





### LA FLAVESCENZA DORATA DELLA VITE

# GIORNATA INFORMATIVA SULLA RICERCA SCIENTIFICA IN PIEMONTE

ASTI, 11 DICEMBRE 2006









# RUOLO DEI VIGNETI ABBANDONATI E DEGLI INCOLTI SULLA PRESENZA DI SCAPHOIDEUS TITANUS IN AREE VITICOLE

Alberto Alma, Federico Lessio

Di.Va.P.R.A., Entomologia e Zoologia applicate all'Ambiente "C. Vidano", Facoltà di Agraria, Università di Torino

Attività di ricerca svolta nell'ambito del progetto finanziato dalla Regione Piemonte: "Studi sulla flavescenza dorata della vite e sul suo vettore *Scaphoideus titanus*: epidemiologia, diagnostica, prevenzione, contenimento".

Sottoprogetto "Attività di volo di S. titanus nell'agroecosistema vigneto".

Hanno collaborato per l'attività di laboratorio Federica Tota e per quella di campo Alessandro Cesano.

Scaphoideus titanus Ball (Homoptera Cicadellidae) è l'unico vettore accertato della Flavescenza dorata della vite (FD), grave malattia causata da fitoplasmi del gruppo 16Sr-V (sottogruppi C e D). Si tratta di un ampelofago obbligato, capace di completare il proprio ciclo biologico esclusivamente a carico della vite. La lotta obbligatoria alla FD (DM 32442 del 31 maggio 2000) si basa pertanto sull'applicazione di insetticidi in vigneto e sulla rimozione delle piante infette al fine di abbassare sia la densità di popolazione dell'insetto vettore, sia il potenziale d'inoculo della malattia. Tuttavia, gli ecosistemi in cui S. titanus può riprodursi non sono rappresentati esclusivamente da vigneti propriamente detti, dal momento che Vitis spp. può essere ritrovata anche in aree incolte consociata a vegetazione arborea ed arbustiva. In diverse aree viticole piemontesi sono infatti numerosi gli incolti ricchi di vite americana sviluppatasi da vecchi ceppi di portinnesto e presente come specie a portamento lianoso. Un'altra tipologia di bioma favorevole a S. titanus è costituita da vigneti in stato di abbandono meno avanzato, in cui la vite europea (Vitis vinifera L.) risulta ancora la specie dominante. Appare dunque di fondamentale importanza indagare sul ruolo di tali ecosistemi nella diffusione di S. titanus e della FD sul territorio. Un altro aspetto da tenere in considerazione è rappresentato dalla effettiva capacità di S. titanus di compiere lunghi spostamenti in volo e quindi di colonizzare nuovi ambienti. I dati esposti sono il risultato di indagini pluriennali sulla presenza di S. titanus in diversi agro-ecosistemi piemontesi e sulla sua attività di volo.

La distribuzione degli stadi giovanili di S. titanus nel vigneto è di tipo aggregato, con nuclei di popolazione concentrati su poche piante: questo aspetto ha permesso l'elaborazione di un sistema di campionamento pratico ed affidabile, basato sul metodo delle linee di arresto, che consente di interrompere i conteggi (effettuati su 5 foglie per pianta) al raggiungimento di una data soglia. Tale metodo deve essere ancora perfezionato per gli incolti, nei quali non è possibile distinguere chiaramente le diverse piante di vite americana. Sulla vite europea, le neanidi (I e II età) colonizzano prevalentemente le foglie basali, mentre le ninfe (III età ed oltre) frequentano anche quelle in prossimità del legno di un anno. Gli adulti compaiono generalmente all'inizio di luglio, e in condizioni climatiche favorevoli sono presenti sulla vite fino alla fine di ottobre; il picco di volo si colloca tra la fine di luglio e l'inizio di agosto. L'attività di volo è limitata alla chioma della vite, dato che raramente gli adulti vengono ritrovati ad oltre 2,50 m di altezza dal suolo o a distanze maggiori di 20 m dal bordo esterno del vigneto; inoltre anche gli adulti tendono a rimanere localizzati in pochi punti, dato il loro comportamento di tipo aggregato. Il volo è prevalentemente crepuscolare, e questo aspetto supporta il fatto che S. titanus non presenti sindrome migratoria né sia suscettibile di trasporto passivo attraverso gli agenti atmosferici, dal momento che durante la notte le correnti ascensionali sono minori. Elevate temperature minime e massime e bassa umidità relativa minima sembrano favorire l'attività di volo. I maschi sono più abbondanti all'inizio della stagione (luglio-agosto), e volano di più rispetto alle femmine: anche questo aspetto depone a sfavore di una sindrome migratoria, dato che nelle specie migratrici sono le femmine a presentare una maggiore mobilità.

S. titanus risulta più abbondante in vigneti coltivati non trattati o non correttamente trattati con insetticidi, dove i livelli di popolazione possono raggiungere valori estremamente elevati. Nell'ambito della presente ricerca, in alcuni di tali vigneti sono stati catturati da 150 a 900 adulti nel corso della stagione, mentre sono stati rinvenuti da 0,1 a 4 giovani per pianta. Secondariamente, altre zone rifugio sono rappresentate, nell'ordine, dai vigneti in stato di abbandono e dagli incolti con abbondante presenza di vite americana: nei vigneti abbandonati i livelli di popolazione rilevati sono risultati compresi tra 10 e 400 adulti a stagione, denotando una maggiore variabilità, mentre sono stati conteggiati da 0,01 a 3 giovani per pianta. Gli incolti con vite sono risultati meno o per nulla colonizzati. In alcuni siti sono stati catturati 40-60 adulti per stagione, mentre in diversi casi non sono state registrate catture; le densità degli stadi giovanili sono risultate comprese tra 0 e 30 individui per 100 foglie. Infine, nei vigneti correttamente trattati raramente sono stati catturati più di 10 adulti nel corso della stagione, o conteggiati più di 0,1 giovani per pianta prima dei trattamenti, ed in numerosi casi S. titanus non è mai stato ritrovato né come giovane né come adulto.

Il fatto che i vigneti abbandonati e in particolare gli incolti con vite risultino meno infestati rispetto ai vigneti coltivati ma non trattati può essere spiegato in parte con una minore presenza dei limitatori naturali, dovuta all'assenza di zone-rifugio come siepi e bordure vegetali. Tuttavia, il motivo principale sembra risiedere nella differente concentrazione e sviluppo (forma di allevamento) della pianta ospite, soprattutto nel caso degli incolti. Le numerose prove condotte non hanno evidenziato differenze significative nelle catture dell'insetto vettore tra l'interno dei vigneti trattati ed il bordo esterno degli stessi in prossimità di vigneti abbandonati o incolti con vite, confermando il fatto che vigneti gestiti correttamente non presentano grossi problemi di ricolonizzazione, e pertanto sembra da escludersi una consistente attività di "migrazione" del vettore da questi ecosistemi-serbatoio ai vigneti limitrofi. Attualmente, il rischio maggiore per la diffusione di *S. titanus* sul territorio è rappresentato, prioritariamente, dalla mancanza di un'adeguata gestione fitosanitaria a livello comprensoriale.

Nei vigneti coltivati, il periodo di maggior rischio per la trasmissione del fitoplasma si colloca in corrispondenza della seconda metà-fine di agosto, quando gli individui infetti possono raggiungere il 35-40% della popolazione e quando viene meno l'azione di copertura degli insetticidi. Un aspetto da chiarire riguarda invece il ruolo della vite americana, presente negli incolti, quale possibile serbatoio per il fitoplasma e non solo per l'insetto. Infatti, recentemente, alcune ninfe di *S. titanus* raccolte su vite americana negli incolti sono risultate positive al fitoplasma della FD in Real-Time PCR: tale risultato indicherebbe una possibile acquisizione dell'insetto vettore sulla vite americana. Un'ulteriore complicazione giunge dal fatto che la vite americana, seppur infetta, sembra non manifestare i tipici sintomi della FD.

#### VALUTAZIONE DI MOLECOLE INSETTICIDE NELLA PREVENZIONE DELLA TRASMISSIONE DEI FITOPLASMI

#### Domenico Bosco

Istituzioni partecipanti: Di.Va.P.R.A. – Entomologia e Zoologia applicate all'Ambiente "Carlo Vidano", Università degli Studi di Torino - Istituto di virologia vegetale, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Torino

Attività di ricerca svolta nell'ambito del progetto finanziato dalla Regione Piemonte: "Studi sulla flavescenza dorata della vite e sul suo vettore *Scaphoideus titanus*: epidemiologia, diagnostica, prevenzione, contenimento".

Ricercatori coinvolti: Domenico Bosco, Paolo Saracco, Davide Pacifico, Cristina Marzachì e Alberto Alma

La lotta insetticida contro il cicadellide vettore Scaphoideus titanus Ball è uno dei pilastri della lotta obbligatoria contro la Flavescenza dorata della vite stabilita mediante D.M. 31 maggio 2000. Il drastico abbassamento della popolazione del vettore è infatti una condizione indispensabile al contenimento della fitopatia nelle zone dove la FD è presente e, sebbene esistano indicazioni sull'efficacia di diversi principi attivi nei confronti di S. titanus (Mori et al., 1999; Mazzoni et al., 2003; Mazio e Montermini, 2004), non esistono indicazioni sull'attività degli insetticidi nel prevenire la trasmissione del fitoplasma. La morte della cicalina avvelenata dall'insetticida può infatti avvenire dopo che la stessa ha trasmesso il fitoplasma, vanificando parzialmente l'effetto della lotta. In particolare negli anni passati si è osservato un certo ritardo tra l'inizio della lotta insetticida e la riduzione del ritmo di infezione che può essere spiegato sia dal periodo di incubazione della malattia in vite sia dal fatto che alcune cicaline abbiano trasmesso FD prima di essere uccise. In particolare la presenza di vigneti non trattati e/o abbandonati potrebbe rappresentare un focolaio di cicaline infette che possono diffondere la malattia nei vigneti limitrofi se non uccise prontamente dall'azione dell'insetticida. Il programma di ricerca è stato rivolto all'analisi dell'attività di principi attivi nella prevenzione della trasmissione dei fitoplasmi. Al fine di verificare l'efficacia di tali molecole la sperimentazione si è svolta in due fasi, nella prima si è accertata l'attività nei confronti della prevenzione della trasmissione di fitoplasmi a piante erbacee (che rappresenta un sistema sperimentale assai rapido, riproducibile e ripetibile) e nella seconda, i cui risultati sono ancora in corso di acquisizione, si è verificata la stessa attività nei confronti della prevenzione della trasmissione di FD.

Con il sistema sperimentale erbaceo rappresentato da Macrosteles quadripunctulatus Kirschbaum, il fitoplasma chrysanthemum yellows (del gruppo aster yellows) e la pianta sono stati saggiati Fenitrothion, Chlorpyriphos Ethyl e Chrysanthemum frutescens L. Malathion tra gli organofosforati e Imidacloprid tra i neonicotinoidi sistemici. Le piante test erano esposte per 2 giorni a gruppi di 5 cicaline infettive dopo 1, 4, 7, 10, 15 e 20 giorni dal trattamento. In un secondo esperimento, che riproduceva una situazione più simile a quella di campo, una trentina di piantine test venivano esposte collettivamente per un paio di settimane a 20 cicaline infettive il giorno seguente il trattamento. In questo esperimento le cicaline erano libere di spostarsi da una pianta all'altra. I risultati del primo esperimento dimostrano che gli organofosforati non hanno efficacemente protetto le piante dall'infezione benché abbiano ucciso le cicaline. Solo ad 1 e 4 giorni dal trattamento le piante trattate con organofosforati erano infette in misura significativamente inferiore al testimone (ciononostante la maggioranza delle piante trattate risultava infetta). Dal settimo giorno in avanti, nelle nostre condizioni sperimentali, non vi era più alcuna protezione. Al contrario, il numero di piante infette trattate con imidacloprid era significativamente inferiore a quello delle piante controllo lungo tutto il corso dell'esperimento (fino a 20 giorni dopo il trattamento). Durante l'esperimento è stato anche verificato il tempo di sopravvivenza delle cicaline isolate su piante trattate: il tempo letale per il 50% di esse variava, a seconda dell'insetticida, da 2 a 3 ore, mentre il tempo letale per il 100% variava da 3 a 7 ore. Nonostante la sopravvivenza piuttosto breve le cicaline sono riuscite ad infettare il 70% delle piante trattate con organofosforati, evidenziando quindi che poche ore di nutrizione sono sufficienti per la trasmissione. Il secondo esperimento, condotto con un minor numero di cicaline che erano libere di muoversi tra le piante, ha evidenziato una migliore attività degli organofosforati rispetto a quella riscontrata nel primo (anche se 6-8 piante su 32 risultavano infette a seconda del principio attivo) mentre ha confermato l'efficacia di imidacloprid che ha totalmente protetto le piante.

Con il sistema sperimentale *S. titanus*/FD/vite sono stati saggiati l'organofosforato fenitrothion e il neonicotinoide thiamethoxam, entrambi registrati per l'uso in vigneto contro il vettore di FD. Le cicaline erano infettate mediante nutrizione prolungata su *Vicia faba* L. che permette un'acquisizione assai più efficiente che da vite. Similmente all'altro esperimento le viti test (cv Barbera) erano esposte a gruppi di 3 cicaline infettive ad 1, 4, 7, 10, e 15 giorni dal trattamento. Il controllo mediante PCR delle cicaline impiegate nelle prove di trasmissione ha rivelato che circa il 50% di esse erano positive ad FD. Nessuna cicalina è sopravvissuta alla nutrizione di 5 giorni sulle viti test trattate con fenitrothion e thiamethoxam. I risultati relativi all'infezione delle piante sono in corso di ottenimento a causa del tempo di incubazione della malattia in vite. Fino ad ora sono stati osservati sintomi riconducibili a FD su circa il 30-40% delle piante non trattate e in proporzione sensibilmente minore tra quelle trattate. Ciononostante i dati della diagnosi mediante PCR non hanno confermato molti dei dati basati sull'osservazione dei sintomi e occorre quindi attendere almeno un altro anno per ottenere indicazioni affidabili.

Sebbene i dati sperimentali non siano ancora completi è possibile concludere che l'attività degli organofosforati è soddisfacente per quanto riguarda la mortalità del vettore, che si riflette sulla diffusione della fitoplasmosi, ma è insoddisfacente per quanto riguarda l'effetto di protezione delle piante. Al contrario gli insetticidi neonicotinoidi, oltre ad uccidere le cicaline e mostrare una maggiore persistenza di attività, impediscono la trasmissione, probabilmente perché bloccano molto rapidamente l'attività trofica. Negli areali dove tutti i viticoltori svolgono effettivamente i prescritti trattamenti insetticidi l'attività degli organofosforati può essere soddisfacente. Nelle zone a maggior rischio, dove esistono vigneti abbandonati o non trattati, l'uso di thiamethoxam fornisce probabilmente migliori garanzie di efficacia.

#### **BIBLIOGRAFIA CITATA**

- Mazio P., Montermini A., 2004. Verifica dell'efficacia di Imidacloprid contro Scaphoideus titanus Ball (Rhyncota Cicadellidae) in vigneti reggiani nel triennio 2000-2002. Atti Giornate Fitopatologiche 1, 103-108.
- Mazzoni E., Colla R., Chiusa B., Ciampitti M., Cravedi P., Editor: Lozzia C., 2003. Experiences for vector control of grape golden flavescence in Lombardia and Emilia Romagna (Northern Italy) vineyards. Bulletin OILB/SROP 26 (8), 221-225.
- Mori N., Girolami V., Posenato G., Tosi L., Sancassani G.P., 1999. Insetticidi per il controllo delle cicaline dei vigneti. L'Informatore Agrario 57(15), 93-97.

MONITORAGGIO DELLE POPOLAZIONI DI *Scaphoideus titanus* in vigneti piemontesi.

LOTTA INSETTICIDA A *SCAPHOIDEUS TITANUS*: VALUTAZIONI SU EFFICACIA, EFFETTI COLLATERALI E RESIDUI NEL VINO.

Giovanni Bosio Settore Fitosanitario – Regione Piemonte

### Monitoraggio delle popolazioni di *Scaphoideus titanus* in vigneti piemontesi a seguito di interventi insetticidi.

Partecipanti al progetto: Vignaioli Piemontesi, S.A.G.E.A Centro di Saggio, Osservatorio Martini & Rossi per il Miglioramento dell'uva Moscato, Settore Fitosanitario – Regione Piemonte.

Tecnici coinvolti: D. Dellavalle, D. Ferrarese, D. Ferrari, P. Occhetti, G. Bosio.

Nel corso del 2000 sono stati monitorati 30 vigneti per valutare: 1) decorso del ciclo biologico di *Scaphoideus titanus*: inizio schiusura uova, inizio comparsa adulti, picco di volo degli adulti, etc.; 2) efficienza di diverse tecniche di monitoraggio degli adulti di *S. titanus* (retino e trappole cromotattiche); 3) livelli iniziali di popolazione di *S. titanus* in vigneti sottoposti negli anni precedenti a diversi regimi fitosanitari (integrati, biologici, non trattati con insetticidi); 4) variazioni dei livelli di presenza a seguito di trattamenti con diversi principi attivi ad azione insetticida.

#### Risultati

I rilievi effettuati hanno consentito di definire il decorso "standard" del ciclo biologico di *Scaphoideus titanus* in annate "normali": inizio della schiusura delle uova verso fine della prima decade di maggio, comparsa dei primi adulti a fine giugno, picco di volo degli adulti nella 2° metà di luglio ed in agosto. Le catture effettuate con retino o trappole cromotattiche hanno evidenziato un andamento simile nel corso della stagione, anche se le trappole risultano poco efficaci nella prima quindicina di luglio, anche in vigneti con elevati livelli di popolazione, probabilmente per la scarsa mobilità degli adulti, in prevalenza maschi, in questo periodo.

La presenza del vettore è risultata modesta negli appezzamenti già trattati contro lo scafoideo nel 1999, mentre ha raggiunto livelli elevati in alcuni vigneti di Barbera dell'Astigiano. Questo vitigno ha presentato popolazioni del cicadellide mediamente superiori rispetto a Moscato. Per quanto riguarda l'effetto dei diversi insetticidi, è stata evidenziata una azione insufficiente di flufenoxuron, la cui efficacia pare condizionata da numerosi fattori, non sempre facilmente controllabili da parte del viticultore. La scarsa elasticità di impiego, correlata anche ad una certa lentezza di azione, fa si che l'utilizzo di questo regolatore di crescita non sia consigliabile nella lotta ad un insetto vettore di fitoplasmi. Per buprofezin in tutti i sette casi esaminati l'efficacia è risultata buona, come pure, anche se per un numero estremamente ridotto di vigneti, per gli insetticidi ad azione abbattente fenitrotion e etofenprox.

#### **BIBLIOGRAFIA:**

Bosio G., Rossi A., 2001 - Ciclo biologico in Piemonte di *Scaphoideus titanus*. - L'Informatore Agrario, 21: 75 – 78.

Bosio G. *et al.*, 2001 - Evoluzione delle popolazioni di *Scaphoideus titanus* a seguito di interventi insetticidi. - L'Informatore Agrario, 21: 79 – 84.

### Lotta insetticida a *Scaphoideus titanus*: valutazioni sull'efficacia di diverse sostanze attive.

Partecipanti al progetto: Vignaioli Piemontesi, S.A.G.E.A. Centro di Saggio, VIT. EN., Settore Fitosanitario – Regione Piemonte.

*Tecnici coinvolti:* D. Dellavalle, L. Laiolo, G. Valuta, D. Ferrari, P. Occhetti, M.C. Martinez, I. Rovetto, P. Crovella, A. Morando, G. Bosio.

Nel periodo 2001-2003 sono state realizzate prove di efficacia di insetticidi caratterizzati da differenti modalità d'azione contro gli stadi giovanili di *S. titanus*: 1-regolatori di crescita (buprofezin, flufenoxuron), efficaci esclusivamente sugli stadi preimmaginali, 2-neurotossici (fosforganici, piretroidi, indoxacarb, etofenprox), in genere dotati di un più ampio spettro di azione. In alcune prove sono stati inseriti anche prodotti di origine naturale (spinosad, piretrine, rotenone, oli vegetali) utilizzabili, tranne il primo, nei vigneti a conduzione "biologica".

#### Risultati

Gli insetticidi a largo spettro di azione (clorpirifos, fenitrotion, malation, etofenprox, acrinatrina), anche se valutati solo in due prove, sono risultati altamente efficaci. Tra i p.a. considerati a minore impatto sull'entomo-acarofauna, solo buprofezin ha dato risultati significativi e costanti nelle diverse sperimentazioni. Indoxacarb, al contrario, non ha evidenziato un'azione di controllo del cicadellide e flufenoxuron si è differenziato solo raramente dal testimone. Spinosad ha rivelato una azione abbattente non elevata e di breve persistenza. Tra i prodotti di origine naturale il formulato a base di piretrine, addizionato di piperonil butossido, ha dato buoni risultati, anche se richiede più trattamenti a causa della breve persistenza di azione. La miscela di piretrine, rotenone e piperonil butossido ha ottenuto risultati simili, ma le dosi di impiego sono decisamente elevate. Il formulato commerciale a base di oli vegetali non ha fornito prestazioni significative.

Bosio G. *et al.*, 2004 - Valutazioni dell'efficacia di diversi insetticidi per la lotta alle forme giovanili di *Scaphoideus titanus* Ball su vite in Piemonte. - Atti Giornate Fitopatologiche, Montesilvano, vol. I: 95 – 102.

### Lotta insetticida a *Scaphoideus titanus* : valutazioni su residualità dei principi attivi sull'uva e nel vino.

Partecipanti al progetto: Tenuta Cannona, IPLA, Cadir Lab, Settore Fitosanitario – Regione Piemonte.

Tecnici coinvolti: N. Alliani, G. Battaglia, M. Rabino, G. Bonifacino, R. Tragni, G. Bosio, F. Gremo.

Nel biennio 2001-2002 è stata realizzata una sperimentazione per verificare la presenza di residui di alcuni insetticidi utilizzati contro *S. titanus* nelle uve, nel vino e nelle fecce. I trattamenti sono stati effettuati in vigneti della Tenuta Cannona (Carpeneto - AL), suddivisi in parcelloni, su diversi vitigni e nel rispetto dei momenti di intervento indicati per la lotta all'insetto. Le analisi sono state effettuate sia sulle uve che sui vini ottenuti con microvinificazioni dalle uve dei diversi parcelloni.

#### Risultati

Il fattore vitigno non ha influenzato la residuazione degli insetticidi utilizzati. In genere i residui sull'uva riscontrati sono risultati ampiamente entro i limiti di legge. Le analisi hanno confermato il basso rischio di residuazione per buprofezin, flufenoxuron e indoxacarb

che, impiegati in epoca precoce contro gli stadi giovanili di *S. titanus*, non sono stati mai rintracciati né nell'uva né tanto meno nel vino in entrambe le annate. Analoghe considerazioni valgono per etofenprox, malation (Smart EW) e fenitrotion (Sumit ECO) anche quando distribuiti nella prima decade di luglio o di agosto. Clorpirifos può lasciare residui sull'uva che però poi non risultano presenti nel vino, vista la tendenza a legarsi alla frazione solida del mosto e quindi a concentrarsi nelle fecce. Fenitrotion nella formulazione microincapsulata (Fenitrocap), se distribuito da luglio in poi, può dare residui superiori ai limiti di legge sull'uva e nel vino. Acrinatrina presenta scarsa attitudine a residuare, non essendo rintracciabile nel vino quando distribuito in epoca precoce. I risultati ottenuti, concordanti sostanzialmente con quelli riportati recentemente da altri autori per buprofezin ed etofenprox (Capella *et al.*, 2002) e per clorpirifos e fenitrotion (Cabras, 2001) (Cabras *et al.*, 1997), sono riferiti ad un singolo trattamento; nel caso di più trattamenti con lo stesso prodotto i livelli di residui risulterebbero verosimilmente maggiori.

#### **BIBLIOGRAFIA:**

Bosio G. *et al.*, 2003 - Comportamento residuale di insetticidi usati in viticoltura contro *Scaphoideus titanus*. - L'Informatore Agrario, 30: 45 – 48.

# Lotta a Scaphoideus titanus in vigneti condotti secondo le norme dell'agricoltura biologica.

*Partecipanti al progetto:* AGRI.BIO Piemonte, Settore Fitosanitario – Regione Piemonte. *Tecnici coinvolti:* E. Bassignana, F. Garetto, G. Bosio.

Per verificare l'efficacia di alcuni insetticidi di origine vegetale nel 2001 è stata realizzata in un vigneto biologico una prova sperimentale in cui sono state messe a confronto con il testimone non trattato 5 tesi. Accanto a piretro e rotenone, utilizzati da anni rispettivamente in Veneto e in Francia contro *S. titanus*, si è voluto saggiare l'efficacia di un formulato a base di azadiractina, di uno con piretro addizionato con olio bianco ultra leggero e di una miscela di piretro e rotenone al 50% delle dosi normali per verificare un eventuale effetto sinergico.

#### Risultati

La prova sperimentale ha evidenziato una sensibile differenza di azione dei prodotti testati. Il più efficace è risultato il piretro da solo o con l'aggiunta di olio ultra leggero, che non ne ha però mai migliorato l'efficacia. Il grado di azione di piretro e piretro+olio bianco è passato da valori compresi tra 50-60 % a distanza di 7 giorni dal 1° trattamento a valori di circa l'85% a 7 giorni dal 3° trattamento. Per la miscela rotenone+piretro a dosi dimezzate si è passati nelle stesse epoche da un grado di azione del 22% a uno del 59%. Rotenone e azadiractina non si sono mai differenziati in modo significativo dal testimone. L'olio leggero non ha dimostrato di aumentare l'efficacia del piretro; se ne sconsiglia pertanto l'impiego, potendo provocare danni da fitotossicità se distribuito in concomitanza con zolfo.

In nessuna tesi si è verificato un'effetto abbattente sui fitoseidi tale da ridurne drasticamente la popolazione e favorire la diffusione del ragnetto rosso.

#### **BIBLIOGRAFIA:**

Bassignana E. et al., 2002 - Per difendere l'uva dallo scafoideo. - Bioagricultura, 76: 25-27.

#### OTTIMIZZAZIONE DELLA TECNICA DI TERMOTERAPIA IN ACQUA PER L'OTTENIMENTO DI MATERIALE DI MOLTIPLICAZIONE ESENTE DA FITOPLASMI.

#### Franco Mannini

Istituto Virologia Vegetale – CNR - Unità di Grugliasco (TO), Via Leonardo da Vinci 44, 10095, e-mail: <a href="mainto:f.mannini@ivv.cnr.it">f.mannini@ivv.cnr.it</a>

Attività di ricerca svolta nell'ambito del progetto finanziato dalla Regione Piemonte: "Studi sulla flavescenza dorata della vite e sul suo vettore *Scaphoideus titanus*: epidemiologia, diagnostica, prevenzione, contenimento".

Collaborano alla ricerca:

C. Marzachì, N. Argamante, F. Ghilino – Istituto di Virologia Vegetale – CNR

C. Costa, S. Piano – Associazione Vignaioli Piemontesi

Le prove sono state eseguite presso i vivai: Vivalb, F.lli Nicola, Porro, Santamaria, Vinci

I fitoplasmi sono gli agenti eziologici di malattie gravissime che portano rapidamente al deperimento e poi alla morte delle piante. Tra queste le più comuni sono il Legno nero e la Flavescenza dorata. La lotta contro queste malattie è concentrata sulla riduzione dell'inoculo nei vigneti tramite l'estirpo delle piante infette, il contenimento delle popolazioni dell'insetto vettore e l'utilizzo di materiale di moltiplicazione sano. A livello vivaistico un possibile concreto ridimensionamento del problema, potrebbe venire dall'impiego di bagni in acqua calda a cui sottoporre il materiale di moltiplicazione. Sin dal 1966 in Francia è stato messo in evidenza che tale trattamento è in grado di eliminare i fitoplasmi dal 'legno' di piante infette. La principale remora alla diffusione di questa tecnica, oltre ad un aumento dei costi di produzione, consiste nel rischio che il trattamento riduca la vitalità del materiale di propagazione. Partendo da questo assunto, all'inizio del 2004, l'Istituto di Virologia Vegetale (IVV-CNR), ha fatto realizzare e messo in funzione presso il Nucleo di premoltiplicazione piemontese (CEPREMAVI) il prototipo di un impianto automatizzato per il trattamento in acqua calda del materiale di moltiplicazione. Il prototipo piemontese dispone di una doppia vasca per il preriscaldamento (atto a ridurre gli shock termici sul materiale di moltiplicazione) ed il riscaldamento, del caricamento automatico (che consente ad ogni turno di trattare consistenti quantitativi di materiale: 20.000 talee in mazzi oppure 100.000 marze spezzonate in sacchi a rete), di un sistema ramificato di sensori in grado di gestire con molta precisione la temperatura impostata in tutti i punti della vasca (migliorando l'efficienza del trattamento) e, grazie ad uno idoneo software, della possibilità di variare a piacimento i parametri del trattamento (temperature e durata) oltre che fornire una documentazione stampata e dettagliata sui modi e i tempi del trattamento eseguito.

Grazie alla disponibilità di tale attrezzatura, il cui costo è gravato sull'Associazione Vivaisti Piemontesi (sezione della Vignaioli Piemontesi), e ad uno specifico finanziamento della Regione Piemonte è stato avviato in parallelo un programma triennale di ricerca (2004-06) finalizzato all'ottimizzazione della tecnica.

La sperimentazione ha previsto svariati abbinamenti di temperature e tempi, diversi tipi di materiale di moltiplicazione (marze, talee portinnesto, marze e talee portinnesto, barbatelle) e svariate cultivar. I quantitativi di materiale trattato (e dei relativi testimoni non trattati) sono stati in scala semi-industriale interessando migliaia di 'pezzi'. La verifica della ripresa in vivaio del materiale in prova è stata suddivisa su diversi vivaisti in modo di avere repliche e ridurre eventuali effetti depressivi imputabili alla gestione del singolo vivaio e non al trattamento. Sono stati previsti controlli dopo la forzatura, nel periodo estivo in barbatellaio e in modo particolarmente approfondito dopo l'estirpo delle barbatelle. Una quota del materiale trattato è stato seguito anche nei vigneti in cui è stato successivamente impiantato per verificarne le attitudini nel lungo periodo.

La sperimentazione ha individuato come idonei, da un punto di vista vivaistico, i trattamenti a 45°x3 ore, 50°x45' e 52°x45'. La combinazione 45° per 3 ore, tuttavia, è poco apprezzata dai vivaisti in quanto richiede tempi lunghi che mal si conciliano con grandi quantità di materiale da trattare.

Per quanto riguarda i possibili danni sul materiale di moltiplicazione, i risultati sin qui conseguiti indicano che gli effetti negativi sulla vitalità e lo sviluppo delle barbatelle in vivaio sono in genere stati modesti (riduzioni di resa di 5-20 % a seconda dei casi) e talora inesistenti (in molti casi le rese del trattato sono state migliori di quelle del testimone). Alcune cultivar, come ad esempio la Freisa, sembrano mostrare rispetto ad altre una maggior sensibilità al trattamento, e comunque risulta molto importante la qualità di partenza del materiale legnoso (buona lignificazione, ottimo stato di conservazione, ecc.).

Le barbatelle prodotte con marze e talee di portinnesto termotrattate, una volta messe a dimora in vigneto hanno fornito in generale un attecchimento ed uno sviluppo normali nel primo anno dall'impianto.

Indagini preliminari sull'efficienza risanante del trattamento, condotte su materiale legnoso prelevato da piante infette, sembrano indicare il trattamento 52°x45' quello in grado di eradicare anche gli agenti del Legno nero (16Sr-XII) oltre a quelli della Flavescenza dorata (16Sr-V).

A fronte dei buoni risultati riscontrati nei primi anni di sperimentazione, la parte tecnicamente più avanzata del vivaismo piemontese ha creduto nel progetto, non solo fruendo dell'attrezzatura originaria per termotrattare almeno una parte della propria produzione, ma in diversi casi dotandosi di una propria attrezzatura per la termoterapia. In Piemonte (unico esempio a livello nazionale) nel 2006 è stato sottoposto a bagno termoterapico un quantitativo di materiale legnoso equivalente alla produzione di oltre 2.000.000 di barbatelle, quantitativo destinato ad aumentare sensibilmente nei prossimi anni.

Tab. 1. Resa % in barbatelle di 1° scelta ottenute presso diversi vivai utilizzando materiale termotrattato in acqua (marza e portinnesto) e un testimone non trattato, 2005.

CULTIVAR	PORTINNESTO	N.°	TEST	50° x 45'	52° x 45'
		INNESTI	(%)	(%)	(%)
Barbera	du Lot	7700	1	92.2	-
Barbera	161-49	10000	ı	67	-
Barbera	Kober 5BB	250	50.8	53.6	65,4
Barbera	Kober 5BB	4000	68.3	65	-
Dolcetto	Kober 5BB	250	83.8	65.5	-
Dolcetto	Kober 5BB	300	48.8	52	44.8
Favorita	Kober 5BB	300	39	39	-
Freisa	Kober 5BB	600	65.1	50.2	-
Moscato b.	Kober 5BB	500	80.1	65	-
Moscato b.	Kober 5BB	200	41	47.5	49.5
Nebbiolo	Kober 5BB	700	51,4	52.3	-
Bosco	1103 P	250	31.3	61.6	-
Pigato	1103 P	1000	62	72.2	-
Rossese	1103 P	300	67.4	61.5	-

# STUDIO DELLA DIFFUSIONE DEI GIALLUMI DELLA VITE (FD E LN) SUL TERRITORIO REGIONALE, RINTRACCIABILITÀ DEL FITOPLASMA (FD).

Cristina Marzachì e Davide Pacifico

Istituto di Virologia vegetale, CNR, Strada delle Cacce, 73, I-10135 Torino

Attività di ricerca svolta nell'ambito del progetto finanziato dalla Regione Piemonte: "Studi sulla flavescenza dorata della vite e sul suo vettore Scaphoideus titanus: epidemiologia, diagnostica, prevenzione, contenimento".

Sottoprogetto "Monitoraggio dei giallumi della vite (FD e LN), rintracciabilità del fitoplasma (FD), analisi molecolari di verifica".

#### Istituzioni partecipanti:

Istituto di Virologia vegetale – CNR Torino, Di.Va.P.R.A., Entomologia e Zoologia applicate all'Ambiente "C. Vidano", Facoltà di Agraria, Università di Torino, Settore Fitosanitario - Regione Piemonte

#### Ricercatori e personale tecnico coinvolto:

Boarino A., Boccardo G., Bosco D., D'Aquilio M., Gotta P., Loria A., Margarina P., Marzachì C., Mason G., Morone C., Pacifico D., Palermo S., Palmano S., Tedeschi R., Turina M., Veratti F., Vischi A.,

FD rappresenta un grave problema per la viticoltura piemontese dal 1998, ma la gravità del suo impatto era già ampiamente nota a seguito delle numerose segnalazioni della malattia in altre regioni vitivinicole italiane e, prima ancora, francesi (1). FD è causata da un fitoplasma, "Candidatus Phytoplasma vitis" ampiamente diffuso anche nelle regioni vitivinicole francesi (2), spagnole (3), svizzere (4) e serbe (5). Recentemente sono state registrate numerose segnalazioni di intensi sintomi associati a fitoplasmosi in vigneti di zone geografiche dove sia FD che il suo vettore sono assenti. Nella maggior parte di questi casi i sintomi sono causati dal fitoplasma noto come "Candidatus Phytoplasma solani" che, in vite, causa una malattia nota, in Italia, come Legno Nero (LN).

I fitoplasmi sono parassiti intracellulari localizzati in maniera specifica nel floema della pianta dove vengono iniettati direttamente dagli insetti vettori durante la nutrizione. Al microscopio elettronico i fitoplasmi hanno morfologie variabili da rotondeggianti a filamentoso-pleomorfiche con diametri medi che variano da 200 a 800 nm (6). I fitoplasmi mancano di parete cellulare e sono circondati solo dalla membrana cellulare, pertanto essi sono sensibili solo agli antibiotici del tipo delle tetracicline, che agiscono a livello di sintesi proteica e non di quella della parete (7). Non sembra che la pianta ospite sia in grado di riconoscere la presenza del patogeno e di dare quindi inizio ad una reazione difensiva, benchè, nel caso della vite, la sensibilità all'infezione sia espressa diversamente a seconda del vitigno e, probabilmente, dell'età della pianta al momento dell'infezione.

In seguito alle prime segnalazioni di FD in Piemonte si è resa necessaria un'accurata mappatura delle fitoplasmosi presenti nei vigneti della Regione. E' risultato subito chiaro che la scarsa concentrazione dei fitoplasmi e la loro localizzazione erratica nel floema della vite infetta rappresentavano un serio ostacolo per una diagnosi sensibile e corretta. E' stato quindi necessario definire un protocollo diagnostico efficace per la diagnosi e la caratterizzazione delle fitoplasmosi della vite. Questo protocollo è stato definito nell'ambito di un ring test che ha raccolto i principali laboratori pubblici di ricerca interessati alla diagnosi del fitoplasma responsabile di FD (FDP, 8). Il protocollo, basato sulla tecnica di amplificazione genica nota come PCR, permette di ottenere risultati altamente affidabili con un notevole livello di sensibilità, ma comporta un elevato dispendio di tempo e richiede inoltre notevole lavoro da parte di operatori altamente specializzati.

La disponibilità di un protocollo diagnostico ha permesso di effettuare un'iniziale mappatura delle fitoplasmosi presenti nei vigneti sintomatici (9) e ha quindi chiarito che FDP

era l'agente responsabile della sintomatologia. Fra il 2000 ed il 2001, l'analisi è stata estesa progressivamente ai comuni adiacenti e ad altre province, con il chiaro intento di seguire l'estendersi della FD nell'areale vitivinicolo piemontese. Nel 2000 inoltre si è effettuata anche una valutazione dell'incidenza di LN nelle viti sintomatiche. Tale analisi ha confermato la presenza di questo fitoplasma in alcune viti sintomatiche, benchè con numeri scarsi, confermando che, nella maggior parte dei casi, la malattia era effettivamente FD. Sono stati anche effettuati numerosi tentativi per definire strategie diagnostiche alternative alla metodica suggerita dal Ministero che rappresentava una vera strettoia all'analisi dei numerosi campioni in arrivo dalle diverse realtà produttive della Regione. Nel corso degli anni sono stati ottimizzati e pubblicati metodi diagnostici alternativi, basati su reagenti molecolari e procedure diverse per il rilevamento di FDP ed anche di LNP (10, 11), con efficienze comprese tra 1'80 ed il 90 % delle viti infette. Tali protocolli hanno permesso di procedere più rapidamente nell'ottenimento e diffusione degli esiti diagnostici. I diversi approcci diagnostici sono poi stati utilizzati per fornire indicazioni utili per rintracciare il fitoplasma nelle piante con sintomi ad inizio stagione. Sono state fornite dunque indicazioni operative molto dettagliate per il riconoscimento della malattia in fase molto precoce, con evidente impatto nella sua gestione epidemiologica (12). L'esperienza maturata nella diagnosi delle fitoplasmosi nella vite è risultata utile anche nell'applicazione delle diverse procedure diagnostiche per determinare l'infettività delle popolazioni di insetti vettori (13).

La caratterizzazione fine dei fitoplasmi FDP presenti in viti provenienti da diverse aree del Piemonte ha chiarito che nei primi anni di analisi l'epidemia era associata prevalentemente all'isolato FDP di tipo -C, mentre, nelle altre regioni vitivinicole italiane, l'ampelopatia era stata associata alla presenza dell'isolato -D del fitoplasma. Nel 2003 FDP-D è stato ritrovato per la prima volta in alcune viti sintomatiche presenti nella zona del Novarese e, negli anni successivi, altri isolati di tipo -D sono stati caratterizzati in viti sintomatiche provenienti anche da altre zone infette della Regione (26 % e 27 % dei campioni analizzati rispettivamente nel 2004 e nel 2005). In entrambi gli anni si è riscontrata anche la presenza di un esiguo numero di isolati con profilo misto tra i 2.

Il gran numero di dati diagnostici ottenuti nel corso degli anni ha inoltre evidenziato la costante presenza di LNP in viti con sintomi di fitoplasmosi (49 %, 21 % e 47 % negli anni 2004, 2005 e 2006, rispettivamente). Tale presenza, quando è stata analizzata con maggior dettaglio ha confermato che LNP era il fitoplasma maggiormente presente nelle zone di minor presenza di FD (province di Torino, Novara, Vercelli), ed era invece minoritario nelle zone colpite seriamente da FD. Inoltre i due fitoplasmi possono presentarsi in infezione mista in alcuni campioni (2 % sul totale dei campioni sintomatici nel 2006).

Due principali popolazioni di fitoplasmi agenti eziologici di LN sono stati identificati nelle aree vitivinicole tedesche e caratterizzati dal punto di vista biologico da una diversa specificità di ospite erbaceo. A partire dal 2004, le popolazioni di LNP presenti in Piemonte sono state caratterizzate utilizzando il metodo descritto in Germania (14), ed un nuovo metodo più sensibile, sviluppato nel corso del 2005 (15). Questa analisi ha permesso di chiarire che anche in Piemonte esistono i 2 isolati di LN descritti in Germania e che la maggiore variabilità è presente nella popolazione di LNP piemontese associata al convolvolo.

#### **BIBLIOGRAFIA CITATA**

- 1. Caudwell A. (1957). Ann. Amel. Pl. 12, 359-393.
- 2. Boudon Padieu E. (2003). Proceedings of the 14<sup>th</sup> Meeting of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of Grapevine, Locorotondo Bari, Italy, pp. 47-53.
- 3. Batlle A., Martinez M.A., Lavina A. (2000). European Journal of Plant Pathology 106(9), 418-421
- 4. Gugerli P., Besse S., Colombi L., Ramel M.-E., Rigotti S. Cazelles O. (2006). Swiss vineyards. XVth ICVG, Stellenbosch, South Africa, 3-7 April, 96-98.
- 5. Duduk B., Botti S., Ivanović M., Krstić B., Dukić N., Bertaccini A. (2004). *Journal of Phytopathology* 152, 575-579
- Kirkpatrick B. C. (1991). *The Prokaryotes*, pp. 4050-4067. Edited by A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder & K. H. Schliefer. New York, USA: Springer-Verlag Press.
- 7. Doi M., Teranaka M., Yora K. & Asuyama R. (1967). *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 33, 259-226.
- 8. Pasquini G., Angelini E., Benedetti R., Bertaccini A., Bertotto L., Bianco P.A., Faggioli F., Martini M., Marzachì C., Barba M. (2001). *Atti Progetto POM A32* "Norme fitosanitarie commercializzazione delle produzioni vivaistiche", 921-940.
- 9. Marzachì C., Boarino A., Vischi A., Palermo S., Morone C., Loria A., Boccardo, G., 2001. Informatore fitopatologico 9: 58-63.
- 10. Marzachì C., Palermo S., Boarino A., Veratti F., d'Aquilio M., Loria A., Boccardo G. 2001. Vitis, 40(4).
- 11. Marzachì C., Veratti F., d'Aquilio M., Vischi A., Conti M., Boccardo G., 2000. Journal Plant Pathology, 82(3):201-212.
- 12. Morone C., Gotta P., Marzachì C. 2001. L'Informatore Agrario, 57(17):83-86.
- 13. Bosco D., Palermo S., Mason G., Tedeschi R., Marzachi' C., Boccardo G. 2002. Molecular Biotechnology, 22:9-18.
- 14. Langer M., Maixner M. (2004). Vitis 43(4), 191-200.
- 15. Pacifico D., Cimerman A., Marzachì C. and Foissac, X. (2006). Proceeding of the 16th IOM Meeting, Cambridge, England, p. 122.

## SINTOMATOLOGIA DEI DIVERSI VITIGNI PIEMONTESI E SUA DINAMICA NELLA STAGIONE VEGETATIVA.

Chiara Morone Settore Fitosanitario, Regione Piemonte

#### Titolo del progetto

Studio della diffusione di flavescenza dorata (FD) sul territorio regionale, caratterizzazione sintomatologica dei diversi vitigni piemontesi, miglioramento e semplificazione delle metodiche diagnostiche di laboratorio.

Istituzioni partecipanti:

Istituto di Virologia vegetale – CNR Torino, Cadir-Lab, Tecnici consulenti per Misura F1 del P.S.R., Settore Fitosanitario - Regione Piemonte

Ricercatori coinvolti: Boarino, A., Boccardo G., D'Aquilio M., Loria, A., Marzachì, C., Morone C., Pacifico D., Palmano S., Turina M., Veratti F., Vischi, A.

Per la flavescenza dorata (FD) e per i giallumi della vite in genere sono comunemente descritti i sintomi estivi perché normalmente è quello il periodo in cui la malattia inizia a manifestarsi. In Veneto documentavano la comparsa precoce della fitoplasmosi mediante anomalie dei giovani germogli solo alcuni anni dopo l'esplosione epidemica della malattia (Borgo M., 1998). L'epidemia di FD in Piemonte invece si è subito manifestata con una sindrome precoce di germogliamento irregolare (Morone *et al.*, 2000) per cui si è dovuto approfondirne la correlazione.

Grazie alle osservazioni condotte su un grande numero di campioni descritti ed analizzati con metodi biomolecolari è stato possibile dimostrare che il germogliamento irregolare è correlato significativamente alla presenza del fitoplasma della FD, mentre questa sindrome non sembra essere associata al rinvenimento del fitoplasma del legno nero (LN) (Morone *et al.*, 2004, Borgo M. *et al.*, 2006). Per la manifestazione estiva, la contemporanea presenza di almeno 3 sintomi specifici per fitoplasmi è risultata assai indicativa dell'infezione di FD, infatti ben nel 75% dei casi la diagnosi effettuata dai tecnici in campo su base esclusivamente sintomatica entro fine luglio è stata confermata dall'analisi molecolare. Anche nel 2006, anno caratterizzato da un notevole rinvenimento di LN nell'albese, se si considerano i campioni analizzati entro il 31 luglio, dei 96 campioni con almeno 3 dei sintomi fitoplasma specifici 75 sono risultati positivi a FD, 13 negativi, 7 positivi a LN, 1 infezione mista.

Le variazioni di sintomi tra i vitigni piemontesi risultano ininfluenti ai fini del riconoscimento se si adotta il metodo basato sulla contemporanea presenza di tre sintomi su una rosa di 9 nel caso della sindrome precoce di germogliamento irregolare (germogli con numero inferiore di internodi, internodi raccorciati e/o disposti a zig-zag, foglie di dimensioni inferiori, bollosità della lamina fogliare per sviluppo ridotto delle nervature, disseccamento basipeto del germoglio, ripiegamento infero della lamina fogliare, inserzione più acuta della lamina sul picciolo, filloptosi anticipata, corteccia imbrunita nella parte interna a contatto col legno) e su una rosa di 10 nel caso della manifestazione di piena estate (tracce del germogliamento irregolare, femminelle stentate come i germogli in primavera, arrossamenti e/o ingiallimenti attorno alle nervature, disseccamento delle infiorescenze o dei grappoli in allegagione, arrossamenti o ingiallimenti di settori di foglia delimitati dalle nervature principali, distacco anticipato delle lamine fogliari con o senza picciolo, appassimento parziale o totale del grappolo, consistenza gommosa del germoglio o lignificazione difettosa, ispessimento della lamina fogliare).

Solitamente ciò che può variare nei vitigni è la colorazione: sfumature del rosso, del giallo o di entrambi , e la predisposizione o meno a manifestare sulle foglie le colorazioni perinervali o settoriali tanto utili al riconoscimento. I vitigni per cui non è frequente la

manifestazione di questi due sintomi presentano qualche difficoltà in più al riconoscimento della fitoplasmosi ma solo perché la rosa di sintomi utili da 10 si riduce a 8, o a volte l'alterazione di colore c'è ma è difficile riconoscerne la distribuzione perinervale o settoriale. Di tutti i vitigni connotabili come piemontesi, in cui è stato rintracciato il fitoplasma di FD, gli unici per cui possono esserci queste difficoltà di riconoscimento sono: Erbaluce, Malvasia di Casorzo, Moscato, Nebbiolo, Uva Rara. A complemento quelli che non presentano difficoltà sono : Albarossa, Barbera, Bonarda piemontese, Brachetto, Cortese, Croatina, Dolcetto, Favorita, Freisa, Grignolino, Neretta cuneese, Ruchè, Uva rara, Vespolina. Varietà che non presentano difficoltà di riconoscimento ma in cui al momento è stato rintracciato solo il fitoplasma del legno nero sono: Doux d'Henry, Fumin, Neretto di Bairo, Quagliano.

#### **BIBLIOGRAFIA CITATA:**

BORGO M., 1998. Riconoscimento di viti affette da malattie da fitoplasmosi. L'informatore Agrario, 24:51-63

BORGO M., BELLOTTO D., FILIPPIN L., ANGELINI E., 2006. Sintomi e prima diagnosi dei giallumi della vite. L'informatore Agrario, 27: 53-56

MORONE C., GOTTA P., BOCCARDO G., 2000. Sintomi di Fitoplasmi in Vitigni coltivati in Piemonte. L'Informatore Agrario, 23: 69-77

MORONE C., D'AQUILIO M., VERATTI F., MARZACHI' C., 2004. Diagnosi di flavescenza dorata: sintomi e analisi molecolare. Informatore fitopatologico, 4, 20-23

#### SEMPLIFICAZIONE DELLE METODICHE DIAGNOSTICHE DI LABORATORIO.

M. Turina, P. Margarina, C. Marzachi' e S. Palmano Istituto di Virologia vegetale, CNR, Strada delle Cacce, 73, I-10135 Torino

Attività di ricerca svolta nell'ambito del progetto finanziato dalla Regione Piemonte: "Studi sulla flavescenza dorata della vite e sul suo vettore Scaphoideus titanus: epidemiologia, diagnostica, prevenzione, contenimento".

Sottoprogetto "Predisposizione di antisieri per il rilevamento di FDP".

#### Introduzione

La diagnosi delle malattie da fitoplasmi è da sempre risultata alquanto complessa, soprattutto se paragonata a quella riguardante altri patogeni. Le difficoltà principali sono legate alle particolari caratteristiche di questi microrganismi, quali la non coltivabilità in coltura in vitro, la loro non abbondante presenza nei tessuti vegetali (in particolare limitatamente al floema), e la solo recente definizione di alcuni caratteri molecolari distintivi. In particolare, per i fitoplasmi della vite, si aggiunge la presenza di forti inibitori della DNA polimerasi Taq, che rende difficile la diagnosi mediante PCR.

Il protocollo correntemente usato, prevede una laboriosa estrazione degli acidi nucleici, e una doppia reazione PCR (nested) che assicura un'altissima sensibilita' al metodo, ma che lo rende inapplicabile per analisi massali. A questo propoposito, la Regione Piemonte ha deciso di finanziare una attivita' di ricerca al fine di aggiornare e semplificare i vari protocolli possibili per la diagnosi dei giallumi causati da fitoplasmi nella vite.

Come possibili sviluppi per la diagnostica di FD piemontese in vite, si è quindi pensato a due approcci. Il primo riguarda la predisposizione di antisieri per il rilevamento di FDP (approccio sierologico) al fine di mettere a punto saggi di tipo immunologico specifici per questo isolato.

Come secondo approccio, si è pensato allo sviluppo di metodiche molecolari alternative di diagnosi, che possano semplificare il metodo comunemente utilizzato (che richiede un notevole impegno in termini di personale e tempo), mantenendone la sensibilità e la ripetibilità.

#### Risultati complessivi dei tre anni di attività

#### 1. Valutazione degli anticorpi commerciali per la diagnosi FD

E' stata eseguita una serie di test ELISA con nuovi reagenti forniti dal collaboratore francese Sam Seddas dell'Istituto "Jules Guyot de la vigne et du vin" di Digione, che ha contribuito direttamente alla messa a punto del kit diagnostico. In questo caso, si è osservata una buona reazione con i campioni di controllo positivo di FD su *Vinca*, ma nessuna vite piemontese inserita nel saggio, che aveva dato un buon risultato in PCR diretta, è risultata positiva al controllo effettuato a novembre. Questa osservazione ha indotto a pensare che il kit messo a punto per l'isolato francese non sia adatto per la diagnosi dell'isolato italiano, presumibilmente diverso a livello antigenico.

### 2. Identificazione di cloni di interesse al fine di esprimere in vitro proteine di FD piemontese da utilizzare per preparazione di antisieri policionali specifici per FD.

Mediante approcci diversi sono state identificate 2 proteine specifiche di FD piemontese: Ala-tRNA sintasi e gliceraldeide-3-fosfato-deidrogenasi (GAP-A), una abbondante proteina necessaria per il metabolismo dei carboidrati che risulta essere un buon candidato come proteina da utilizzare a fini diagnostici.

Ala-tRNAsintetasi e GAP-A sono state clonate in vettori di espressione e le proteine ricombinanti corrispondenti sono state prodotte in batteri. Dopo purificazione e

somministrazione come antigeni a conigli, si e' valutata la reazione specifica con gli antisieri ottenuti.

Si e' constatata la possibilità di evidenziare bande specifiche corrispondenti ai pesi molecolari ipotizzati nei controlli malati (vinche infette da FD). Tuttavia, allo stato attuale, tali anticorpi non sembrano essere utilizzabili per studi di carattere diagnostico.

Come prospettiva futura, si faranno ulteriori tentativi per il clonaggio del gene AMP, che produce una abbondante proteina di rivestimento, spesso utilizzata per studi di carattere diagnostico.

#### 3. Messa a punto di un metodo semplificato per la diagnosi di FD mediante Reverse-transcriptase-PCR

Un primo approccio ha previsto l'utilizzo di un metodo a partire da foglie di vite intera (e non da nervature) e di estrazione in sacchetto ELISA (e non in mortaio) in un tampone a base di Guanidina Isotiocianato e con un passaggio su colonne Qiagen per la separazione degli RNA. Si sono avuti risultati positivi nelle successive fasi di RT-PCR utilizzando oligonucleotidi specifici per i fitoplasmi del gruppo V.

E' stato poi messo a punto un protocollo che prevede una ulteriore semplificazione: il metodo di estrazione prevede un'unica fase di spremitura di campioni in sacchetti per ELISA, e l'utilizzo diretto di tale succo per una RT-PCR in tubo unico usando l'enzima *AmpliTaq* (*Applied BioSystems*).

I risultati ottenuti con tale metodo su oltre 200 campioni di vite (analizzati in doppio foglia/nervatura) sono stati paragonati a quelli forniti dal metodo classico. In generale si è osservata una buona corrispondenza di risultati, rilevando comunque la presenza di positivi/negativi e viceversa.

Per quanto riguarda la comparazione dei risultati ottenuti col nuovo metodo in parallelo da foglia e da nervatura, si è rilevata una buona corrispondenza, addirittura del 100% nelle ultime analisi effettuate; inoltre, le amplificazioni da foglia hanno dato risultati migliori (bande più intense). Ripetendo l'analisi per alcuni campioni risultati positivi a distanza di una settimana, da materiale vegetale conservato in camera fredda, l'amplificazione ha confermato comunque la positività per FD. Utilizzando come templato l'omogenato ottenuto nella prima fase di estrazione conservato a basse temperature (-20 e -80 °C) l'amplificazione ha dato anche in questi i casi un risultato positivo, ma tendenzialmente di intensità più debole.

Nell'anno successivo si e' proceduto alla messa a punto di un protocollo simile adattato pero' alla diagnosi anche del Legno Nero. Iniziali tentativi di utilizzo di RT-PCR diretta hanno dimostrato una bassa sensibilita' del metodo che e' stata aumentata aggiungendo un seconda PCR sui prodotti di reazione della prima PCR (mantenendo pero' invariato il protocollo semplificato di estrazione del campione).

Un' ulteriore semplificazione per l'analisi di FD e' stata apportata al protocollo di RT-PCR, con la sintesi di primer e sonda Taqman da utilizzare in riverse transcriptase-Real time-PCR (RT-R-PCR). Confronti con il metodo che utilizza RT-PCR tradizionale hanno dimostrato un aumento della sensibilita', con la possiblita' di quantificazione del fitoplasma nel campione e l'eliminazione della fase di corsa elettroforetica dei campioni, riducendo ulteriormente i tempi di analisi, senza intaccare sensibilita' e specificita' del metodo.

Con questi ulteriori affinamenti, si e' riusciti ad ottenere una buonissima correlazione tra referibilita' dei sintomi e diagnosi di FD o LN, anche in barbatelle campionate alla fine della stagione vegetativa.

Si tenteranno di apportare ulteriori miglioramenti, tentando di adattare un protocollo RT-R-PCR anche per LN, e di migliorare la selezione del materiale per la rappresentativita' del campione (si sono ottenuti dati iniziali incoraggianti che utilizzano solo piccioli fogliari, facili da campionare e con un aumento notevole nel numero di essi che e' possibile includere nel campione per l'estrazione).

### STUDIO DELL'EPIDEMIOLOGIA DELLA MALATTIA E DELLA SUA DINAMICA NEL TEMPO, RECOVERY.

Morone C. – Settore Fitosanitario, Regione Piemonte

Attività di ricerca: Studio dell'epidemiologia della malattia e della sua dinamica nel tempo.

*Istituzioni partecipanti al progetto*: Istituto di Virologia vegetale – CNR Torino, Cadir-Lab, Tecnici consulenti per Misura F1 del P.S.R..Settore Fitosanitario - Regione Piemonte, Università Cattolica S. Cuore di Piacenza - Istituto di Entomologia e Patologia vegetale.

Ricercatori coinvolti: Boveri M., Giosuè S., Gotta P., Marzachì M., Morone C., Rossi V.

Già a fine estate 1998 parte l'indagine "viti segnate": tale proposta del Settore Fitosanitario Regionale, raccolta da operosi tecnici dell'Alessandrino, era nata con il semplice intento di valutare la relazione tra il mancato germogliamento e gli altri sintomi di tipo fitoplasmatico che all'epoca non erano ancora convalidati da un rappresentativo numero di analisi. Questo sforzo iniziale dei tecnici ha permesso di espandere l'indagine trasformandola in un archivio di dati epidemiologici che, pur nascendo come iniziativa estemporanea e volontaria, ha prodotto le informazioni di seguito riportate e molte altre, utili per comprendere e limitare il fenomeno flavescenza in Piemonte.

Mediante il progetto, è stato studiato per 5 anni consecutivi (1999 – 2003) l'andamento dei sintomi in circa 200 viti di 7 vigneti, in cui la malattia è stata identificata ogni anno come FD-C con saggi molecolari, ed in cui non si è mai registrata la presenza di LN. In particolare, ogni anno sono stati misurati i seguenti parametri: numero di piante al primo anno di espressione sintomatologica, numero totale di piante sintomatiche, numero di piante in remissione dei sintomi; numero di piante sane, resa produttiva delle piante sane, malate e di quelle in remissione sintomatica con particolare attenzione alla durata del "recovery" (remissione spontanea dei sintomi), ed andamento della popolazione del vettore. I dati raccolti sono stati utilizzati per calcolare ogni anno gli indici relativi al tasso d'infezione (cioè il numero delle piante neo-sintomatiche dell'anno diviso il totale delle sintomatiche in almeno uno degli anni precedenti) ed a quello di remissione (cioè il numero delle piante in remissione nell'anno diviso il totale delle sintomatiche in almeno uno degli anni precedenti) e questi sono stati correlati al numero medio di individui di *Scaphoideus titanus* catturati nelle trappole localizzate all'interno di ogni vigneto; inoltre sono state identificate le equazioni che meglio descrivono le relazioni trovate.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che, a partire dal primo anno di applicazione dei trattamenti insetticidi, il tasso di infezione si è ridotto, mentre quello di "recovery" è aumentato. I vitigni presenti nei 7 vigneti, Dolcetto, Barbera, Bonarda piemontese e Cortese hanno manifestato una buona attitudine alla remissione dei sintomi, caratteristica che era nota solo per il Barbera.

Una chiara correlazione positiva è stata rilevata tra le catture di *S. titanus* dell'anno precedente ed il tasso d'infezione (R2=0.96), confermando che la maggior parte delle infezioni di FD ha una latenza di circa 1 anno, ma un certo numero di infezioni richiedono una latenza maggiore prima della comparsa dei sintomi.

Una chiara correlazione negativa (R2=0.92) è stata invece trovata tra le catture di *S. titanus* dell'anno precedente ed il tasso di "recovery". Questo raggiunge un valore massimo nei diversi anni di circa 0.7 (valore medio dell'anno tra i 7 vigneti) e ciò indica che dopo 5 anni sono ancora presenti piante con sintomi. Il risultato sottolinea l'importanza delle reinoculazioni delle viti da parte di vettori che siano sfuggiti alla lotta insetticida o che siano rientrati nel vigneto dopo il trattamento. In sostanza emerge l'importanza del contenimento dell'insetto vettore anche ai fini della remissione spontanea. Poiché in ogni anno si è sempre verificata la contemporanea presenza di viti con sintomi e di vettori, le re-inoculazioni hanno ostacolato i fenomeni di "recovery".

Le viti in "recovery" hanno avuto una produzione significativamente inferiore rispetto a quelle sane, ma comunque superiore a quella delle piante sintomatiche ed indipendente dalla durata del "recovery", almeno fino ai 5 anni considerati.

I risultati indicano che, nella realtà piemontese una minima presenza di vettore riduce il potenziale effetto risanante del "recovery". L'interessante prestazione produttiva delle viti in "recovery" è comunque molto incoraggiante. Trattamenti insetticidi rivolti alla riduzione della popolazione di *S. titanus* o alla riduzione della sua capacità di trasmissione di FD in vigneti costituiti da vitigni con elevate potenzialità di "recovery" rappresentano un possibile approccio per tenere sotto controllo un'ampelopatia che assume in alcune aree del Piemonte sempre più l'aspetto di una malattia endemica.

# COLTURE IN VITRO PER LA PREDISPOSIZIONE DI FONTI CERTE DI FLAVESCENZA DORATA E DI MATERIALE SANO.

Ivana Gribaudo

Istituto di Virologia vegetale – CNR – Unità di Grugliasco, Via Leonardo da Vinci, 44 – 10095 Grugliasco (TO)

Attività di ricerca svolta nell'ambito del progetto finanziato dalla Regione Piemonte: "Studi sulla flavescenza dorata della vite e sul suo vettore *Scaphoideus titanus*: epidemiologia, diagnostica, prevenzione, contenimento".

Sottoprogetto "Predisposizione di fonti certe di FD e produzione di viti in vitro".

Responsabile: Ivana Gribaudo

Collaboratori: Giorgio Gambino, Danila Cuozzo

Questo sottoprogetto si proponeva 2 obiettivi principali:

- 1) la produzione di piante di vite micropropagate sicuramente sane, disponibili per le necessità sperimentali di altre unità operanti nell'ambito del medesimo progetto;
- 2) la realizzazione di uno stock di piante di vite coltivate *in vitro* in cui il fitoplasma agente della Flavescenza dorata (FD) fosse presente e conservato attraverso le subcolture necessarie nel tempo.

Il primo obiettivo è stato ottenuto moltiplicando *in vitro* linee clonali di Barbera, cultivar particolarmente sensibile ai fitoplasmi e quindi adeguata per studi di trasmissione del patogeno. La micropropagazione è stata realizzata a partire da talee apicali (3-4 nodi, circa 5 cm), prelevate da piante madri mantenute *in vitro* ed esenti dalle principali malattie virali e da fitoplasmi. Una volta raggiunto uno stock di piante *in vitro* ritenuto congruo, si è proceduto all'ottenimento di piante radicate: in questo caso le talee apicali sono state indotte a radicare in pastiglie di torba e quindi gradualmente acclimatate alle condizioni *ex vitro*. Le viti in vaso sono state successivamente allevate in serra fino al raggiungimento di dimensioni adeguate al loro utilizzo per le successive sperimentazioni.

Complessivamente sono state prodotte per micropropagazione oltre 400 piante di Barbera. A queste vanno aggiunte altre 100 piante ottenute dall'allevamento in vaso di barbatelle di Barbera (materiale clonale sicuramente sano) per le esigenze immediate del primo periodo di sperimentazione.

E' inoltre ipotizzabile l'utilizzo di antibiotici nel substrato di coltura: per altre specie infatti l'addizione di oxitetraciclina ai substrati ha dato ottimi risultati di risanamento. In quest'ottica sono state avviate le prime prove per definire la concentrazione di oxitetraciclina tollerabile dalla pianta di vite *in vitro*. I germogli coltivati su substrati con 100 mg/l di antibiotico non sono sopravvissuti, a differenza della maggior parte di quelli sottoposti alla dose di 50 mg/l. Questa indicazione potrà essere utile per definire un protocollo di micropropagazione avente una ottimale capacità di eradicazione del fitoplasma della FD.

Per quanto riguarda il secondo obiettivo, il punto di partenza è stata la potenziale utilità di un sistema di conservazione *in vitro* di singoli isolati di fitoplasmi, date le difficoltà incontrate nella trasmissione *in vivo*, la disomogeneità di distribuzione nella pianta e le fluttuazioni stagionali frequentemente rilevate nella diagnosi. La micropropagazione di piante infette da fitoplasmi è stata realizzata per alcune specie ospiti di questi patogeni; per la vite e

per i fitoplasmi ad essa legati, in particolare FD e Legno Nero (LN), le sperimentazioni sono state finora scarse e con risultati incerti.

Nei primi due anni di attività sono state poste in coltura *in vitro* oltre 550 gemme di vite, provenienti da piante individuate in campo come sintomatiche e saggiate con esito positivo per la presenza di fitoplasmi. Le gemme ascellari sono state prelevate, sterilizzate superficialmente e coltivate *in vitro* su substrati contenenti citochinine. Una parte delle colture non si sono sviluppate principalmente a causa dei fisiologici inquinamenti del materiale proveniente da campo; quelle rimanenti hanno originato germogli che sono stati micropropagati individualmente, ottenendo complessivamente oltre 200 linee ognuna derivante da una singola gemma.

I risultati delle analisi effettuate nel 2004 e nel 2005 sul materiale descritto hanno indicato l'assenza di FD in tutte le piante saggiate e la presenza di LN in alcuni dei campioni analizzati. Non è stato possibile collegare in modo significativo la zona di inserimento della gemma originaria sul germoglio o del germoglio sul ceppo con la successiva presenza o assenza del fitoplasma del LN. In alcuni casi linee risultate inizialmente positive per LN hanno dato risultato negativo ad un secondo saggio effettuato alcuni mesi dopo. Neppure l'anticipo della data di prelievo e l'utilizzo di substrati privi di citochinine hanno permesso di ottenere piante infette da FD.

Dopo due anni di esperienze sembra appurato che la micropropagazione a partire da piante infette di vite non sia uno strumento adatto per il mantenimento *in vitro* di una fonte pura di fitoplasmi agenti di FD. Le cause potrebbero essere riconducibili ad una accentuata disformità di distribuzione dell'agente patogeno nella pianta (ed in particolare nelle gemme) e/o alla difficoltà da parte del fitoplasma di replicarsi all'interno di piante di vite micropropagate. L'infezione da LN in viti *in vitro* sembra essere più persistente; tuttavia il titolo del patogeno nei tessuti dell'ospite non è mai risultato elevato e questo costituisce un ostacolo oggettivo all'utilizzo di tali colture come fonte di materiale infetto per le esigenze della sperimentazione.

Per cercare una soluzione alternativa a tale problema e sulla base della letteratura scientifica, sono state avviate colture in vitro a partire da piante di fava e di Catharanthus roseus infette da FD. Le colture di fava sono state allestite su un substrato specifico e senza grossi problemi per quanto riguarda gli inquinamenti iniziali, ma i germogli coltivati in vitro sono gradualmente degenerati mostrando accentuate necrosi dei tessuti. Anche le piante madri di fava infette, coltivate in serra, hanno mostrato sintomi analoghi e sono morte nell'arco di alcune settimane. Conseguentemente l'attenzione è stata rivolta alla coltura in vitro di C. roseus, anche sulla base di referenze positive presenti in letteratura. La micropropagazione di piante sane non presenta problemi, come accertato preliminarmente, sia in fase di moltiplicazione che di radicazione. Per la coltura di C. roseus infetto da FD è stato necessario diminuire il contenuto in citochinine del substrato di partenza. I primi risultati indicano una correlazione negativa tra la gravità dei sintomi delle piante madri e il vigore delle colture in vitro da esse ottenute. Si sta cercando di individuare uno stadio di infezione tale da garantire una significativa presenza di fitoplasmi nei tessuti ma al tempo stesso permettere di ottenere da tali piante colture in vitro capaci comunque di una crescita apprezzabile. Le prove sono ancora in corso e le prime linee presumibilmente infette sono in fase di moltiplicazione.

Se la sperimentazione finora svolta non ha permesso di ottenere linee *in vitro* di vite infette da FD, i risultati ottenuti indicano però la potenzialità di questo tipo di coltura per l'eradicazione del fitoplasma agente della Flavescenza.

## ENTI E TECNICI CHE HANNO COLLABORATO ALLA REALIZZAZIONE DEI PROGETTI DI RICERCA IN PIEMONTE

I progetti di ricerca finanziati dalla regione Piemonte realizzati nel periodo 1999/2006 sono stati realizzati anche con il contributo prezioso di numerosi tecnici che hanno in vario modo collaborato alla raccolta delle informazioni di campo.

#### Il Gruppo di Lavoro sul deperimento delle viti nell'Alessandrino:

Tecnici delle organizzazioni professionali che hanno collaborato all'indagine "viti segnate" (effettuando gli innumerevoli rilievi di campo):

Davide Ferrarese, Sonia Panattieri, Massimiliano Carbonera e Claudia Ferrari dell'Unione Agricoltori di Alessandria.

Sonia Perico, Fabrizio Bullano, Fausto Campetti e Alessandro Bonelli del CIPA-AT di Alessandria.

Alberto Pansecchi, Pierluigi Semino, Giovanni Bobbio, Cristina Bistolfi, Andrea Barison, Alessandra Bidone, Sergio Pavese, Michele Scarabello della Coldiretti di Alessandria.

Davide Benzi, Marco Boveri, Giuseppe Lanzavecchia del Cadir-Lab

#### Per i prelievi di campioni da analizzare e la raccolta delle informazioni di campo:

Valeria Pallavolo, Alberto Pansecchi, Cantamessa Barbara - Coldiretti Alessandria

Daniele Ravetta, Fabrizio Bullano- CIA di Alessandria

Mirko Giacobbe - Cantina Sociale Tre Castelli

Alessio Monti – Unione di Alessandria

Marco Boveri, Danila Valentino – Cadir-Lab

Anna Guercio, Elsa Soave, Brovero Ernesto, Piero Tarasco, Fulvio Terzolo - CIA di Asti

Piero Bosca, Mauro Bastita, Marino Antonio, Luca Maggiorotto, Giulia Nivolo, Anziano

Pierpaolo, Raffaella Mirandola, Silvia Binello, Emiliana Casalegno - Coldiretti di Asti

Massimo Vecchiattini - Cantina Sociale di Castelboglione

Carlo D'Angelone - Cantina Sociale di Ricaldone

Flavio Dacomo, Edoardo Schellino, Mauro Drocco, Gian Antonio Famà, Facello, Giuseppe Vivalda, Piero Battaglio, Diego Scavino, Andrea Ferrero, Vittorio Stecca, Massimo Testa-Coldiretti di Cuneo

Roberto Abellonio - Unione di Cuneo

Alberto Marchisio – Cantina Terre del Barolo

Stefano Moro, Annamaria Baldassi – Provincia di Biella

Andrea Agnès, Graziano Caielli, Nunzia Monte - Provincia di Novara

Luca Cavallo, Raffaella Pressenda, Carolina Ossola – Provincia di Torino

Emanuela Massarenti – Cia di Torino

Emanuela Fassio, Giuseppe Arbrile, Giuseppe Carra - Coldiretti di Torino

Paolo Aiassa - Cantina Sociale Castelnuovo Don Bosco

Daniele Della Valle, Gabriella Sanlorenzo, Luciano Laiolo, Michele Vigasio, Carlo Borsani - Vignaioli Piemontesi

Roberto Abate, Adelfio Gandini, Maresa Novara, Daniela Serra, Daniele Eberle, Nicola Argamante, Flavio Bera, Davide Ferrari, Roberto Cresta, Marco Bottazzi, Paolo Ruaro, Massimo Pinna, Paolo Morando, Paolo Marin - tecnici liberi professionisti

#### Si ringraziano per la realizzazione degli atti:

Dario Lombardo, Ivan Albertin, Gabriella Galeotti.