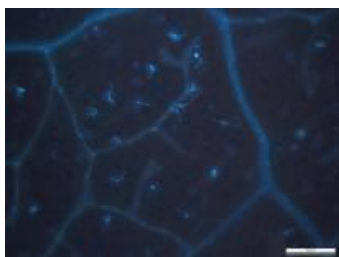
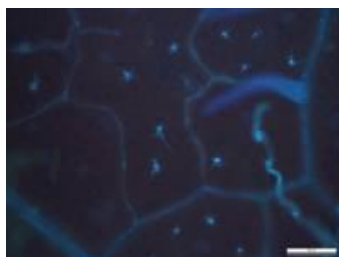


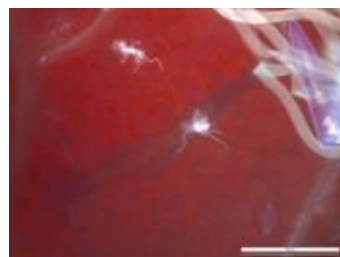
Figura 14: percentuale relativa degli stadi di sviluppo di P. viticola a 24 hpi in ciascun vitigno con inoculo F (5×10^5 zoosporangi/ml). I risultati sono espressi come media di 8 osservazioni per tre ripetizioni



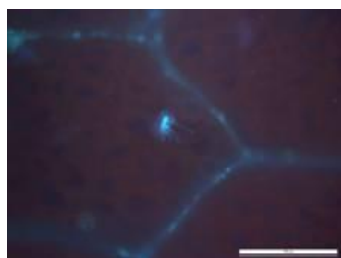
Aleatico



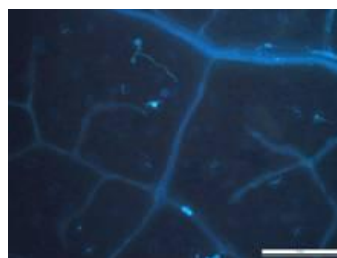
Canaiolo n.



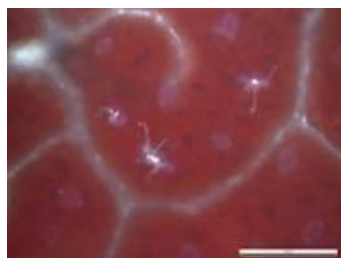
Romanesco



Trebbiano g.



Trebbiano t.



Chasselas



Solaris

Figura 15: immagini alla microscopia a fluorescenza del tessuto fogliare dei vitigni a 24 hpi, che evidenziano la penetrazione da parte del patogeno di un maggior numero di stomi per unità di superficie in Aleatico e Canaiolo nero, e minore in Trebbiano giallo e Solaris. Inoltre si evidenzia anche la presenza di più organismi penetrati per stoma infetto in particolar modo in Trebbiano giallo (barre = 100 μ m)

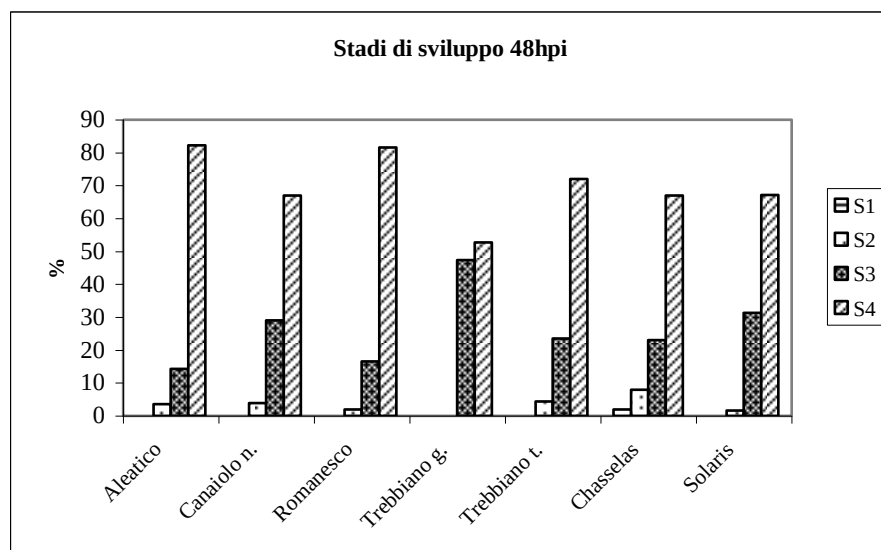


Figura 16: percentuale relativa degli stadi di sviluppo di P. viticola a 48 hpi in ciascun vitigno. I risultati sono espressi come media di 8 osservazioni per tre ripetizioni

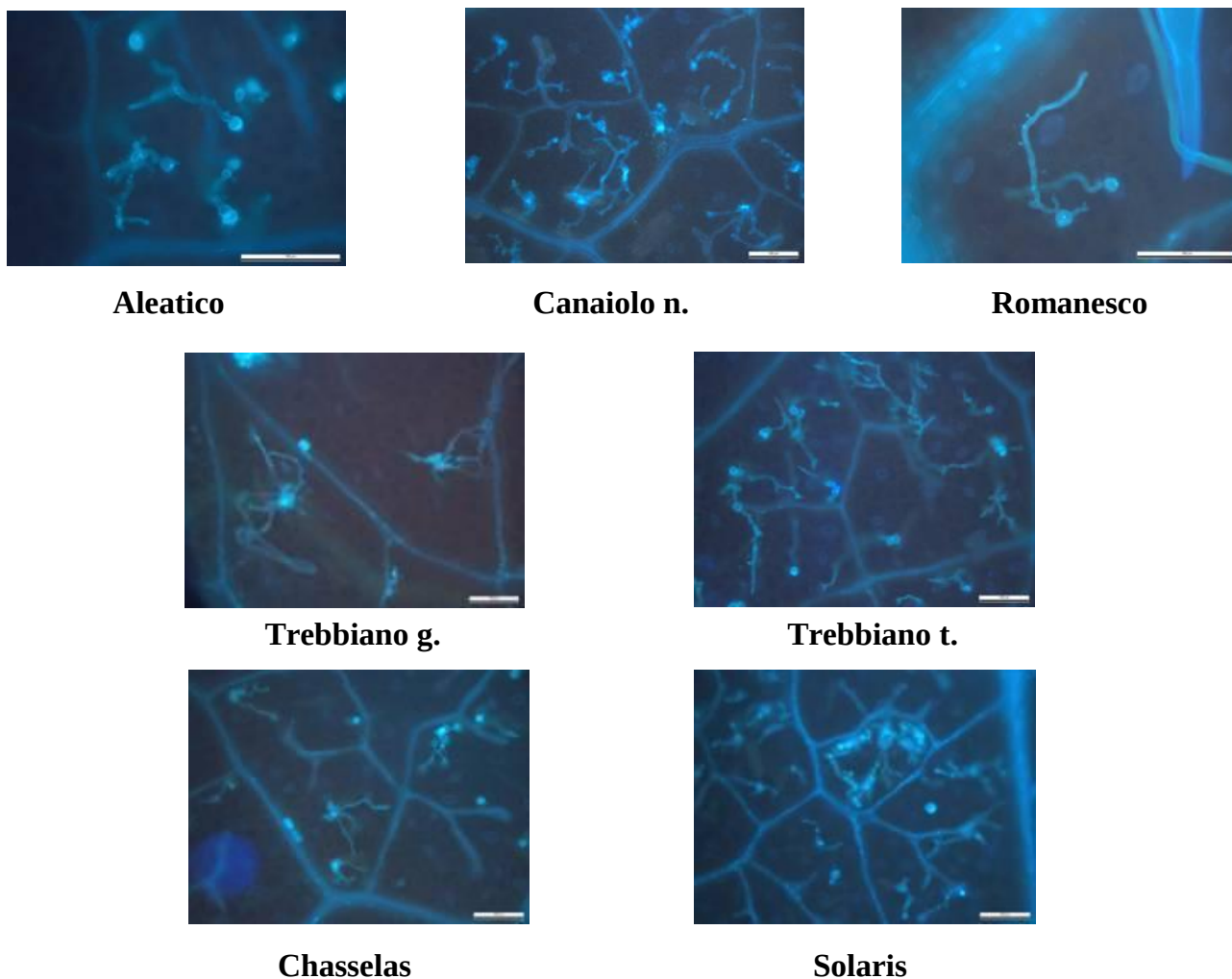


Figura 17: immagini alla microscopia a fluorescenza del tessuto fogliare dei vitigni a 48 hpi, che evidenziano anche nella varietà resistente Solaris uno sviluppo del patogeno non rallentato. Inoltre si evidenzia anche la presenza di più organismi penetrati per stoma infetto in particolar modo in Trebbiano giallo (barre = 100 μ m)

E) Quantificazione delle viniferine prodotte in tessuti fogliari inoculati

Nelle figure 18 e 19 sono riportati i valori rilevati nel tessuto fogliare infettato di ciascuna varietà di differenti composti stilbenici alle due diverse concentrazioni di inoculo.

Alla concentrazione minore di zoosporangi la molecola rilevata in tutti i vitigni ed alle concentrazioni più elevate è il piceide, uno dei derivati glucosilati del resveratrolo, al quale non è attribuita una spiccata azione antimicrobica. Una produzione di resveratrolo si evidenzia in tutti i vitigni, eccetto Aleatico, anche se in quantità limitate. Per quanto riguarda δ - e ϵ -viniferina, alle quali è attribuita una effettiva azione antimicrobica, i valori riscontrati sono stati molto limitati anche nella varietà Solaris notoriamente considerata resistente a *P. viticola*. Infine tracce

di produzione di pterostilbene sono state rilevate in tutte le varietà ad eccezione di Aleatico e Solaris (Figura 18).

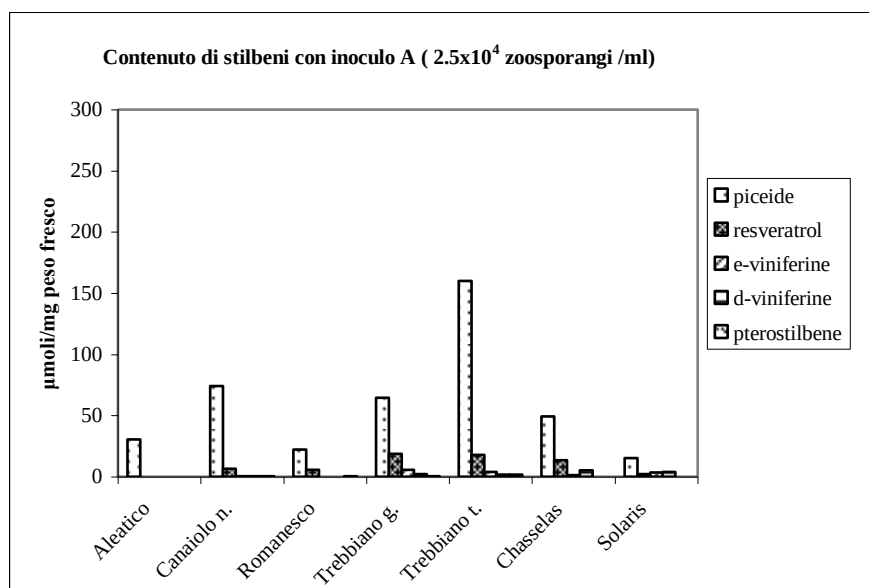


Figura 18: contenuto a 72 hpi di stilbeni in micromoli/mg di peso fresco di tessuto fogliare, nei vitigni infettati con inoculo A ($2,5 \times 10^4$ zoosporangi/ml). I risultati sono espressi come media delle tre ripetizioni.

Per ciò che riguarda la produzione di stilbeni a seguito della infezione con inoculo più concentrato, si può subito evidenziare una netta differenza tra Solaris (resistente) e Chasselas (sensibile) nella produzione di viniferine che conferma le differenze di suscettibilità esistenti.

Per quanto riguarda i vitigni in osservazione, anche con inoculo elevato si evidenzia una produzione di resveratrolo e di piceide, particolarmente in Canaiolo nero, nella maggior parte delle varietà. Per quanto riguarda δ - e ϵ -viniferine, tranne che in Aleatico, il contenuto rilevato evidenzia valori compresi tra quelli delle due varietà controllo, Solaris e Chasselas. I valori elevati ottenuti per le singole molecole stilbeniche nella varietà Aleatico, risultata nelle prove di infezione molto suscettibile alla malattia, rendono necessarie ulteriori analisi per valutare il ruolo della componente stilbenica nel corso del processo infettivo nella varietà (Figura 19).

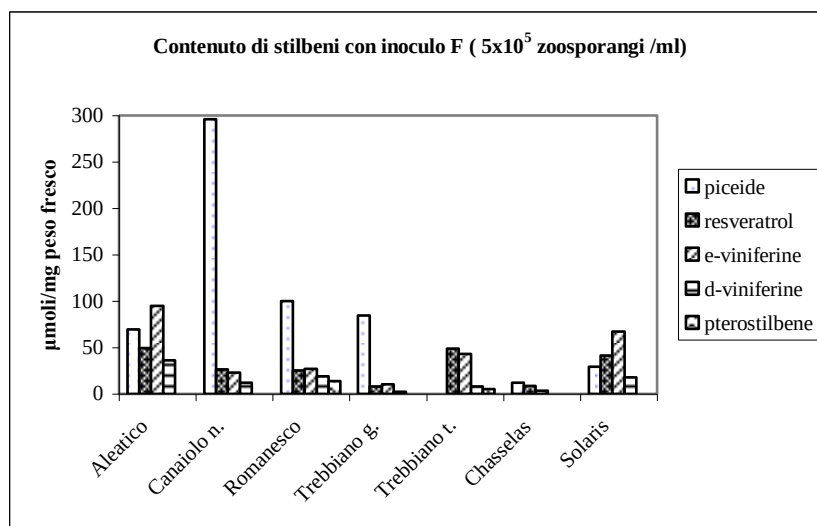


Figura 19: contenuto a 72 hpi delle diverse viniferine in micromoli/mg di peso fresco di tessuto fogliare nei vitigni con inoculo F (5×10^5 zoosporangi/ml). I risultati sono espressi come media delle tre ripetizioni.

Discussione

Osservazioni effettuate da ampelografi del XIX e XX secolo nell'areale del Centro Italia avevano evidenziato differenze di suscettibilità a *P. viticola* tra alcuni dei vitigni che sono stati impiegati in questo studio (AA.VV., 1885; Vannuccini, 1892; Molon, 1906; Marzotto, 1925; Prosperi, 1939). Le prove di laboratorio eseguite hanno messo in evidenza differenze particolarmente significative nella severità dei sintomi tra i vitigni, che confermano i dati tendenziali di tolleranza emersi dalle osservazioni effettuate in pieno campo. In particolare nelle prove su foglia staccata livelli apprezzabili di tolleranza sono stati evidenziati per le varietà Trebbiano giallo e Romanesco, mentre le due varietà a bacca nera Aleatico e Canaiolo nero si sono dimostrate molto suscettibili alla malattia. Il confronto tra i risultati ottenuti nelle due diverse modalità di infezione utilizzate, foglie intere e dischi, ha permesso di evidenziare il ruolo importante svolto dalla tecnica di inoculazione sulla efficacia della infezione, soprattutto in presenza di tessuti molto tomentosi. Nelle prove su dischi fogliari le varietà Romanesco e Canaiolo nero, caratterizzate da una elevata presenza di tomento nella pagina inferiore del lembo, hanno evidenziato il minore sviluppo della malattia. In queste condizioni si è confermato che la deposizione di gocce di inoculo su una superficie molto ricca di peli striscianti diminuisce la bagnabilità sfavorendo il contatto della soluzione inoculante con l'epidermide e quindi ostacolando lo spostamento delle zoospore verso le aperture stomatiche (Kortekamp *et al.*, 1999; Kortekamp e Zyprian, 1999).

In ogni caso si è comunque evidenziato uno scarto nei livelli di severità della malattia tra i test di laboratorio e le osservazioni di campo: questa differenza può essere attribuita alla diversa influenza dei fattori ambientali sullo sviluppo della infezione, che nelle prove di laboratorio rimangono costantemente favorevoli allo sviluppo del patogeno. In ambiente mediterraneo invece si è spesso in presenza di bassa pressione del patogeno e condizioni ambientali meno favorevoli alla sua diffusione. A possibile conferma di ciò, nelle prove di infezione eseguite con bassa concentrazione di inoculo, si sono sempre registrati in tutti i vitigni, compresi i controlli (resistente e suscettibile) bassi livelli di gravità dei sintomi e minore sviluppo del patogeno nei tessuti.

Nelle prove eseguite gli inoculi meno concentrati si sono dimostrati meno discriminanti per la valutazione della tolleranza dei singoli vitigni. Di conseguenza la scelta della densità di inoculo diviene un fattore chiave nella esecuzione di test di resistenza, differentemente da quanto affermato precedentemente (Brown *et al.*, 1999). Questa considerazione nelle nostre prove trova supporto anche nei dati ottenuti dalle osservazioni condotte per mezzo della microscopia a fluorescenza, che hanno messo in evidenza significative differenze tra infezioni eseguite con inoculo poco concentrato e più concentrato, confermando peraltro risultati precedenti ottenuti sempre su vite (Lalancette *et al.*, 1987; Alonso-Villaverde *et al.*, 2011).

Sempre le osservazioni condotte con microscopia a fluorescenza hanno confermato la sostanziale minore suscettibilità di Trebbiano giallo a *P. viticola* rispetto agli altri vitigni in prova, che si esplica nella fase iniziale del processo infettivo. In particolare è risultata molto bassa la percentuale di stomi infetti nelle prove con inoculo più alto, del tutto simile a quella registrata per le prove con inoculo basso. Impiegando inoculo alto, le marcate differenze evidenziate nella percentuale di stomi infetti potrebbero essere attribuite, almeno in parte, alla diversa densità stomatica tra i vitigni, che ha i valori minori proprio in Trebbiano giallo. I risultati ottenuti fanno supporre una correlazione positiva tra la percentuale di stomi infetti e la densità stomatica, almeno nelle varietà di *V. vinifera* saggiate, diversamente da quanto rilevato sempre in *V. vinifera* (Boso *et al.*, 2010). Questa correlazione non si verifica nella varietà ibrida Solaris, nella quale la densità stomatica molto elevata non è accompagnata da un incremento della percentuale di stomi infettati.

Sempre riguardo alle prove di fluorescenza, osservando lo sviluppo del patogeno a 24 e 48 hpi, è stata registrata una velocità di sviluppo minore in Trebbiano giallo. Tuttavia a 72 hpi, nella stessa varietà, la diffusione del micelio è stata pressoché uguale a quella delle varietà più suscettibili. Tale dato potrebbe essere imputato ad una competizione trofica tra i diversi organismi penetrati nella stessa apertura stomatica, considerando che per ciascuno stoma, nel caso di Trebbiano

giallo, sono state osservate mediamente circa 5 zoospore. La presenza di un numero elevato di zoospore penetrate per ciascuno stoma infettato non trova giustificazione solo nella più bassa densità stomatica trovata in questa varietà, considerando che anche nelle prove con alta densità di inoculo si è rilevata una bassa percentuale di stomi infetti, ma potrebbe essere legata anche al fenomeno già noto dell'adelfotattismo (Langcake e Lovell, 1980; Lalancette *et al.*, 1987; Thomas e Peterson, 1990). Come detto lo sviluppo del patogeno in Trebbiano giallo non ha poi trovato ostacoli e a 72 hpi la colonizzazione dei tessuti è stata elevata e del tutto simile a quella evidenziata dalle osservazioni nei vitigni più suscettibili. Nella varietà resistente Solaris, gli stadi di sviluppo del patogeno nelle fasi iniziali non sono risultati molto diversi rispetto ai vitigni suscettibili, però a 72 hpi lo sviluppo dell'oomicete è stato molto limitato. Questa osservazione conferma che i meccanismi di resistenza di Solaris si basano soprattutto sulla produzione e sull'accumulo di viniferine di natura stilbenica che si verifica soprattutto a 72 hpi (Godard, 2009; Alonso-Villaverde, 2011). In Trebbiano giallo invece l'elevata diffusione del patogeno a 72 hpi è giustificata dai bassi livelli di viniferine rilevati in questa varietà. Dunque in Trebbiano giallo la minore suscettibilità registrata lascia supporre meccanismi di difesa basati sulla limitazione della infezione da parte delle zoospore del patogeno. In effetti è stata dimostrata in altri studi la presenza di fattori, di natura non ancora chiarita, che dipendono dall'apertura stomatica e che favoriscono il movimento delle zoospore verso lo stoma (Kiefer *et al.*, 2002). In Trebbiano giallo la bassa percentuale di stomi infettati nelle inoculazioni anche con alte densità di zoosporangi per ml, potrebbe dipendere dalle caratteristiche degli stomi e/o della loro distribuzione sulla superficie fogliare, anche considerando il basso numero di zoospore penetrate per unità di superficie fogliare rilevato nella varietà.

CAPITOLO V

Valutazione della tolleranza dei vitigni a *Erysiphe necator*

Materiali e metodi

I vitigni scelti per le prove sono stati gli stessi impiegati nelle prove di tolleranza a *P. viticola*. Come varietà di controllo sono stati impiegati Solaris (tollerante) e Chasselas (suscettibile).

A) Osservazioni eseguite in pieno campo

La valutazione della tolleranza in pieno campo ad oidio delle cinque varietà scelte per le prove è stata effettuata durante il triennio 2009-2011. Durante ciascuna stagione vegetativa i rilievi sono stati effettuati nella seconda decade di luglio e nella prima di agosto, epoche in cui normalmente la diffusione della malattia raggiunge il suo massimo. I rilievi hanno interessato sia le strutture vegetative che i grappoli. Per quanto riguarda la vegetazione è stata valutata la resistenza utilizzando la scala di valutazione prevista dal descrittore OIV n°455 (OIV, 2009) che prevede l'attribuzione di un punteggio da 1 (molto suscettibile) a 9 (resistente) per ciascuna delle cinque piante di ogni vitigno. I rilievi sono stati condotti sulle pareti est e ovest della chioma. Sui grappoli, invece, è stata determinata l'incidenza della malattia (percentuale dei grappoli con sintomi visibili sul totale dei grappoli di ciascuna pianta) e la severità (percentuale della superficie dei grappoli colpita sul totale per ciascuna pianta).

I dati ottenuti sono stati sottoposti all'analisi della varianza (ANOVA) e sono espressi come media dei tre anni.

B) Prove di inoculazione in ambiente controllato su dischi fogliari

L'inoculo utilizzato per le prove è stato ottenuto da foglie infette di piante non trattate ed allevate in vaso delle cultivar di *V. vinifera* Malvasia bianca lunga e Cardinal, sensibili al patogeno. Foglie espanse del 5° e 6° nodo apicale sono state poi prelevate da piante allevate in ambiente protetto delle cinque cultivar. Le foglie sono state disinfettate con una soluzione acquosa di ipoclorito di sodio al 2,5 % e risciacquate con acqua sterile per tre volte consecutive. Le infezioni sono state realizzate su dischi fogliari di 16 mm di diametro, ottenuti con un foratappi: per ogni vitigno sono stati prelevati 6 dischi, posizionati con la superficie abassiale poggianti su di un substrato agarizzato contenente 30 mg/l di benzimidazolo (Cartolaro *et al.*, 1990), facendo cadere le spore del patogeno dalle foglie infette, con l'ausilio di una piccola pompa da laboratorio. I dischi, chiusi nelle piastre petri, sono stati poi mantenuti a 24 °C ± 2 con fotoperiodo di 12 ore. La tolleranza è stata valutata 10 giorni dopo l'inoculazione osservando al microscopio ottico (25X) la densità e diffusione del micelio secondo una scala da 1 (assenza di infezione) a 9 (più del 60% delle superficie interessata dal micelio) utilizzata da Staud (1997) in

accordo con lo schema di Stein (1985). L'esperimento è stato ripetuto tre volte. Come controllo sono stati osservati dischi fogliari non inoculati, ma trattati secondo le procedure descritte. I dati sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA).

C) Studio dello sviluppo del patogeno mediante microscopia ottica a fluorescenza

Lo sviluppo del patogeno è stato valutato osservando dischi infettati dei cinque vitigni ai quali sono state aggiunte le varietà Chasselas e Solaris, rispettivamente molto suscettibile e tollerante ad oidio. Le infezioni sono state condotte secondo le modalità descritte in precedenza. A 48 ore dopo l'inoculazione (hpi), i dischi fogliari sono stati colorati con dietanolo secondo il protocollo di Leinhos *et al* (1997) ed osservati al microscopio a fluorescenza Leica DLMB (filtro A-UV Leitz, eccitazione a 340 nm, emissione a 380 nm, filtro di stop LP 430 nm) sul quale è stata montata una fotocamera digitale (Leica DC100); le immagini sono state poi acquisite e trattate per mezzo del software Leica IM500. Per mezzo delle osservazioni sono stati registrati i diversi stadi di sviluppo del patogeno sulla superficie adassiale e sono state calcolate:

- la percentuale di germinazione: numero di conidi germinati (con tubetto germinativo > 1/3 della lunghezza del conidio) in rapporto al numero totale dei conidi osservati;
- la percentuale di conidi che hanno formato un appressorio funzionale (misura indiretta che suppone la funzionalità dell'austorio nella cellula infettata in seguito alla formazione di un'ifa primaria);
- la percentuale di conidi che hanno formato un'ifa secondaria.

Le osservazioni sono state ripetute su tre differenti dischi osservando in totale almeno 250 conidi. Le percentuali sono state trasformate in arcoseno per effettuare l'analisi della varianza (ANOVA).

Risultati

A) Resistenza alla malattia in pieno campo

Le osservazioni in pieno campo hanno evidenziato una significativa differenza nella tolleranza al patogeno tra le varietà in studio. Per quanto riguarda i livelli di tolleranza determinati in base all'indice OIV (sintomi rilevati sulla vegetazione), i vitigni a bacca bianca hanno dimostrato una minore suscettibilità rispetto ai due vitigni a bacca nera, confermando le osservazioni fatte da ampelografi del passato. In particolare Trebbiano giallo e Romanesco hanno evidenziato livelli di tolleranza ad oidio significativamente maggiori rispetto ad Aleatico e Canaiolo nero (Figura 20).

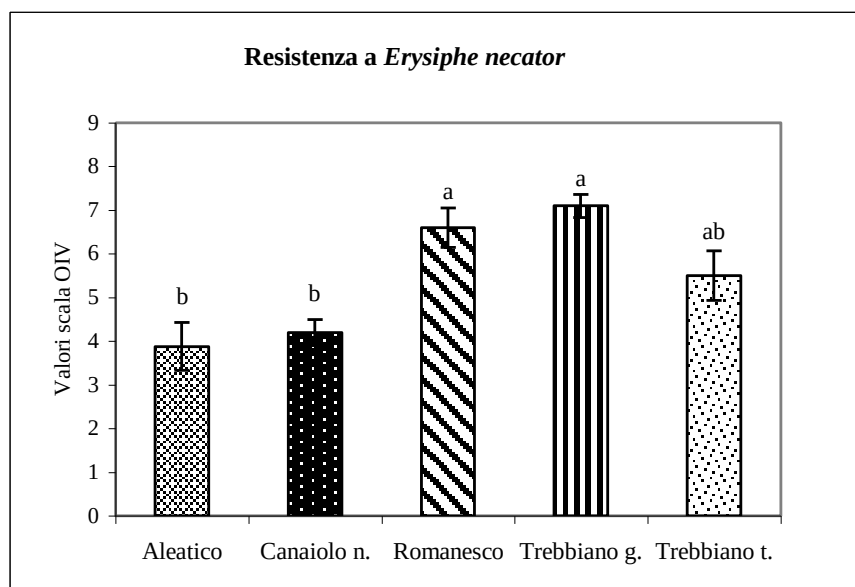


Figura 20: grado di resistenza a E. necator in pieno campo, secondo i valori del descrittore OIV n° 455. I risultati sono espressi come media delle osservazioni del triennio 2009-2011; la barra indica l'errore standard. Lettere uguali indicano differenze non significative secondo il test di Tukey ($p < 0.05$)

I rilievi sui grappoli, invece, hanno messo in luce minori differenze tra le varietà studiate. L'incidenza e la severità della malattia sui grappoli non hanno mostrato differenze significative tra i vitigni (Figure 21 e 22), anche se è opportuno rilevare che i grappoli più colpiti sono risultati quelli di Aleatico, risultato già il più sensibile nella incidenza di danni fogliari.

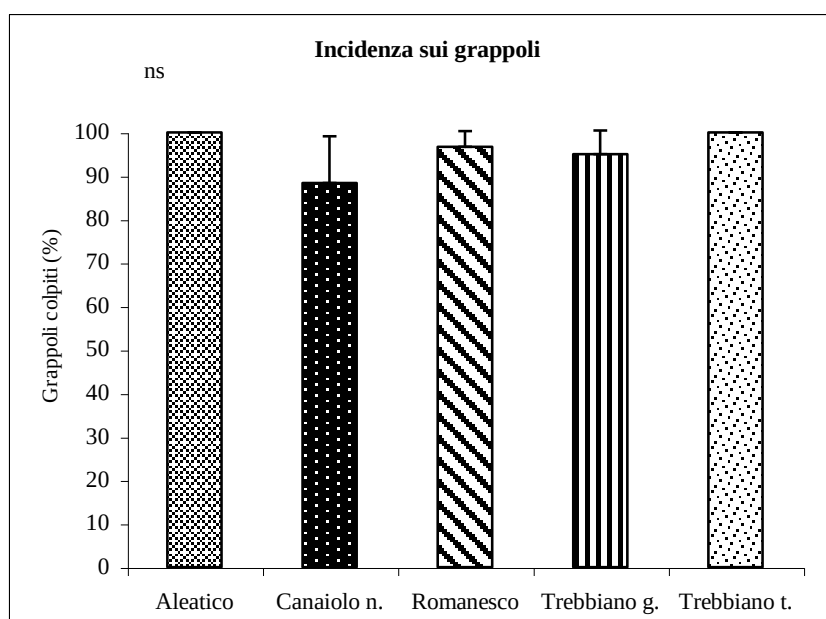


Figura 21: incidenza dei sintomi della malattia in pieno campo sui grappoli dei cinque vitigni. I risultati sono espressi come media delle osservazioni del triennio 2009-2011, le barre rappresentano l'errore standard; ns = differenze non significative secondo il test di Tukey ($p < 0.05$)

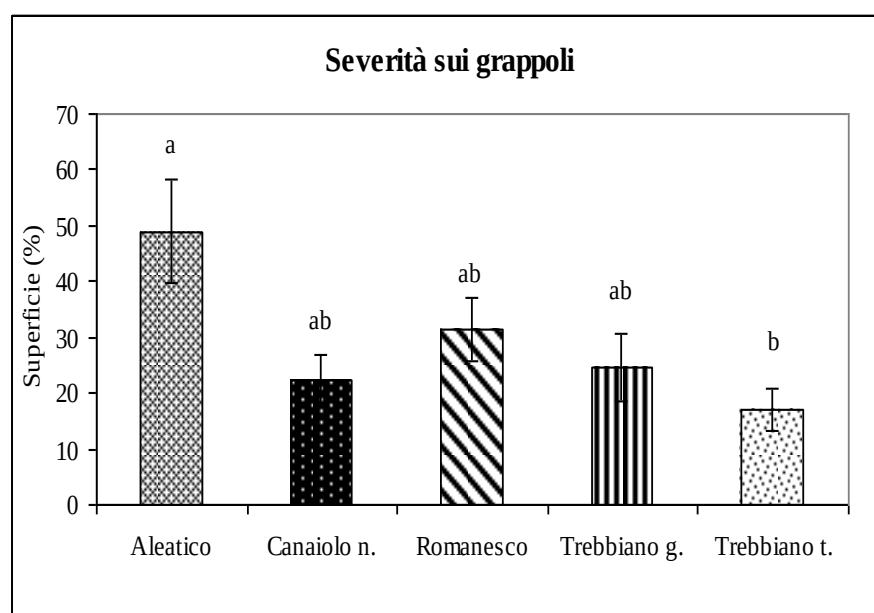


Figura 22: severità dei sintomi della malattia in pieno campo sui grappoli dei cinque vitigni, valutata come percentuale di superficie dei grappoli colpita. I risultati sono espressi come media delle osservazioni del triennio 2009-2011, le barre rappresentano l'errore standard. Lettere uguali indicano differenze non significative secondo il test di Tukey ($p < 0.05$).

B) Livelli di tolleranza in ambiente controllato su dischi fogliari

Le differenze riscontrate tra i vitigni nelle prove effettuate su dischi fogliari sono risultate significative ($p < 0,001$). Anche in questo caso Romanesco e Trebbiano giallo sono risultati i vitigni meno suscettibili così come la maggiore suscettibilità è stata riscontrata in Aleatico e Canaiolo nero, confermando quanto osservato già in pieno campo. Tuttavia Trebbiano Toscano, che aveva dimostrato in campo un livello medio di tolleranza, ha evidenziato in questa prova un elevato grado di suscettibilità alla malattia, simile a quella dei due vitigni a bacca nera (Figura 23). Sui dischi di controllo non è stato osservato nessuno sviluppo miceliare.

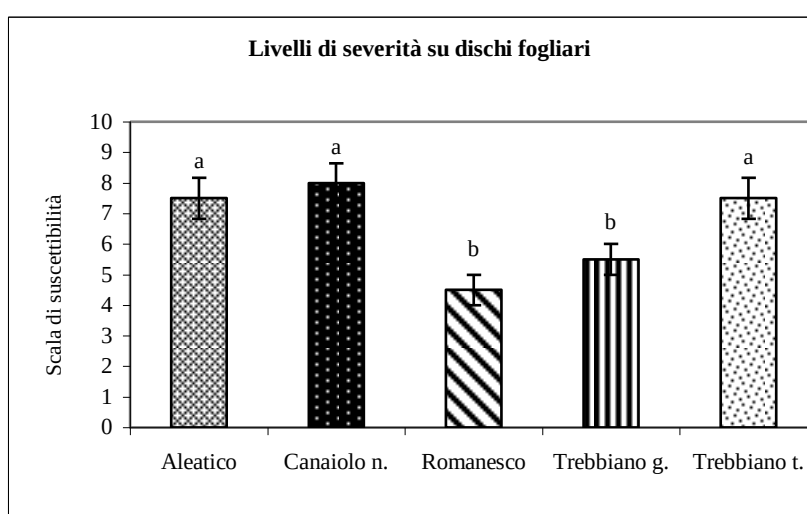


Figura 23: livelli di severità sui dischi fogliari secondo la scala di valutazione di Staud (1997). I risultati sono espressi come media di 6 dischi, per tre ripetizioni; le barre rappresentano l'errore standard. Lettere uguali indicano differenze non significative secondo il test di Tukey ($p < 0,05$).

C) Sviluppo del patogeno sui tessuti fogliari

Le osservazioni condotte mediante microscopia a fluorescenza hanno evidenziato differenze significative tra i vitigni studiati particolarmente nella prima fase del processo infettivo. La percentuale di germinazione è risultata significativamente differente tra i vitigni ($p < 0,05$). In particolare le varietà Romanesco e Trebbiano giallo hanno registrato la percentuale più bassa di conidi germinati rispetto a tutte le altre varietà (Figura 24), mentre Chasselas ha confermato la suscettibilità registrata in precedenti prove (Pavloušek, 2007).

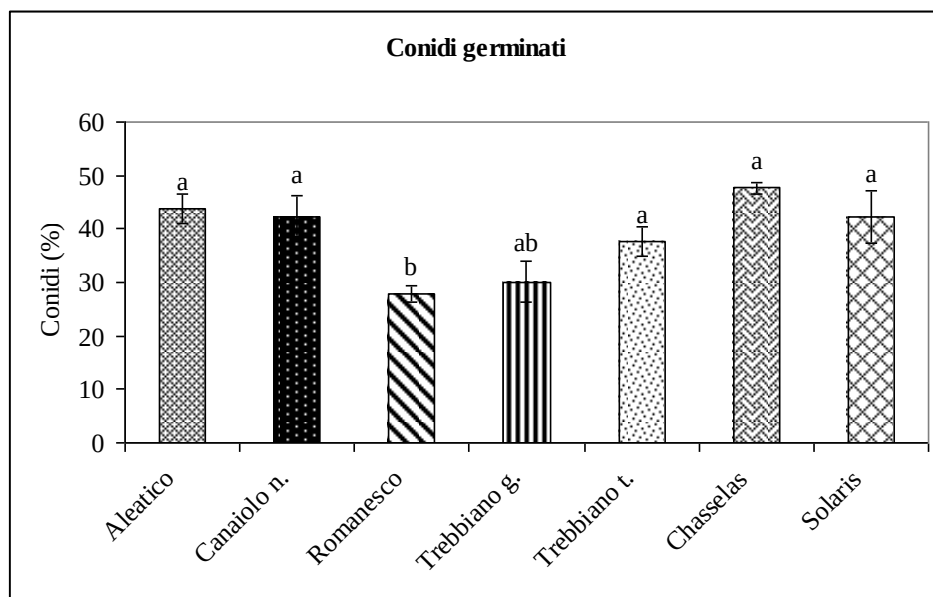


Figura 24: percentuale di germinazione dei conidi su tessuti fogliari inoculati. I risultati sono espressi come media di tre dischi e su almeno 250 conidi osservati; le barre rappresentano l'errore standard. Lettere uguali indicano differenze non significative secondo il test di Tukey ($p < 0.05$).

La percentuale di conidi che hanno formato un appressorio funzionale, parametro in grado di esprimere il successo dell'infezione e la velocità di sviluppo del patogeno, non è risultata molto differente tra le varietà. Tuttavia i vitigni che al rilievo a 48 hpi hanno evidenziato la percentuale minore di conidi con un'ifa primaria sviluppata sono stati Trebbiano giallo, Romanesco e la varietà di controllo tollerante Solaris. In Chasselas, vitigno di controllo suscettibile, si è osservata la percentuale più elevata (Figura 25).

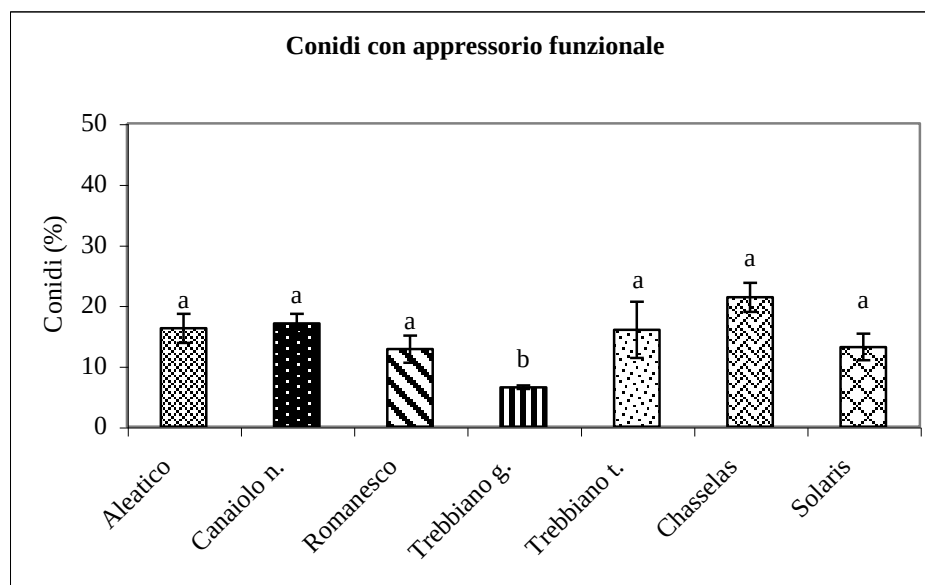


Figura 25: percentuale di conidi che hanno formato un appressorio funzionale a 48 hpi su tessuti fogliari inoculati. I risultati sono espressi come media di tre dischi e su almeno 250 conidi osservati; le barre rappresentano l'errore standard. Lettere uguali indicano differenze non significative secondo il test di Tukey ($p < 0.05$).

La percentuale di conidi in grado di sviluppare un'ifa secondaria non ha mostrato differenze statisticamente significative tra le varietà: come valore assoluto riscontrato tuttavia anche questo parametro è risultato maggiore nelle varietà Chasselas ed Aleatico e minore in Trebbiano giallo (Figura 26).

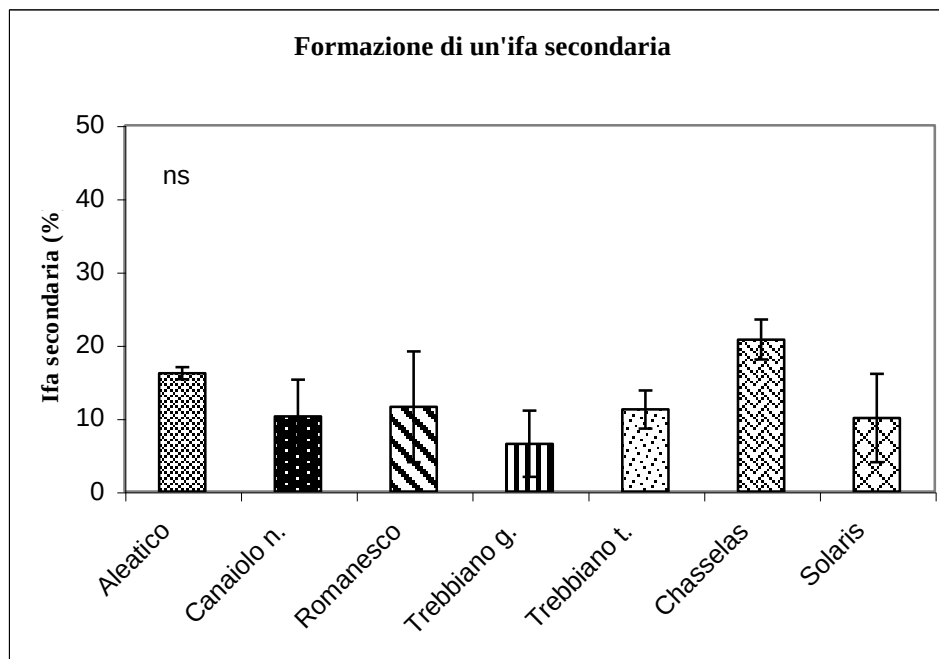


Figura 26: percentuale di formazione di un'ifa secondaria a 48 hpi sui tessuti fogliari nei cinque vitigni. I risultati sono espressi come media di tre dischi e su almeno 250 conidi osservati; le barre rappresentano l'errore standard; ns = differenze non significative secondo il test di Tukey ($p < 0.05$)

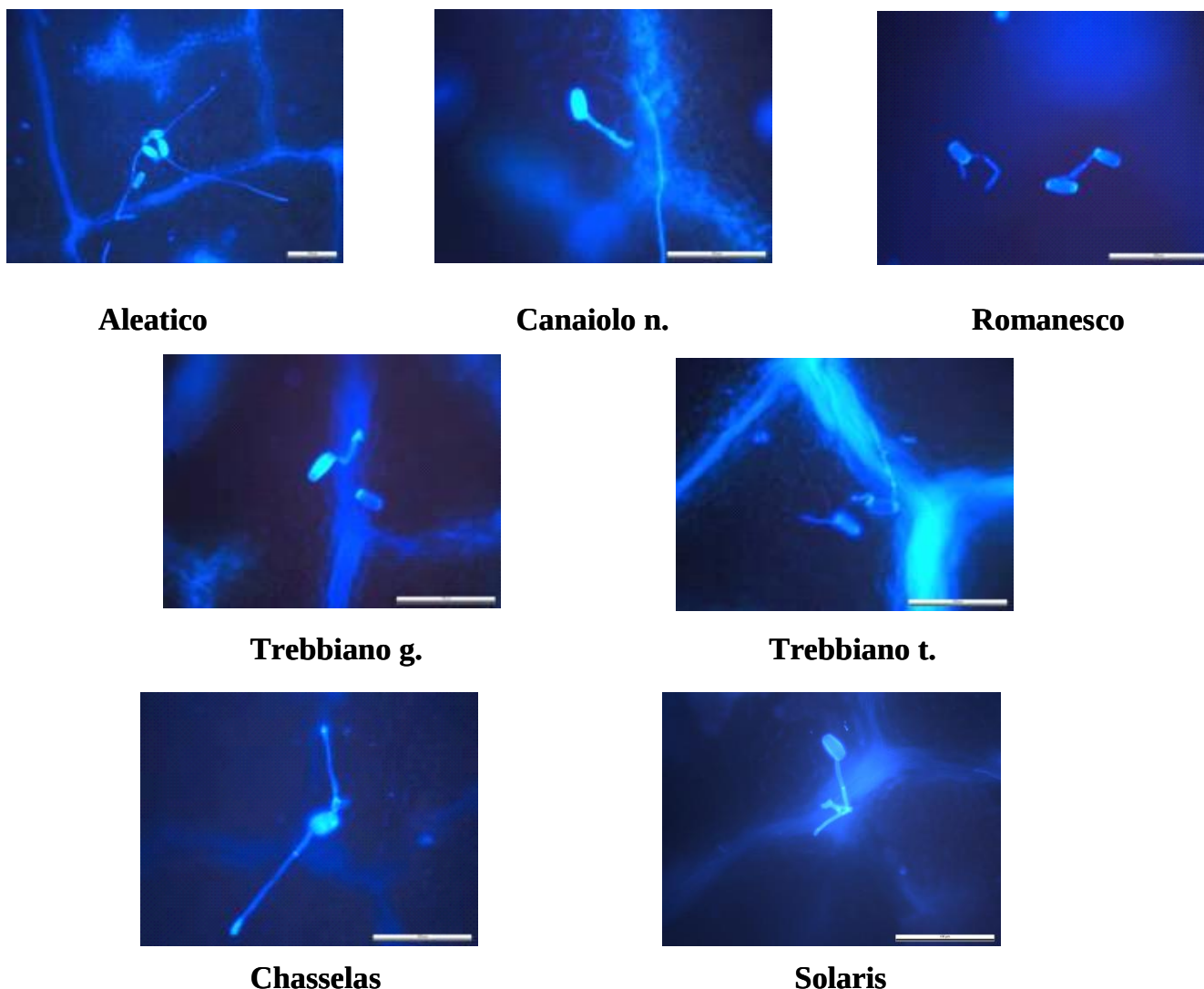


Figura 27: immagini alla microscopia a fluorescenza del tessuto fogliare dei vitigni a 48 hpi, che evidenziano soprattutto in Trebbiano giallo una minore velocità di sviluppo del patogeno nelle prime fasi.

Discussione

Lo studio della tolleranza in campo e le prove di inoculazione in laboratorio hanno evidenziato differenze significative tra i vitigni in prova. Le varietà Trebbiano giallo e Romanesco, entrambe a bacca bianca, sia nelle osservazioni di campo che nelle infezioni condotte in ambiente controllato su dischi fogliari hanno evidenziato una maggiore tolleranza rispetto a tutti gli altri vitigni studiati. Trebbiano toscano, altra varietà a bacca bianca inserita nelle prove, ha evidenziato livelli di tolleranza sicuramente inferiori a Trebbiano giallo e Romanesco ma comunque superiori alle due varietà a bacca nera Aleatico e Canaiolo nero, che si sono dimostrate molto suscettibili al patogeno. All'interno di ogni singola varietà il livello di

suscettibilità della vegetazione non è però risultato sempre corrispondente a quello dei grappoli. Nel caso di Canaiolo nero, infatti, alla bassa severità rilevata sui grappoli corrisponde un elevato livello di suscettibilità della vegetazione. Questo dato sembra contrastare con l'alto livello di correlazione riscontrato in altri vitigni tra suscettibilità sulle foglie e sui grappoli di precedenti lavori (Doster e Schnathorst, 1985; Pavloušek, 2007).

Tali risultati confermano, in generale, precedenti osservazioni degli ampelografi che avevano descritto queste varietà già nei due secoli precedenti e che a più riprese avevano osservato una differente risposta delle varietà di *V. vinifera* alle ricorrenti infezioni di oidio (AA.VV., 1885; Vannuccini, 1892; Molon, 1906; Marzotto, 1925; Prosperi, 1939).

I dati ottenuti sui dischi in ambiente controllato mostrano di nuovo la minore suscettibilità di Trebbiano giallo e Romanesco, anche se hanno messo in luce una maggiore severità della malattia in tutte le varietà studiate rispetto a quanto osservato in pieno campo. Tale risultato evidenzia da un lato la complessità dei fattori che in pieno campo possono influire sul successo dell'infezione da parte del patogeno e sulla gravità dei sintomi sulle piante ospiti, dall'altro la necessità di affiancare ai test di laboratorio prove in pien'aria per gli screening selettivi, sia su germoplasma viticolo tradizionale che su sementali provenienti da ibridazione.

Le osservazioni per mezzo della microscopia a fluorescenza hanno messo in evidenza che il maggiore grado di tolleranza mostrato da Trebbiano giallo e Romanesco si manifesta nelle prime fasi infettive. I risultati ottenuti hanno mostrato differenze significative tra varietà tolleranti e suscettibili nella percentuale di germinazione dei conidi sulla superficie fogliare ma anche negli stadi successivi di infezione, pur senza differenze significative tra i vitigni, è emersa una tendenziale minore capacità del patogeno di produrre un austorio funzionale nelle varietà più tolleranti. Successivamente lo sviluppo dell'oidio sulla superficie fogliare è stato simile in tutte le varietà come confermano le non significative differenze nelle percentuali di formazione dell'ifa secondaria. Queste osservazioni fanno supporre che la maggiore tolleranza dei due vitigni si espliciti soprattutto nella fase di adesione e germinazione dei conidi come dimostrato nel caso di infezioni di *Botrytis cinerea* su bacche di Pinot noir (Comménil *et al.* 1996), anche se nel caso di oidio si rendono necessarie ulteriori indagini per comprendere meglio la natura di tali meccanismi. Finora non sono state dimostrate correlazioni evidenti tra le caratteristiche morfo-anatomiche delle foglie di vite e la tolleranza ad *E. necator* (Gaforio *et al.*, 2011) ed in particolare, se le difese nei confronti di questo patogeno, nelle varietà di *V. vinifera*, siano di tipo costitutivo od indotto.

CONCLUSIONI

La scelta del vitigno o del clone al momento dell'impianto riveste un ruolo fondamentale, considerato che il genotipo scelto deve possedere contemporaneamente elevate caratteristiche qualitative ed agronomiche. L'introduzione piuttosto recente, se paragonata alla tradizione vitivinicola del nostro Paese, di vitigni internazionali, ha ridotto il panorama varietale di molti ambienti viticoli e nel contempo ha reso più difficile la difesa dai patogeni anche a causa dell'uniformità genetica delle coltivazioni. Per questo motivo si è da tempo data priorità al recupero, alla caratterizzazione, alla selezione ed alla valorizzazione di vitigni autoctoni o coltivati da lungo tempo in areali viticoli ristretti. La conoscenza del loro grado di tolleranza ai principali patogeni della vite, può favorire sia i piani di selezione che scelte più mirate da parte dei viticoltori: in fase di impianto, la possibilità di scegliere tra i vitigni più legati al territorio ed alla tradizione, quelli che meglio si adattano alle condizioni pedoclimatiche e che meno subiscono danni da parte dei patogeni, può aiutare gli operatori vitivinicoli a ridurre sia i costi di produzione che l'impatto ambientale delle tecniche produttive.

Lo studio eseguito ha confermato l'esistenza di differenti gradi di tolleranza a *P. viticola* ed *E. necator*, due delle più diffuse e pericolose malattie, in varietà di *V. vinifera*. Tra le varietà studiate Trebbiano giallo e Romanesco sono risultate le più tolleranti sia a peronospora che oidio ed in entrambi i vitigni lo studio dei tessuti fogliari inoculati ha mostrato una minore efficienza infettiva dei due patogeni. Tali osservazioni fanno dunque supporre l'esistenza di meccanismi di difesa, di cui va approfondita la natura, che interferiscono con le fasi di sviluppo iniziali di entrambi i patogeni.

Si evidenzia infine che tra le varietà studiate le due risultate più tolleranti, sono quelle con una diffusione locale, legata prevalentemente al Lazio ed in particolare alla Tuscia Viterbese, fin da tempi lontani e sono considerate autoctone. Ciò conferma la necessità di approfondire la conoscenza delle caratteristiche agronomiche, ampelografiche ed anche di suscettibilità agli stress di varia natura particolarmente nei vitigni minori o autoctoni, anche esplorando la variabilità intravarietale.

BIBLIOGRAFIA

- AA.VV. Bullettino ampelografico, 1885, fascicolo XX. Scheda ampelografica “Tribbiano Toscano o Trebbiano fiorentino”.
- Acerbi G., 1825. Delle viti italiane. O sia materiali per servire alla classificazione , monografia e sinonimia preceduti dal tentativo di una classificazione geponica delle viti di Giuseppe Acerbi di Castelfreddo, direttore della Biblioteca Italiana, con diverse tavole. Milano.
- Adrian M., Jeandet P., Veneau J., Weston L.A., Bessis R., 1997. Biological activity of resveratrol, a stilbenic compound from grapevines, against *Botrytis cinerea*, the causal agent for gray mold. Journal of Chemical Ecology, 23, 1689-1702.
- Aggarwal B.B., Bhardwaj A., Aggarwal R.S., Seeram N.P., Shishodia S., Takada Y., 2004. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. Anticancer Research 24, 2783-2840.
- Aggarwal B., Shishodia S., 2006. Resveratrol in health and disease. CRC Press Taylor & Francis, Boca Raton FL, USA.
- Allègre M., Daire X., Héloir M.C., Trouvelot S., Mercier L., Adrian M., Pugin A., 2007. Stomatal deregulation in *Plasmopara viticola*-infected grapevine leaves. New Phytologist 173, 832-840.
- Alonso-Villaverde V., Voinesco F., Viret O., Spring J.-L., Gindro K., 2011. The effectiveness of stilbenes in resistant *Vitaceae*: Ultrastructural and biochemical events during *Plasmopara viticola* infection process. Plant Physiology and Biochemistry 49, 265-274.
- Alonso-Villaverde V., Viret O., Gindro K., 2011. Downy mildew : is resistance linked to inoculum concentration? Vitis 50, 127-129.
- Austin C.N., Wilcox W.F., 2011. Effects of fruit-zone leaf removal, training system, and variable irrigation on powdery mildew development on *Vitis vinifera* L. Chardonnay. American Journal of Enology and Viticulture 62, 193-198.
- Austin C.N., Meijers J., Grove J.J., Wilcox W.F., 2011. Quantification of powdery mildew severity as a function of canopy variability and associated impacts on sunlight penetration and spray coverage within the fruit zone. American Journal of Enology and Viticulture, 62, 23-31.
- Baldacci E., 1947. Epifitie di *Plasmopara viticola* (1941-46) nell'Oltrepò Pavese ed adozione del calendario di incubazione come strumento di lotta. Atti Istituto Botanico, Laboratorio Crittogamico 8, 45-85.
- Bavaresco L., Petegolli D., Cantù E., Fregoni M., Chiusa G., Trevisan M., 1997. Elicitation and accumulation of stilbene phytoalexins in grapevine berries infected by *Botrytis cinerea*. Vitis 36, 77-83.

- Bavaresco L., Fregoni C., 2001. Physiological role and molecular aspects of grapevine stilbenic compounds. In: K.A. Roubelakis-Angelakis (ed) Molecular Biology and Biotechnology of the Grapevine, Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, Netherlands, 153-182.
- Bavaresco L., 2003. Role of viticultural factors on stilbene concentration of grape and wine. *Drugs Under Experimental Clinical Research* 29, 181-187.
- Bavaresco L., Vezzulli S., Civardi S., Gatti M., Battimani P., Pietri A., Ferrari F., 2008. Effect of lime-induced leaf chlorosis on ochratoxin A, trans-resveratrol, and ϵ -viniferin production in grapevine (*Vitis vinifera* L.) berries infected by *Aspergillus carbonarius*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 2085-2089.
- Bavaresco L., Fregoni C., van Zeller de Macero Basto Gonçalves M.I., Pezzulli S., Physiology and molecular biology of grapevine stilbenes: an update, 2009. In: Roubelakis-Angelakis K.A. (ed.) Grapevine Molecular Physiology and Biotechnolgy, 2nd ed., Springer Science+Business Media B.V., 341-364.
- Batovska D.I., Todorova I.T., Nedelcheva D.V., Parushev S.P., Atanasov A.I., Hvarleva T.D., Djakova G.J., Bankova V.S., Popov S.S., 2008. Preliminary study on biomarkers for the fungal resistance in *Vitis vinifera* leaves. *Journal of Plant Physiology* 165, 791-795.
- Belhadj A., Saigne C., Telef N., Cluzet S., Bouscaut J., Corio-Costet M.F., et al. 2006. Methyl jasmonate induces defense reponses in grapevine and triggers protection against *Erysiphe necator*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9119-9125.
- Boso S., Santiago J.L., Martínez M.C., 2004. Resistance of eight different clones of the grape cultivar Albariño to *Plasmopara viticola*. *Plant Disease* 88, 741-744.
- Boso S., Santiago J.L., Martínez M.C., 2005. A method to evaluate downy mildew resistance in grapevine. *Agronomy and Sustainable Development* 25, 163-165.
- Boso S., Martínez M. C., Unger S., Kassemeyer H. H., 2006. Evaluation of foliar resistance to downy mildew in different cv. Albariño clones. *Vitis* 45, 23-27.
- Boso S., Kassemeyer H.-H., 2008. Different susceptibility of European grapevine cultivars for downy mildew. *Vitis* 47, 39-49.
- Boso S., Alonso-Villaverde V., Santiago J.L., Gago P., Dürrenberger M., Düggelin M., Kassemeyer H.H., Martinez M.C., 2010. Macro- and microscopic leaf characteristics of six grapevine genotypes (*Vitis* spp) with different susceptibilities to grapevine downy mildew. *Vitis* 49, 43-50.
- Boso S., Alonso-Villaverde V., Gago P., Santiago J.L., Martínez M.C., 2011. Susceptibility of 44 grapevine (*Vitis vinifera* L.) varieties to downy mildew in the field. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 17, 394-400.

- Boubals D., 1961. Etude de causes de la résistance des Vitacées à l'oïdium de la Vigne (*Uncinula necator* (Schwein) Burr.) et leur mode de transmission héréditaire. Annales Amélioration des Plantes 11, 401-500.
- Brems S., Rast D. M., Ruffner H. P., 1986. Partitioning of photosynthetate in leaves of *Vitis vinifera* infected with *Uncinula necator* and *Plasmopara viticola*. Plant Pathology 29, 285-291.
- Breviglieri N., Casini E., 1964. Canaiolo nero. In: Catalogo nazionale delle varietà di vite. Ministero dell'Agricoltura e delle Foreste. Arti Grafiche, Conegliano.
- Brewer C.A., Smith W.K., Vogelmann T.C., 1991. Functional interaction between leaf trichomes, leaf wettability and optical properties of water droplets. Plant Cell and Environment 14, 995-962.
- Brown M.V., Moore J.N., Fenn P., McNew R.W., 1999. Comparison of leaf, disk, greenhouse and field screening procedures for evaluation of grape seedlings for downy mildew resistance. HortScience 34, 331-333.
- Brun J.-P., 2007. Le tecniche di spremitura dell'uva : origini e sviluppo dell'uso del torchio nel mediterraneo Occidentale, in Archeologia della vite e del vino in Etruria, a cura di Ciacci A., Rendini P., Zifferero A.. Ci.Vin., Siena, 55-67.
- Cadle-Davidson L., Wakefield L., Seeem R.C., Gadoury D.M., 2010. Specific isolation of RNA from the grape powdery mildew pathogen *Erysiphe necator*, an epiphytic, obligate parasite. Journal of Phytopathology 158, 69-71.
- Cadle-Davidson L., Chicoine D.R., Consolie N.H., 2010. Variation within and between *Vitis* species for foliar resistance to the powdery mildew pathogen *Erysiphe necator*. Plant Disease 95, 202-211.
- Cadle-Davidson L., Mahanil S., Gadoury D.M., Kozma P., Reisch B.I., 2011. Natural infection of *Run1*-positive vines by naïve genotypes of *Erysiphe necator*. Vitis 50, 173-175.
- Caffi T., Rossi V., Bugiani R., Spanna F., Flamini L., Cossu A., Nigro C., 2009. A model predicting primary infections of *Plasmopara viticola* in different grapevine-growing areas of Italy. Journal of Plant Pathology 91, 535-548.
- Calò A., Scienza A., Costacurta A., 2001. Vitigni d'Italia. Edagricole.
- Calonnec A., Cartolaro P., Poupot C., Dubordieu D., Darriet P., 2004. Effects of *Uncinula necator* on the yield and quality of grape (*Vitis vinifera*) and wine. Plant pathology 53, 434-445.
- Cartolaro P., Steva H., 1990. Maîtrise de l'oïdium au laboratoire. Phytoma 419, 37-40.
- Cinelli O., 1884. La cantina sperimentale di Viterbo. Società tipografica (Ed.), Bologna.

- Costantini L., Costantini Biasini L., 1999. La viticoltura dalla Grecia alla Magna Grecia: la documentazione archeobotanica, in “Alle radici della civiltà del vino in Sicilia”, a cura di Failla O. e Forni G. Agrigento, 169-191.
- Dagostin S., Ferrari A., Gessler C., Pertot I., 2006. New alternatives to copper against *Plasmopara viticola* in organic viticulture. Atti Giornate Fitopatologiche 2, 193-198.
- Dagostin S., Formolo T., Giovannini O., Pertot I., Schmitt A., 2010. *Salvia officinalis* extract can protect grapevine against *Plasmopara viticola*. Plant Disease 94, 575-580.
- Dai G.H., Andary C., Mondolot-Cosson L., Boubals D., 1995. Histochemical studies on the interaction between three species of grapevine, *Vitis vinifera*, *V. rupestris* and *V. rotundifolia* and the downy mildew fungus, *Plasmopara viticola*. Physiological and Molecular Plant Pathology 4
- Dalmasso G., “Uve da vino. Vitigni rossi”, REDA, 1946.6, 177-188.
- De' Crescenzi P., 1305. Liber ruralium commodorum. Capitolo “De diversis speciebus vitium” (IV; 4).
- Délye C., Laigret F., Corio-Costet M.F., 1997. RAPD analysis provides insight into the biology and epidemiology of *Uncinula necator*. Phytopathology, 87, 670-677.
- Délye C., Corio-Costet M.F., 1998. Origin of primary infections of grape by *Uncinula necator*: RAPD analysis discriminates two biotypes. Mycological Research, 102, 283-288.
- Dìez-Navajas A.M., Greif C., Poutaraud A., Merdinoglu D., 2007. Two simplified fluorescent staining techniques to observe infection structures of the oomycete *Plasmopara viticola* in grapevine leaf tissues. Micron 38, 680-683.
- Di Rovasenda G., 1877, Saggio di una ampelografia universale.
- Doss R.P., Potter S.W., Chastagner G.A., Christian J.K., 1993. Adhesion of nongerminated *Botrytis cinerea* conidia to several substrata. Applied and Environmental Microbiology 59, 1786-1791.
- Doster M.A., Schnathorst W.C., 1985. Comparative susceptibility of various grapevine cultivars to the powdery mildew fungus *Uncinula necator*. American Journal of Enology and Viticulture 36, 101-104.
- Doster M.A., Schnathorst W.C., 1985. Effects of leaf maturity and cultivar resistance on development of the powdery mildew fungus on grapevines. Phytopathology 75, 318-321.
- Dry I.B., Feechan A., Anderson C., Jermakow A.M., Bouquet A., Anne F., Adam Blondon A.-F., Thomas M.R., 2009. Molecular strategies to enhance the genetic resistance of grapevine to powdery mildew. Australian Journal of Grape and Wine Research 16, 94-105.
- Falk S.P., Gadoury D.M., Pearson R.C., Seem R.C., 1995. Partial control of grape powdery mildew by the mycoparasite *Ampelomyces quisqualis*. Plant disease, 79, 483-490.

- Ficke A., Gadoury D.M., Seem R.C., Dry I.B., 2003. Effects on ontogenetic resistance upon establishment and growth of *Uncinula necator* on grape berries. *Phytopathology* 93, 556-563.
- Ficke A., Gadoury D.M., Seem R.C., Godfrey D., Dry I.B., 2004. Host barriers and responses to *Uncinula necator* in developing grape berries. *Phytopathology* 94, 438-445.
- Flor H.H., 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology* 9, 275-276.
- Forni G., 2007. Quando e come sorse la viticoltura in Italia. In “Archeologia della vite e del vino in Etruria”, a cura di Ciacci A., Rendini P., Zifferero A. Ci.Vin., Siena, 69-81.
- Gadoury D.M., Pearson R.C., 1990. Germination of ascospores and infection of *Vitis* by *Uncinula necator*. *Phytopathology*, 80, 1198-1203.
- Gadoury D.M., Pearson R.C., 1991. Initiation, development, dispersal and survival of cleistotecia of *Uncinula necator* in New York vineyards. *Phytopathology*, 78, 1413-1421.
- Gadoury D.M., Pearson R.C., 1991. Heterothallism and pathogenic specialization in *Uncinula necator*. *Phytopathology*, 81, 1287-1293.
- Gadoury D.M., Seem R. C., Ficke A., Wilcox W. F., 2003. Ontogenic resistance to powdery mildew in grape berries. *Phytopathology* 93, 438-445.
- Gadoury D.M., Seem R. C., Pearson R. C., Wilcox W. F., Dunst R. M., 2001. Effects of powdery mildew on wine growth, yield and quality of Concord grapes. *Plant Disease* 85, 137-140.
- Gadoury D.M., Seem R. C., R. C., Wilcox W. F., Henick-Kling T., Conterno L., Day A., Ficke A., 2007. Effects of diffuse colonization of grape berries by *Uncinula necator* on bunch rots, berry microflora, and juice and wine quality. *Phytopathology* 97, 1356-1365.
- Gadoury D.M., Cadle-Davidson L., Wilcox W.F., Dry I.B., Seem R.C., Milgroom M.G., 2011. Grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*): a fascinating system for the study of the biology, ecology and epidemiology of an obligate biotroph. *Molecular plant pathology* 13, 1-16.
- Gaforio L., Garcia-Munoz S., Cabello F., Munoz-Organero G., 2011. Evaluation of susceptibility to powdery mildew (*Erysiphe necator*) in *Vitis vinifera* varieties. *Vitis* 50, 123-126.
- Gallesio G., 1883. I giornali dei viaggi. In *Atti dell'Accademia dei Georgofili*. Trascrizione, note e commento di Enrico Baldini, Firenze, 1995. Supplemento a “I Georgofili”. Vol. XLII, 478.
- Gatto P., Vrhovsek U., Muth J., Segala C., Romualdi C., Fontana P., Pruefer D., Stefanini M., Moser C., Mattivi F., Velasco R., 2008. Ripening and genotype control stilbene accumulation in Healthy grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 11773-11785.

- Giannakis C., Bucheli C.S., Skene K.G.M., Robinson S.P., Scott N.S., (1998). Chitinase and beta-1,3-glucanase in grapevine leaves: a possible defence against powdery mildew infection. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 4, 14-22.
- Gindro K., Viret O., 2007. Alternatives dans la lutte contre les maladies de la vigne. *Revue suisse de Viticulture, Arboriculture et Horticulture* 39, 278.
- Gindro K., Spring J. L., Pezet R., Richter H., Viret O., 2007. Développement d'outils pour la sélection précoce de cépages résistants au mildiou. *Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture et Horticulture* 38, 133-139.
- Gindro K., Spring J. L., Pezet R., Richter H., Viret O., 2006. Histological and biochemical criteria for objective and early selection of grapevine cultivars resistant to *Plasmopara viticola*. *Vitis* 45, 191-196.
- Gindro K., Pezet R., Viret O., 2003. Histological study of the responses of two *Vitis vinifera* cultivars (resistant and susceptible) to *Plasmopara viticola* infections. *Plant Physiology and Biochemistry* 41, 846-853.
- Godard S., Gindro K., Viret O., 2006. Peroxidase activity and resistant grapevine after inoculation with *Plasmopara viticola*. *Proceedings of the 5th International Workshop on Grapevine Downy and Powdery Mildew, San Michele all'Adige*, 335-367.
- Godard S., Slacanin I., Viret O., Gindro K., 2009. Induction of defence mechanism in grapevine leaves by emodin- and anthraquinone-rich plant extracts and the conferred resistance to downy mildew. *Plant Physiology and Biochemistry* 47, 827-837.
- Harm A., Kassemeyer H.-H., Seibicke T., Regner F., 2011. Evaluation of Chemical and natural resistance inducers against downy mildew (*Plasmopara viticola*) in grapevine. *American Journal of Enology and Viticulture* 62, 184-192.
- Heintz C., Blaich., R., 1989. Structural characters of epidermal walls and resistance to powdery mildew of different grapevine cultivars. *Vitis* 28, 153-160.
- Heintz C., Blaich., R., 1990. Ultrastructural and histochemical studies on interactions between *Vitis vinifera* L. and *Uncinula necator* (Schw.) Burr. *New Phytologist* 115, 107-117.
- Hoffmann S., Di Gaspero G., Kovács L., Howard S., Kiss E., Galbàcs Z., Testolin R., Kozma P., 2008. Resistance to *Erysiphe necator* in the grapevine "Kishmish vatkana" is controlled by a single locus through restriction of hyphal growth. *Theoretical and applied genetics* 116, 427-438.
- Hofmann U., Heibertshausen D., Baus-Reichel O., Berkelmann-Loehnertz B., 2008. Optimization of downy mildew (*Plasmopara viticola*) control in organic viticulture with low copper doses, new copper formulations, and plant strengtheners: results of four years of on farm research. 16th IFOAM Organic World Congress, Modena, Italy.

- Jean-Denis J.B., Pezet R., Tabacchi R., 2006. Rapid analysis of stilbenes and deviratives from downy mildew-infected grapevine leaves by liquid chromatography-atmospheric pressure photoionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography* 1112, 263-268.
- Jorgensen J.H., 1992. Discovery, characterization and exploitation of *mlo* powdery mildew in barley. *Euphytica* 63, 141-152.
- Jürges G., Kassemeyer H.-H., Dürrenberger M., Düggelin M., Nick P., 2009. The mode of interaction between *Vitis* and *Plasmopara viticola* Berk. & Curt. Ex de Bary depends on the host species. *Plant Biology* 11, 886-898.
- Kast W.K., Stark-Arnau M., Seidel M., Gemmrich A.R., 2009. Inter-isolate variation of virulence of *Plasmopara viticola* on resistant vine varieties. *Mitteilungen Klosterneuburg* 50, 38-42.
- Kennelly M.M., Gadoury D.M., Wilcox W.F., Magarey P.A., Seem R.C., 2005. Seasonal development of ontogenetic resistance to downy mildew in grape berries and rachises. *Phytopathology* 95, 1445-1452.
- Kiefer B., Riemann M., Büche C., Kassemeyer H.H., Nick P., 2002. The host guides morphogenesis and stomatal targeting in the grapevine pathogen *Plasmopara viticola*. *Planta* 215, 387-393.
- Kortekamp A., Wind R., Zyprian E., 1997. The role of callose deposits during infection of two downy mildew-tolerant and two susceptible *Vitis* cultivar. *Vitis* 36, 103-104.
- Kortekamp A., Wind R., Zyprian E., 1998. Investigation on interaction of *Plasmopara viticola* with susceptible and resistant cultivars. *Journal of Plant Disease and Protection* 105, 475-488.
- Kortekamp A., Wind R., Zyprian E., 1999. The role of hairs on the wettability of grapevine (*Vitis* spp) leaves. *Vitis* 38, 101-105.
- Kortekamp A., Zyprian E., 1999. Leaf hairs is a basic protective barrier against downy mildew of grape. *Journal of Phytopatology* 147, 453-459.
- Langcake P., Price R.J., 1976. Production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of *Vitaceae* as a response to infection or injury. *Physiological Plant Pathology*, 9, 77-86.
- Langcake P., Price R.J., 1977. A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia* 33, 151-152.
- Langcake P., 1981. Disease resistance to *Vitis* spp and the production of the stress metabolites resveratrol, ϵ -viniferin, α -viniferin and pterostilbene. *Physiological Plant Pathology*, 18, 213-226.

- Lakso A. N., Pratt C., Pearson R. C., Welser M. J., 1982. Photosynthesis, transpiration et water use efficiency of mature grape leaves infected with *Uncinula necator* (powdery mildew). *Phytopatology* 72, 232-236.
- La Torre A., Spera G., Gianferro M., Scaglione M., 2007. More years of field trials against *Plasmopara viticola* in organic viticulture. *Communications In Agricultural and Applied Biological Science* 72, 901-908.
- Leinhos G. M. E., Gold R. E., Duggelin M., Guggenheim R., 1997. Development and morphology of *Uncinula necator* following treatment with the fungicides kresoxim-methyl and penconazole. *Mycological Research* 101, 1033-1046.
- Liu S.M., Sykes S.R., Clingeleffer P.R., 2008. Variation between and within families in reaction to leaf inoculation with downy mildew sporangia under controlled conditions. *Vitis* 47, 55-63.
- Mancini C., 1893. I vitigni ed i vini del Lazio. Dall'Annuario generale di Viticoltura ed Enologia, anno II,.
- Marzotto N., 1925. Uve da vino. Vol. I, Vicenza.
- Mattivi F., Reniero F., Korhammer S., 1995. Isolation, characterization and evolution in red wine vinification of resveratrol monomers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43, 1820-1823.
- Mattivi F., Vrhovsek U., Malacarne G., Masuero D., Zulini L., Stefanini M., Moser C., Velasco R., Guella G., 2011. Profiling of resveratrol oligomers, important stress metabolites, accumulatine in the leaves of hybrid *Vitis vinifera* (Merzling x Terodelgo) genotypes infected with *Plasmopara viticola*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 5364-5375.
- Melidossian H.S., Seem R.C., English-Loeb G., Wilcox W.F., Gadoury D.M., 2005. Suppression of grapevine powdery mildew by a mycophagus mite. *Plant disease*, 89, 1331-1338.
- Mence M.J., Hildebrandt A.C., 1966. Resistance to powdery mildew in rose. *Annal of Applied Biology*. 58, 309-321.
- Mengarini F., 1888. La viticoltura e l'enologia nel Lazio. Roma.
- Miazzi M., Hajjeh H., Faretra R., 2008. Occurrence and distribution of two distinct genetic groups in populations of *Erysiphe necator* Schw. In southern Italy. *Journal of Plant Pathology*, 90, 563-573.
- Molon G., 1906. Ampelografia. Uve da vino, uve da tavola, porta-innesti e produttori diretti. Volumi I e II, Milano, 1906.
- Moreira F.M., 2005. Identificazione di QTL per la resistenza a *Plasmopara viticola* e *Uncinula necator* in vite. Tesi di dottorato di ricerca in Biologia Vegetale e Produttività della Pianta Coltivata, XVIII ciclo, Università degli Studi di Milano.

- Morris B.M., Nar G., 1993. Mechanism of electrotaxis of zoospores of phytopathogenic fungi. *Phytopathology* 83, 877-882.
- Muganu M., Bellincontro A., Barnaba F.E., Paolocci M., Bignami C., Gambellini G., Mencarelli F., 2011. Influence of Bunch Position on Berry Epicuticular Wax During Ripening and on Weight Loss in Dehydration Process. *American Journal of Enology and Viticulture* 62, 91-98.
- Muganu M., Paolocci M., Maone S., Frediani M., Pettinari G., Magro R., Morassut M., 2010. Caratterizzazione di accessioni di Rossetto come base per l'avvio di una selezione clonale. *Italus Hortus* (in stampa).
- Muganu M., Scossa A., Paolocci M., Bignami C., 2006. Raccolta, conservazione e valutazione di germoplasma viticolo dell'Alto Lazio: attività svolte in un campo collezione presso l'Università della Tuscia. In *Atti Convegno Nazionale Vitigni Autoctoni Minori: aspetti tecnici, normativi e commerciali*. Villa Gualino, Torino.
- Muganu M., Dangl G., Aradhya M., Frediani M., Scossa A., Stover E., 2009. Ampelographic and DNA Characterization of local grapevine accessions of the Tuscia Area (Latium, Italy). *American Journal of Enology and Viticulture* 60, 110-115.
- Natali S., Bignami C., 1988. Stato attuale e prospettive della viticoltura dell'Alto Lazio. *Informatore Agrario* 1, 59-65.
- OEPP/EPPO, 2004. Directives pour l'évaluation biologique des produits phytosanitaires, Vol. 2. Efficacy Evaluation of Fungicides and Bactericides, 47-52.
- OIV (Office International de la Vigne et du Vin, Paris) 2009. Codes des caractères descriptifs des variétés et espèces de *Vitis*.
- Pallioti A., Cartechini A., Ferranti F., 2000. Morpho-anatomical and physiological characteristics of primary and lateral shoot leaves of Cabernet Franc and Trebbiano toscano grapevines under two irradiance regimes. *American Journal of Enology and Viticulture* 51, 122-130.
- Pauquet J., Bouquet A., This P., Adam-Blondon A.-F., 2001. Establishment of a local map of AFLP markers around the powdery mildew resistance gene Run1 in grapevine and assessment of their usefulness for marker assisted selection. *Theoretical Applied Genetics* 103, 1201-1210.
- Pavloušek P., 2007. Evaluation of resistance to powdery mildew in grapevine genetic resources. *Journal of Central European Agriculture* 8, 105-114.

- Pearson R.C., Gadoury D.M., 1992. Grape powdery mildew. *In*: Plant diseases of International Importance, Vol. III. Disease of Fruit Crops (Kumar J., Chaube H.S., Singh U.S., Mukhopadhyay A.N., eds) 129-146. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall.
- Péros J.P., Nguyen T.H., Troulet C., Michel-Romiti C., Notteghem J.L., 2006. Assessment of powdery mildew resistance of grape and *Erysiphe necator* pathogenicity using a laboratory assay. *Vitis* 45, 29-36.
- Pezet R., Perret C., Jean-Denis J.B., Tabacchi R., Gindro K., Viret O., 2003. Delta-viniferin, a resveratrol dehydrodimer: One of the major stilbenes synthesized by stressed grapevine leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 5488-5492.
- Pezet R., Gindro K., Viret O., Richter H., 2004. Effects of resveratrol, viniferins and pterostilbene on *Plasmopara viticola* zoospore mobility and disease development. *Vitis* 43, 145-148.
- Pezet R., Gindro K., Viret O., Spring J., 2005. Glycosylation and oxidative dimerization of resveratrol are respectively associated to sensitivity and resistance of grapevine cultivars to downy mildew. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 65, 297-303.
- Piffanelli P., Devoto. A., Schulze-Lefert P., 1999. Defence signaling pathways in cereals. *Current Opinion on Plant Biology* “, 295-300.
- Prosperi V., 1939. I vini pregiati dei Castelli Romani. R.E.D.A., Roma.
- Prosperi V., Pirovano A., Bruni B., 1988. Catalogo nazionale delle varietà di vite. Ministero dell'Agricoltura e Foreste. Arti Grafiche, Conegliano.
- Ramming D.W., Gabler F., Smilanick J., Cadle-Davidson M., Barba P., Mahanil S., Cadle-Davidson L., 2011. A single dominant locus Ren4 confers non-race-specific penetration resistance to grapevine powdery mildew. *Phytopathology* 101, 502-508.
- Riemann M., Büche C., Kassemeyer H.H., Nick P., 2002. Microtubules and actin microfilament of cell polarity during early development of the wine pathogen *Plasmopara viticola*. *Protoplasma* 219, 13-22.
- Rossi V., Caffi T., Bugiani R., Spanna F., Della Valle D., 2008. Estimating the germination dynamics of *Plasmopara viticola* oospores using hydro-thermal time. *Plant Pathology* 57, 216-226.
- Rossi V., Caffi T., Leger S.E., 2010. Dynamics of ascospore maturation and discharge in *Erysiphe necator*, the causal agent of powdery mildew. *Phytopathology*, 100, 1321-1329.

- Rügner A., Rumbolz J., Huber B., Bleyer G., Gisi U., Kassemeyer H.-H., Guggenheim R., 2001. Formation of overwintering structures of *Uncinula necator* and colonization of grapevine under field conditions. *Plant Pathology* 51, 322-330.
- Sarig P., Zutkhi Y., Monjauze A., Lisker N., Ben-Arie R., 1997. Phytoalexin elicitation in grape berries and their susceptibility to *Rhizophus stolonifer*. *Physiological and molecular Plant Pathology* 50, 337-347.
- Savocchia S., Stummer B.E., Wicks T.J., Van Heewijck R., Scorr E.S., 2004. Reduced sensitivity of *Uncinula necator* to sterol demethylation inhibiting fungicides in southern Australian vineyards. *Australian Plant Pathology* 33, 465-473.
- Schnee S., Viret O., Gindro K., 2008. Role of stilbenes in the resistance of grapevine to powdery mildew. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 72, 128-133.
- Schnee S., Spring J. L., Viret O., Dubuis P. H., Gindro K., 2009. Outils pour la sélection précoce de cépages résistants à l'oïdium. *Revue suisse de Viticulture, Arboriculture et Horticulture* 41, 87-93.
- Sotolář R., 2007. Comparison of grape seedlings population against downy mildew by using different provocation methods. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 35, 61:68.
- Spring J.-L., Jermini M., Maigre D., Murisier F., 1998. Regent, un nouveau cépage résistant aux maladies. Expériences en Suisse romande et au Tessin. *Revue suisse de Viticulture, Arboriculture et Horticulture* 30, 347-351.
- Spring J.-L., 2001. Premières expériences avec les cépages interspécifiques Merzling, Johanniter, Bronner et Solaris en Suisse romande. *Revue suisse de Viticulture, Arboriculture et Horticulture* 33, 57-64.
- Spring J.-L., 2005. Expérimentation en Suisse romande de nouveaux cépages rouges résistants aux maladies. *Revue suisse de Viticulture, Arboriculture et Horticulture* 37, 255-261.
- Staudt G., Kassemeyer H. H., 1995. Evaluation of downy mildew resistance in various accessions of wild *Vitis* species. *Vitis* 34, 225-228.
- Staudt G., 1997. Evaluation of resistance to grapevine powdery mildew (*Uncinula necator* (SCHW.) Burr., anamorph *Oidium tuckeri* BERK.) in accessions of *Vitis* species. *Vitis* 36, 151-154.
- Stein U., Heintz C., Blaich R., 1985. The in vitro examination of grapevines regarding resistance to powdery mildew and downy mildew. *Journal of Plant Disease and Protection*. 92, 355-369.
- This P., Lacombe T., Thomas M., 2006. Historical origin and genetic diversity of wine grapes. *Trends in genetics* 22, 511-519.

- Treutter D., 2006. Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environmental Chemistry Letters* 4, 147-157.
- Unger S., Büche C., Boso S., Kassemeyer H.-H., 2007. The course of colonization of two different *Vitis* genotypes by *Plasmopara viticola* indicates compatible and incompatible host-pathogen interactions. *Phytopathology* 97, 780-787.
- Valdés-Gómez H., Gary C., Cartolaro P., Lolas-Caneo M., Calonnec A., 2011. Powdery mildew development is positively influenced by grapevine vegetative growth induced by different soil management strategies. *Crop Protection* 30, 1168-1177.
- Vannuccini L., 1892. I vitigni toscani. In “Annuario generale di Viticoltura ed Enologia, anno I.
- Viret O., Bloesch B., Fabre A.L., Siegfried W., Bleyer G., Huber B., Kassemeyer H.H., Steinmetz V., 2005. Vitimeteo: un nouveau modèle de prevision pour le mildiou de la vigne (www.agrometeo.ch). *Revue suisse de Viticulture, Arboriculture et Horticulture* 37, 65-68.
- Viret O., Siegfried W., Bloesch B., Taillens J., Mittaz C., 2007. Dosage des fongicides adaptés à la surface foliaire: résultats en 2006. *Revue suisse de Viticulture, Arboriculture et Horticulture* 39, 65-68.
- Wan J., Zhang X.C., Neece D., Ramonell K.M., Clough S., Kim S.Y., Stacey M.G., Stacey G., 2008. A LysM receptor –like kinase plays a critical role in chitin signaling and fungal resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 20, 471-481.
- Wan Y.Z., Schwaninger H., He P.C., Wang Y.J., 2007. Comparison of resistance to powdery mildew and downy mildew in Chinese wild grapes. *Vitis* 46, 132-136.
- Wang Y., Liu Y., He P., Chen J., Lamikanra O., Lu J., 1995. Evaluation of foliar resistance to *Uncinula necator* in Chinese wild *Vitis* species. *Vitis* 34, 159-164.
- Welter L.J., Gokturk-Baydar N., Akkurt M., Maul E., Eibach R., Topfer R., Zyprian E.M., 2007. Genetic mapping and localization of quantitative trait loci affecting fungal disease resistance and leaf morphology in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Molecular Breeding* 20, 359-374.
- Zahavi T., Reuveni M., Sheglov D., Lavee S., 2001. Effect of grapevine training systems on development of powdery mildew. *European Journal of Plant Pathology* 107, 495-501.
- Zahavi T., Reuveni M., 2012. Effect of grapevine training systems on susceptibility of berries to infection by *Erysiphe necator*. *European Journal of Plant Pathology* DOI 10.1007/s10658-012-9938-z.

Ringraziamenti

Al Dottor Massimo Muganu per l'aiuto costante, ma soprattutto per la fiducia sempre dimostrata.

Alla Dottoressa Katia Gindro e alla Dottoressa Virginia Alonso-Villaverde, per la preziosa disponibilità e a tutto il gruppo del Centro di Ricerca Federale di Changins-Wädensville a Nyon per l'accoglienza amichevole.

Al Professor Paolo Magro per l'aiuto nella fase di revisione.

Alle ragazze di Patologia, soprattutto alle Dottoresse Diana Martignoni e Maria Pia Oleandri, per il generoso supporto tecnico.

Ai signori Corrado Cammilli e Adriano Menghi per la collaborazione in ambiti tecnici fondamentali.

A tutti i miei compagni in questo triennio, soprattutto alla Dottoressa Angela Scossa, per l'argomento di questa tesi, ai Dottori Federico Emanuele Barnaba e Giovanni Pettinari.