Studi sui fattori che favoriscono le epidemie di flavescenza dorata in Piemonte e loro superamento – FLADO 2010-2013

Partecipanti:

- Settore Fitosanitario regionale (S.F.R.): Paola Gotta, Chiara Morone, Giovanni Bosio
- Istituto di Virologia Vegetale (I.V.V.) – C.N.R., Torino: Cristina Marzachì, Flavio Veratti, Luciana Galetto, Sabrina Palmano, Paolo Margarina – Sottoprogetti B-C
- Di.Va.P.R.A. Entomologia e Zoologia applicate all'Ambiente "Carlo Vidano", Università di Torino: Alberto Alma, Domenico Bosco, Federico Lessio, Luca Picciau,
- Istituto di Virologia Vegetale (I.V.V.) – C.N.R., Torino, Unità di Grugliasco (TO): Franco Mannini, Ivana Gribaudo, Giorgio Gambino Sottoprogetto F
- Pegaso Servizi Agroambientali: Ivan Albertin, Aurelio Del Vecchio, Paolo Dell'Olio
- Università Cattolica Piacenza, Facoltà di AGRARIA, Sede di Piacenza -Istituto di Entomologia e patologia vegetale: Vittorio Rossi, Simona Giosuè, Benedetta Girometta

Sottoprogetto B

Referente: Cristina Marzachì (I.V.V. – C.N.R.)

Quantificazione del fitoplasma della Flavescenza dorata in viti appartenenti a varietà a bacca bianca e caratterizzate da diversa sensibilità alla fitoplasmosi.

Nel mese di luglio dei tre anni (2010 – 2012), sono state campionate alcune piante delle cv Arneis e Timorasso, rispettivamente considerate molto e scarsamente sensibili alla Flavescenza dorata (FD). La conferma dell'infezione da FD in tutte le piante sintomatiche è stata ottenuta mediante PCR e successiva analisi del polimorfismo di restrizione degli ampliconi di PCR. I DNA estratti dalle piante infette da FDP in infezione singola e mista con LNP sono stati utilizzati come templato per quantificare il titolo del fitoplasma.

Il titolo del fitoplasma nelle viti infette è stato misurato come numero di cellule di FDP per ng di DNA di vite, come descritto in precedenza per le cv. Barbera e Nebbiolo. Il titolo di FDP nelle due cv nei diversi anni è variato, come descritto nella Tabella 1.

Cultivar	Anno	Cellule di FDP /ng DNA di vite (media) ± errore standard
Arneis	2010	3329 ± 1012,2
	2011	158 ± 123,5
	2012	297 ± 45,8
Timorasso	2010	2 ± 1,6
	2011	71 ± 17,9
	2012	679 ±243,8

Tabella 1. Titolo di FDP nelle cultivar Arneis e Timorasso analizzate negli anni 2010, 2011 e 2012

In entrambe le cv la concentrazione di FDP è variata nei tre anni. Nella cv Arneis il fitoplasma era più concentrato nel 2010 rispetto agli anni successivi, mentre nella cv Timorasso il numero di cellule di FDP è aumentato negli anni per raggiungere il valore massimo nel 2012. I risultati ottenuti hanno quindi evidenziato una diminuzione della concentrazione del fitoplasma in Arneis ed un aumento in Timorasso nei tre anni del Progetto. Un tale risultato non concorda con quanto rilevato nelle due cv a bacca rossa Barbera e Nebbiolo in cui, per i due anni della sperimentazione (2008 e 2009), si è rilevato una riduzione della quantità di fitoplasma. I risultati ottenuti confermano che la quantità di FD nell'Arneis e nel Timorasso può variare nelle piante infette in anni diversi, così come già dimostrato per due cv a bacca rossa. L'analisi condotta ha confermato una diversa

capacità delle due cv di sostenere la moltiplicazione del fitoplasma, benchè le differenze si siano dimostrate meno evidenti di quelle misurate tra Barbera e Nebbiolo.

Mappatura di Flavescenza dorata.

Il monitoraggio su base sintomatica e la mappatura di uno stesso vigneto per due anni consecutivi (2011 e 2012) hanno indicato un aumento delle nuove piante infette (da 2,4% nel 2011 a 3,5% nel 2012) (Figura 1).

2011	2012

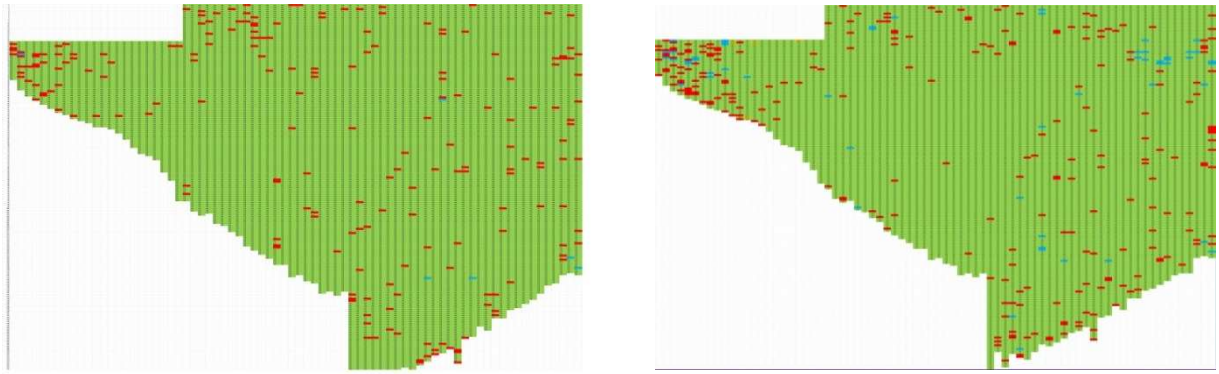


Figura 1. Distribuzione delle piante con sintomi di FD (rosso) e di quelle morte, estirpate e/o capitozzate (blu) come rilevate nel corso dei monitoraggi del 2011 e 2012 nel vigneto in analisi.

Il fenomeno è stato più manifesto soprattutto in alcune aree di bordo che nel 2012 presentavano un'incidenza di FD superiore al 10% nei primi 12 filari del lato ovest, confinante con prati e campi coltivati a cereali (Fig. 2).

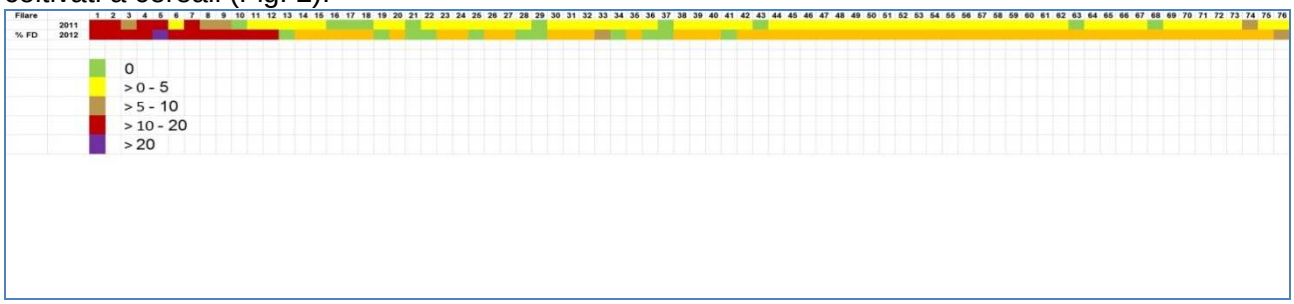


Figura 3. Rappresentazione dell'incidenza di FD in ciascun filare del vigneto in analisi come ottenuto in seguito ai monitoraggi del 2011 e 2012. Le diverse classi di frequenza di FD sono indicate da colori diversi.

Caratterizzazione genetica dei ceppi di fitoplasma di Legno nero identificati nel materiale di moltiplicazione.

La caratterizzazione del fitoplasma LN rilevato in nelle barbatelle consegnate dal Servizio Fitosanitario ha rilevato la presenza dei tipi vmp3 e vmp12 distribuiti ciascuno nel 50% delle piante saggiate.

Analisi dell'andamento del risanamento dalla FD nella cv Barbera.

Per lo studio dell'andamento del risanamento da FD, nel 2008 è stato identificato ed opportunamente cartellinato, un sottogruppo di 43 viti (Barbera) risultate infette da FD in seguito a diagnosi molecolare. Le stesse piante sono state sottoposte ad osservazione dei sintomi di FD e diagnosi molecolare del fitoplasma negli anni successivi, per valutare quante di esse fossero

andate incontro alla remissione spontanea dei sintomi della malattia. La Fig. 4 illustra l'andamento del risanamento e la sua stabilità nelle piante della cv Barbera presente nel vigneto in analisi.

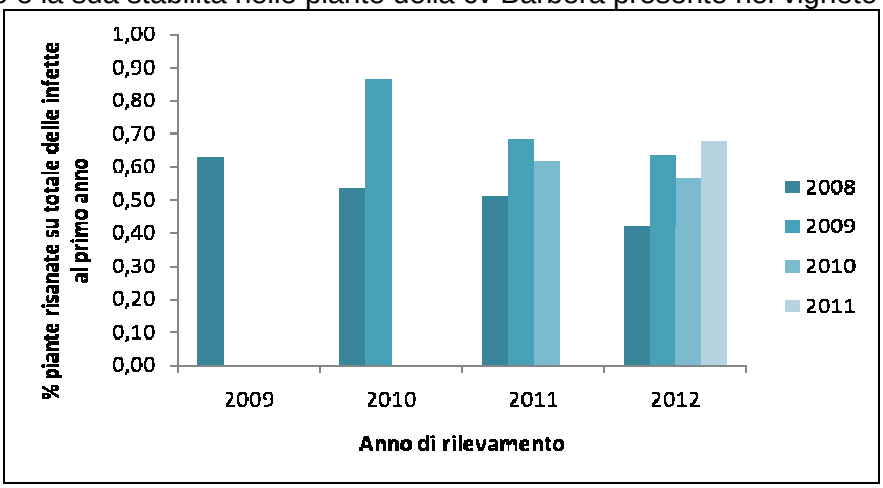


Fig. 4. Rappresentazione della percentuale di piante risanate calcolata ogni anno dal 2009 al 2012 sul totale delle piante infette al primo anno.

I risultati indicano che in generale circa il 60 % delle piante che hanno contratto l'infezione risanano l'anno successivo. Tuttavia la remissione dei sintomi al primo anno dopo l'infezione non è stabile e circa il 10 – 15 % delle piante sono nuovamente infette due anni dopo l'infezione originaria. L'osservazione delle analisi effettuate sul campione di piante che hanno contratto l'infezione nel 2008 mostra inoltre che nel 40% dei casi il risanamento si mantiene anche nel quarto anno successivo all'infezione.

SOTTOPROGETTO C

Referente: Sabrina Palmano (I.V.V. – C.N.R.)

Nell'arco del triennio si sono utilizzati diversi approcci molecolari, in particolare di proteomica e trascrittomica, per studiare l'interazione vite - fitoplasma associato alla Flavescenza dorata, nell'intento di indagare sia i meccanismi di infezione dell'agente patogeno, sia i meccanismi di risposta e difesa dell'ospite, con la possibilità di dare suggerimenti importanti per nuove strategie di controllo della malattia.

PROTEOMICA

La proteomica rappresenta una tecnologia ad alto potenziale che permette un'analisi globale del profilo di espressione delle proteine di un organismo, profilo che varia nel tempo ed in risposta a fattori esterni, sia biotici che abiotici. Nello sviluppo di questa linea di ricerca si sono presi in considerazione campioni di vite sani, infetti e risanati da FD. La ricerca si è focalizzata inoltre sull'analisi di due diverse cultivar, Nebbiolo e Barbera, scelte per l'importanza economica dei due vitigni, e per la ben nota diversa suscettibilità all'infezione di FD.

L'analisi dei pattern proteici dei campioni a confronto è stata svolta attraverso: i)elettroforesi bidimensionale (separazione delle proteine in base al loro punto isoelettrico in prima dimensione ed in base al peso molecolare in seconda dimensione); ii)utilizzo di uno speciale software per l' individuazione di proteine differenzialmente espresse; iii)identificazione di tali proteine mediante analisi di spettrometria di massa; iiii) analisi bioinformatica dei risultati per risalire al significato metabolico delle proteine identificate e l'appartenenza a determinate categorie funzionali.

Questo tipo di analisi ha permesso di individuare l'alterazione di specifiche proteine della vite ad opera del fitoplasma, permettendo di individuare le vie metaboliche maggiormente

colpite dall'infezione.

In generale si è visto che il fitoplasma induce dei profondi cambiamenti già a livello di importanti processi metabolici di base per la sopravvivenza della cellula vegetale, come ad esempio la respirazione e glicolisi, con inevitabili effetti a cascata su tutti gli altri processi metabolici anche secondari della pianta, come schematizzato in figura1.

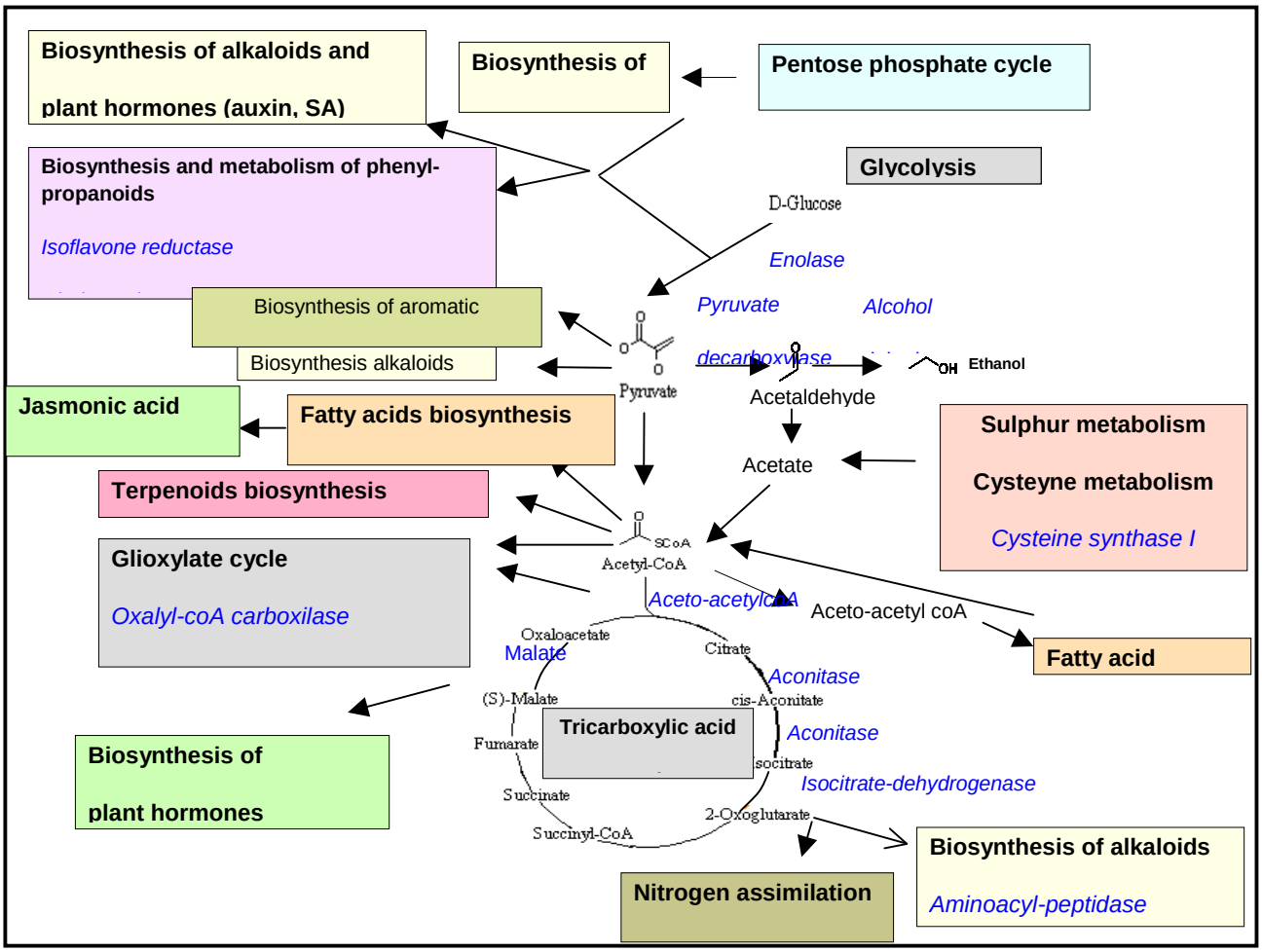
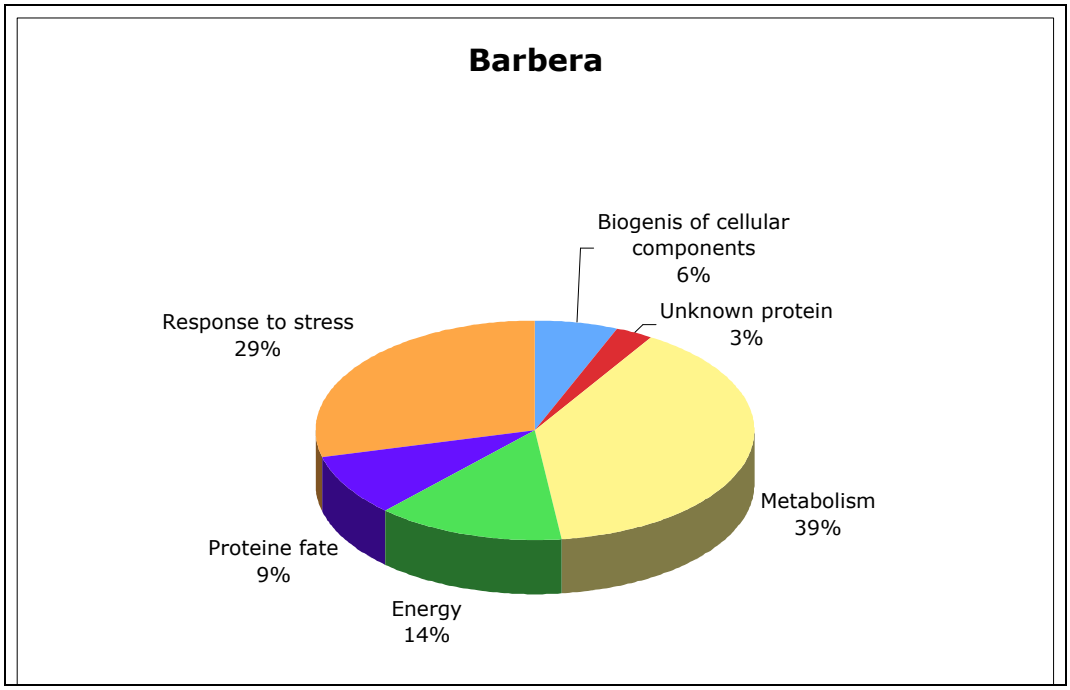


Figura 1: L'analisi comparativa proteomica eseguita ha messo in luce delle sostanziali diversità nell'espressione di enzimi coinvolti nel processo di glicolisi (evidenziati in blu corsivo) in viti affette da Flavescenza dorata. Nella figura viene inoltre evidenziata la ricaduta che tali modificazioni possono avere su tutti gli altri cicli metabolici ad esso correlati.

Inoltre, da una prima comparazione dei dati ottenuti su viti sane ed infette di Barbera e di Nebbiolo, possiamo segnalare che la percentuale totale di proteine differenzialmente espresse a causa dell'infezione da FD, è risultata simile in entrambe le cultivar, aggirandosi su una media del 5%. Queste proteine sono state raggruppate in categorie funzionali e il diagramma in figura 2 rappresenta la distribuzione ottenuta nelle due cultivar. **Segnaliamo la presenza di proteine risultate differenzialmente espresse in maniera specifica a seconda della cultivar, quindi potenzialmente associabili ad una diversa suscettibilità dei due vitigni ad FD.**



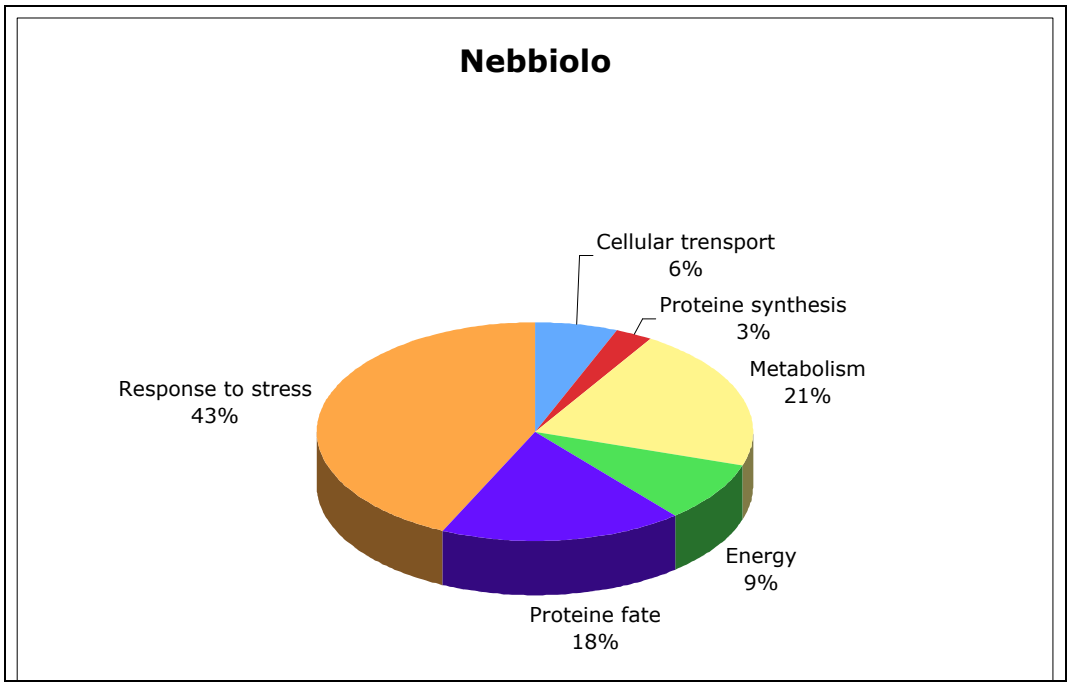


Figura 2: Distribuzione delle proteine differenzialmente espresse in viti di Barbera e Nebbiolo infette da FD.

L'analisi proteomica su piante risanate ha infine evidenziato come, mentre per talune categorie di proteine ci sia un ritorno allo stato precedente all'infezione, per altre si evidenzi una differenza sostanziale con il sano. Queste **proteine espresse in piante recovered, in maniera differenziale sia rispetto al sano che all'infetto potrebbero fungere da possibili marcatori biologici di tale stato fitosanitario.**

TRASCRITTOMICA

I risultati ottenuti con la proteomica hanno permesso di evidenziare come l'espressione di determinate proteine venga alterato dallo stato fitosanitario della pianta, sia nel caso di pianta infetta che risanata da FD, e di mettere in luce una differenza di risposta tra le cultivar Nebbiolo e Barbera. I dati in possesso hanno permesso quindi di orientare i successivi e necessari approfondimenti, su bersagli specifici, analizzando ad esempio l'espressione dei geni (trascrittomica) correlati alle proteine individuate e ritenute interessanti (collegamento con Gambino).

Una via metabolica di vite particolarmente alterata a causa del fitoplasma, si è dimostrata essere quella dei flavonoidi; si è voluto approfondire le modificazioni di questo pathway, indotte sia dall'infezione che dal recovery da FD, nelle due cv Nebbiolo e Barbera, durante le varie fasi della stagione vegetativa della vite. L'analisi è stata fatta integrando analisi biochimiche (letture spettrometriche e HPLC) con quelle di espressione genica (RT-RealTime-PCR) sui tre rami principali che costituiscono la via metabolica dei flavonoidi: la classe degli antociani, quella delle proantocianidine, e la classe dei flavonoli.

Un'ottima correlazione si è ottenuta tra dati biochimici e trascrittomici. L'integrazione di questi dati ha confermato che **sebbene, in seguito all'infezione da FD, vi sia un'alterazione della via metabolica dei flavonoidi totali in entrambe le cultivar, vi è una sostanziale differenza nella reazione del Barbera rispetto a quella del Nebbiolo**. In generale **la risposta in Barbera**, sia da un punto di vista biochimico che trascrittomico, **è molto intensa e marcata, raggiungendo il suo picco ad agosto. Il Nebbiolo invece ha una risposta più limitata e graduale, raggiungendo il picco a luglio.**

In Barbera si assiste ad un drastico aumento delle antocianine, la cui presenza prevale in assoluto su tutti gli altri componenti del pathway. **Questo non avviene invece in Nebbiolo**, dove l'arrossamento generalmente limitato e settoriale osservato nelle foglie infette, è rispecchiato dal limitato accumulo di queste molecole.

Un'interessante osservazione è emersa riguardo le proantocianidine: le foglie di Nebbiolo sane, presentano una concentrazione tannica maggiore di quelle del Barbera, in particolare all'inizio stagione. Abbiamo inoltre osservato che nonostante le piante recovered si comportino generalmente come le sane, vi è un'eccezione proprio nelle proantocianidine dove **le foglie di Nebbiolo recovered presentano una concentrazione elevata di questi composti durante tutte le fasi di raccolta.** Potrebbe quindi essere interessante approfondire ulteriormente questa specifica diramazione della via metabolica dei flavonoidi, visto il possibile ruolo dei tannini nell'interazione vite-insetto vettore. Infatti, se consideriamo che i tannini vengono accumulati in diversi tessuti delle piante vascolari con lo scopo di proteggerle dall'attacco di fitofagi, si apre un'interessante ipotesi di studio e di applicazione pratica: l'utilizzo di nuovi formulati a base di acido tannico e suoi derivati da impiegare nella lotta integrata e biologica per il controllo di insetti nocivi (per via diretta o come vettori di infezione) alla coltura vitivinicola.

Sottoprogetto D

Alberto Alma, Federico Lessio - Di.Va.P.R.A. Entomologia e Zoologia applicate all'Ambiente "Carlo Vidano", Università di Torino:

Scaphoideus titanus preferisce nutrirsi su alcuni vitigni in particolare?

La capacità di *S. titanus* di nutrirsi di preferenza su alcuni vitigni è stata studiata in laboratorio su barbatelle in vaso di vitigni Barbera, Nebbiolo, Chardonnay e Moscato bianco. Gli esemplari di *S. titanus* (ninfe o adulti) sono stati isolati per 24 ore sulle foglie mediante idonei isolatori. Per verificare eventuali tracce di deiezioni dell'insetto, nel sotto-tappo è stato messo un dischetto di carta assorbente trattato con bromocresolo green, un indicatore di pH che a contatto con la melata emessa dall'insetto diventa di colore blu. La misura dell'area colorata ha permesso di determinare la quantità di linfa sottratta dall'insetto. I risultati ottenuti non hanno mostrato alcuna preferenza da parte dei giovani e degli adulti di *S. titanus* per nessuno dei quattro vitigni oggetto d'indagine.

Gli adulti di Scaphoideus titanus possono spostarsi dalla vite inselvatichita presente negli incolti ai vigneti coltivati?

La capacità di *S. titanus* di spostarsi dalla vite americana inselvatichita presente negli incolti ai vigneti coltivati è stata studiata con un metodo di marcatura e cattura. Sulle vite americana è stato distribuito un tracciante, costituito da una soluzione acquosa di latte o albume d'uovo: in questo modo gli insetti, posandosi sulle piante trattate, si "sporcano con il tracciante". Quindi, sia in vigneto sia sulla vite americana sono state disposte trappole cromotattiche gialle e gli adulti di *S. titanus* catturati sono stati rimossi e analizzati in laboratorio con la tecnica ELISA per identificare la presenza del tracciante e calcolare quindi la distanza percorsa in volo. Complessivamente, sono stati analizzati oltre 5000 individui in diversi vigneti piemontesi più o meno vicini a incolti.

Oltre il 40 % degli adulti di *S. titanus* analizzati è risultato marcato. La maggior parte di questi è stata ritrovata negli incolti stessi e nei primi 20 metri all'interno dei vigneti; tuttavia per alcuni esemplari è stata dimostrata la possibilità di spostarsi anche a distanze superiori a 300 metri. La vite selvatica presente negli incolti rappresenta quindi una pericolosa fonte di reinfestazione dell'insetto vettore.

Quante trappole bisogna mettere in vigneto per stimare la popolazione di *Scaphoideus titanus*?

Per verificare il numero minimo di trappole gialle da utilizzare per il monitoraggio di *S. titanus*, in alcuni vigneti sono state disposte fino a 20 trappole, con una densità di circa 20 trappole/ha. Il numero medio di insetti per trappola è stato poi calcolato escludendo progressivamente i dati di un determinato numero di trappole, fino a ottenere la media calcolata su 3 trappole. I risultati hanno dimostrato che 3 trappole/ha di vigneto sono sufficienti per una stima corretta della popolazione purché vengano posizionate correttamente: una al centro del vigneto, e le altre due alle due estremità opposte seguendo un andamento diagonale.

Nell'ambito della stessa prova, è stato notato come la distribuzione delle catture di *S. titanus* all'interno del vigneto coincida con quella delle piante che presentano sintomi di Flavescenza dorata (FD).

***Scaphoideus titanus* può acquisire i fitoplasmi agenti della Flavescenza dorata dalle viti inselvatichite negli incolti?**

Questo aspetto è stato studiato e chiarito isolando ninfe di *S. titanus* allevate in laboratorio da uova, su tralci di vite americana inselvatichita colpiti da FD (infezione confermata da diagnosi molecolare) presenti in alcuni incolti per mezzo di un manicotto di rete (acquisizione). Dopo una settimana, i giovani sono stati rimossi e trasferiti in laboratorio su una vite sana (latenza) e dopo un

mese gli adulti sono stati sottoposti a estrazione del DNA totale e PCR per identificare i fitoplasmi. L'analisi molecolare ha dato esito positivo, confermato da una parte la capacità di *S. titanus* di acquisire i fitoplasmi, e dall'altra il fatto che i portainnesti inselvatichiti presenti negli incolti possono rappresentare una fonte di inoculo di FD.

Oltre a *Scaphoideus titanus*, esistono altri insetti in grado di trasmettere la Flavescenza dorata?

Per indagare su questo aspetto, sono stati fatti campionamenti di altre specie di auchenorrinchi (cicaline) in diversi vigneti con presenza di FD e ridotte popolazioni di *S. titanus.* In particolare, sono stati campionati: *Dictyophara europaea* (Dictyopharidae), segnalata come ampelofago occasionale e capace di trasmettere i fitoplasmi agenti della FD dalla clematide (*Clematis vitalba*) alla vite in condizioni di laboratorio; *Orientus ishidae* (Cicadellidae), specie associata in Slovenia a fitoplasmi agenti di FD; e *Neoaliturus fenestratus* (Cicadellidae), segnalato come potenziale vettore di Legno nero. Gli esemplari, raccolti con retino entomologico o trappole cromotattiche, sono stati sottoposti a estrazione del DNA totale e PCR per identificare i fitoplasmi agenti della FD. Inoltre, per *O. ishidae* sono state allestite prove di trasmissione sia con isolamento di giovani su fave infette da FD e quindi trasferimento su fave sane, sia con adulti raccolti in campo e isolati su dieta artificiale. Nell'agroecosistema vigneto, *D. europaea* è risultata infeudata a numerose dicotiledoni erbacee, fra cui *Amaranthus retroflexus,* e sembra frequentare la vite molto raramente. *N. fenestratus* appare legato esclusivamente alle composite e può essere presente sulla vite come adulto in particolare alla fine dell'estate. *O. ishidae* risulta altamente polifago ed è legato a numerose latifoglie arboree fra cui nocciolo, drupacee, pomacee e salicacee; inoltre è anche la specie che si ritrova più facilmente come adulto su vite. Fitoplasmi agenti di FD sono stati ritrovati in adulti raccolti in campo di *O. ishidae, D. europaea* e in misura minore in *N. fenestratus*; al contrario, nessun giovane di *O. ishidae* è risultato positivo. Le prove di trasmissione finora condotte su *O. ishidae* hanno dato esito negativo.

Sottoprogetto E

Domenico Bosco - Di.Va.P.R.A. Entomologia e Zoologia applicate all'Ambiente "Carlo Vidano", Università di Torino:

Nel triennio 2010-2012 è stata analizzata l'attività del benzotiadiazoloacibenzolarS-methyl (BTH) nella prevenzione della trasmissione della FD a vite e nell'induzione al risanamento di viti già infette. In ogni anno sono state effettuate prove di semicampo entro quattro isolatori di rete con 20 barbatelle cv Barbera in vaso. Le viti di due isolatori sono state trattate a livello fogliare con una sospensione di BTH 2,4 mM ogni 10 giorni dalla fine di luglio (una settimana prima del lancio delle cicaline infettive) alla fine di settembre; le altre rappresentavano il testimone non trattato. Circa 25 adulti di *S. titanus* infettivi sono stati liberati in ciascun isolatore e infine, nel mese di novembre tutte le viti test sono state trapiantate in piena terra in un vigneto sperimentale a Masio (AL).
Durante il mese di agosto dell'anno successivo all'inoculazione con il vettore le viti sono state sottoposte ad analisi dei sintomi e a estrazione del DNA per la diagnosi di FD. Il numero di piante che si sono infettate dopo l'esposizione a *S. titanus* infettivi è risultato basso (11-13%) sia nelle viti di controllo sia in quelle elicitate per la resistenza, senza differenze significative tra le tesi. Inoltre, nel 2010 circa 70 viti cv Barbera infette da FD sono state identificate mediante analisi sintomatica e PCR in un vigneto di Cocconato (AT): metà sono state trattate ogni 10 giorni con BTH durante le stagioni vegetative 2010, 2011 e 2012 mentre le altre rappresentavano i testimoni non trattati; nel mese di agosto 2012 sono stati rilevati i sintomi e prelevati campioni fogliari per la diagnosi delle viti test mediante PCR nested per FD. La percentuale di viti infette e risanate (recovered) nel triennio è risultata simile sia per quelle trattate con BTH (79%) che per il testimone non trattato (82%).
Inoltre nel 2011 e 2012 è stata analizzata l'efficacia di un'applicazione al tronco di thiamethoxam per la lotta a *S. titanus*, che è estremamente localizzata, evita fenomeni di deriva ed è potenzialmente assai persistente, permettendo in linea teorica di applicare un solo trattamento e di estendere il periodo di protezione della vite dalle cicaline. Barbatelle cv Barbera di 3 anni in vaso sono state trattate al tronco mediante spennellamento con diversi dosaggi (5,6 – 16,7 e 50 mg p.a. per pianta) e come controllo altre barbatelle sono state trattate con lo stesso p.a. per via fogliare,

radicale e con acqua. A tempi diversi dall'applicazione sono stati effettuati biosaggi per la mortalità di *S. titanus*. Inoltre, è stata verificata l'attività del trattamento con diversi dosaggi di thiamethoxam applicato per immersione su astoni innestati ma non radicati per la protezione delle piante in barbatellaio; successivamente sono stati condotti biosaggi con *S. titanus* come sopra descritto per le barbatelle radicate. I risultati evidenziano una notevole persistenza di attività (fino a 4 mesi) del p.a. applicato al tronco delle barbatelle, molto maggiore rispetto ai trattamenti fogliare e radicale (al terreno), almeno per le due dosi più elevate. Per contro, l'assorbimento di thiamethoxam attraverso il tronco risulta abbastanza lento e l'attività insetticida non si manifesta pienamente fino a 14 gg. dopo l'applicazione. I risultati dei biosaggi con *S. titanus* isolati su astoni immersi prima della radicazione (a fine forzatura) in sospensioni di thiamethoxam a 3 diverse concentrazioni (100, 500, 2.500 ppm) hanno mostrato un'elevata efficacia nell'abbattimento della popolazione, con una spiccata persistenza d'azione (fino a 4 mesi dopo il trattamento) nel caso delle due dosi maggiori di p.a..

Sottoprogetto F

Responsabili attività: F. Mannini, I. Gribaudo, G. Gambino - I.V.V.–C.N.R., Unità di Grugliasco (TO):

Verifica della trasmissibilità tramite materiale legnoso da piante 'recovered' da FD

Talee radicate di Barbera provenienti da piante madri interessate dal fenomeno del *recovery* da FD sono state radicate e conservate in vaso sotto *screen-house* per un biennio (2011-2012) e controllate sull'eventuale presenza del fitoplasma tramite il metodo rapido *reverse transcription-RealTime Taqman assays* (Margaria *et al*., 2009). L'esito dei test in entrambi gli anni è stato negativo per tutti i campioni (130 il primo anno e 120 il secondo a causa di alcune fallanze). I risultati della prova confermano che la discendenza delle piante madri si è mantenuta *recovered.*

Verifica della trasmissibilità di LN e FD tramite materiale legnoso sottoposto a termoterapia in acqua (50℃ x 45').

Talee provenienti da 10 piante di Barbera, 4 di Nebbiolo e 6 di Moscato bianco infette da FD e da 10 piante di Chardonnay risultate infette da LN (230 per Barbera, 88 per Nebbiolo, 112 per Moscato e 244 per Chardonnay), sono state radicate e poste in vaso dopo che all'incirca la metà di esse era stata sottoposta a termoterapia in acqua a 50℃ x 45' e la restante metà utilizzata quale testimone non trattato. Le piantine in vaso sono state conservate sotto *screen-house* per un biennio (2011-2012) e la vegetazione sottoposta a controlli tramite il metodo rapido *reverse transcription-RealTime Taqman assays* (Margaria *et al*., 2009). L'esito dei test diagnostici è risultato negativo per tutti i campioni (sia testimoni che trattati) ed in entrambi gli anni.

Figura 1. Arrossamenti fogliari più evidenti apparsi nell'ottobre del 2012 su alcune piante test (non termotrattate) di Barbera e risultate negative al saggio PCR per la presenza di fitoplasmi.

Tali risultati indicano che nella situazione della nostra prova la diffusione dei fitoplasmi tramite propagazione vegetativa è stata nulla indipendentemente dal trattamento termoterapico in acqua. Va tuttavia segnalata, al secondo anno, la presenza di arrossamenti fogliari tardivi (inizio ottobre) di dubbia eziologia in alcune piantine del testimone, ed assenti in quelle trattate. Le piante verranno conservate nel corso del 2013 per effettuare un ulteriore saggio e verificare l'ipotesi che tali sintomi possano essere ascritti alla presenza di fitoplasmi sebbene con un titolo molto basso non rilevabile dall'analisi (Fig. 1).

Studio di fattibilità sulla marcatura del materiale di propagazione ai fini della tracciabilità dell'avvenuto termotrattamento in acqua

Al fine di valutare la praticabilità di un sistema oggettivo di tracciabilità del trattamento di termoterapia in acqua (e di tutte le altre eventuali informazioni relative al materiale vivaistico ritenute utili alla sua identificazione) è stato effettuato uno studio sulla rispondenza di una tecnica di marcatura elettronica basata sulla tecnologia a radiofrequenze (RFID) ed utilizzando *microchips* (0,21 x 1,20 cm) inseriti nel materiale di moltiplicazione a livello del midollo e della parte più interna dello xilema. A tal fine, nel marzo 2011 è stata avviata l'etichettatura elettronica su due tipologie di materiale di moltiplicazione (innesti-talea e barbatelle) sottoposti o meno a termotrattamento in acqua a 50℃ x 45'. Nel primo caso (**a**), la prova ha previsto l'inserimento dei *microchips* sulla talea del portinnesto (Kober 5BB ed S.O.4) prima dell'innesto con marze di Barbera e di Moscato bianco. Nel secondo caso (**b**), utilizzando barbatelle innestate di tre cloni di Nebbiolo, il *microchip* è stato inserito pochi centimetri sotto il punto d'innesto praticando un "tassello" nella barbatella. La porzione di legno è stata rimossa per consentire l'inserimento del *microchip* e quindi riposta nella sua sede. In entrambi i casi (a) e (b), prima dell'attivazione dei microchips la procedura ha previsto l'avvio di un *software* di gestione dati presente nel palmare collegato ad un apposito *database*.

a) Il materiale di propagazione (marza e talea di portinnesto) è stato suddiviso in tre tesi: 1) termoterapia in acqua seguita da inserimento del *microchip;* 2) solo inserimento del *microchip* senza termoterapia; 3) inserimento del microchip prima della termoterapia

b) Termotrattamento in acqua di barbatelle innestate di cui la metà con inserimento del *microchip* dopo il trattamento e metà senza; 2) barbatelle testimone (senza *microchip* e senza termoterapia) 3) barbatelle non termotrattate ma etichettate con *microchip*.

Prova (a) - Controlli e risultati

Gi innesti-talea etichettati elettronicamente, una volta estirpati come barbatelle dal vivaio nell'ottobre 2011, sono state messe successivamente a dimora in vigneto nella primavera 2012 al fine di monitorarne attecchimento e sviluppo e di confermare nel tempo l'efficienza di lettura delle *tags* inserite nelle piante. La resa vivaistica è risultata ridotta nel caso dell'utilizzo dell' S.O.4 come portinnesto e quando il *chip* è stato inserito prima della termoterapia in acqua, mentre è stata da discreta a buona negli altri casi (Tabella 1). L'attecchimento delle barbatelle dopo l'impianto del vigneto è stato buono e nel corso dell'estate 2012, tramite un palmare, sono state effettuate le letture delle *tags* inserite nelle piante. La resposta positiva alle letture è stata elevata in generale,

fatta salva una certa variabilità a seconda delle tesi ma non riferibile al trattamento. I risultati della prova hanno confermato la validità tecnica del metodo di etichettatura elettronica (RFID) per la tracciabilità dei materiali di propagazione. L'origine del materiale vivaistico ed i trattamenti da questo subiti (in particolare la termoterapia in acqua) possono essere quindi verificati dopo l'impianto in vigneto a totale garanzia dei viticoltori, cioè gli utilizzatori finali del materiale.

Prova (b) - Controlli e risultati.

Le barbatelle innestate di Nebbiolo sono state messe a dimora in un vigneto sito a Sommariva Perno (CN) nella primavera 2011, poche settimane dopo l'inserimento del microchip.

L'attecchimento non è stato dei migliori a causa della prolungata siccità seguita all'impianto. La presenza o meno del *microchip* tuttavia non è parsa determinante sulla vitalità delle piante ed a fine estate 2011 è stata eseguita con successo (oltre il 90%) la lettura dell'etichetta elettronica sulle piantine attecchite tramite apposito palmare. Nel corso dell'estate 2012, la lettura, ripetuta in due date diverse (fine agosto e inizio settembre), ha fornito una % non del tutto soddisfacente di risposte positive (39 % e 50 % rispettivamente).Sebbene ai fini della tracciabilità sia importante avere una buona % di letture al primo anno dell'impianto (situazione che si verificata nel nostro caso con la lettura del 2011), pur tuttavia una sensibile riduzione del segnale già al secondo anno indica che l'inserimento del *chip* su barbatelle innestate ha presentato qualche criticità.

Tabella 2. Resa vivaistica (2011) e % di lettura dei *microchips* (inseriti in pianta al momento dell'innesto) nel primo anno di vigneto (2012) di diverse combinazioni di etichettatura elettronica e termoterapia in acqua.

Tesi	N° innesti (2011)	Innesti-talea in vivaio dopo forzatura	N° barbatelle all'estirpo (2011)	Resa %	N° barbatelle in vigneto (2012)	N° letture RFID (2012)	Letture (%)
BA84 k C+T	30	29	8	26.7	8	6	75.0
BA84 k T+C	50	47	38	76.0	35	31	88.6
BA84 k C	20	20	11	55.0	10	8	80.0
BA84 s C+T	30	20	11	36.7	11	10	90.9
BA84 s T+C	50	47	27	54.0	27	27	100
BA84 s C	20	15	5	25.0	5	5	100
MOG9 k T+C	50	43	40	80.0	39	38	94.4
MOG9 s T+C	50	47	20	40.0	20	18	90.0

C = solo Chip; C+T= prima Chip poi Termo; T+C= prima Termo poi Chip.

BA = Barbera; MO = Moscato; k = Kober 5BB; s = SO4

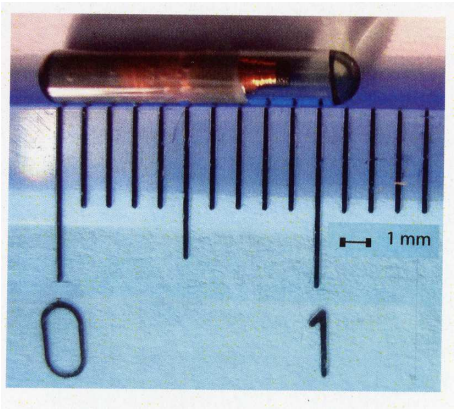


Figura 2. Lettura dei *microchips* (*a sinistra*), inseriti al momento dell'innesto, su piante al primo anno di impianto in vigneto.

A conclusione della sperimentazione si valuta positivamente la praticabilità tecnica dell'etichettatura elettronica del materiale vivaistico. Restano tuttavia da superare i problemi di natura economica dovuti al costo del *microchip*, ancora troppo elevato (circa 1€) rispetto all'attuale valore medio dei materiali vivaistici. In considerazione di ciò, tuttavia, l'etichettatura elettronica potrebbe giustificarsi per il materiale vivaistico di categoria "base" (quello destinato ai vivaisti), il cui valore commerciale è oggi pari a 3,40 € per barbatella.

Variazioni del contenuto in fitoregolatori del materiale legnoso sottoposto a termoterapia in acqua

Con l'obiettivo di comprendere le modificazioni fisiologiche e biochimiche che avvengono nel materiale sottoposto a termoterapia in acqua, sono state studiate le possibili variazioni a carico del contenuto in acido abscissico (ABA) dovute al trattamento termico. L'ABA è uno dei fitoregolatori le cui modificazioni quantitative ed interazioni regolano i complessi fenomeni della dormienza delle gemme e della ripresa vegetativa. Talee legnose di Barbera e Nebbiolo sono state sottoposte al trattamento termoterapico standard (50℃ per 45'); si è analizzato il loro contenuto in ABA prima e dopo la termoterapia, in collaborazione con l'Università di Pisa, con un protocollo che prevede estrazione e separazione mediante SPE, purificazione per HPLC e quantificazione con GC-MS. I risultati delle prove svolte in due anni non sono univoci, ma alcune tendenze appaiono confermate: a fronte di un ritardo nel germogliamento non si ha un aumento dell'ABA bensì, in molti casi, una sua diminuzione, che potrebbe essere imputabile a termodegradazione e/o ad una forma di accelerazione del metabolismo. L'influenza della cultivar e delle condizioni legate probabilmente all'andamento stagionale e al momento del prelievo appaiono rilevanti. I risultati confermano comunque che il trattamento termoterapico può influire sul contenuto in ABA, pur avendo ancora bisogno di conferme sperimentali e di un ampliamento delle ricerche agli altri fattori in gioco.

Studio della espressione genica in piante sane, infette e recovered da FD

Lo scopo è stato verificare se la remissione dei sintomi nelle malattie da fitoplasmi può essere messa in relazione con meccanismi di stress a livello cellulare legati alla produzione di perossido d'idrogeno (H_2O_2). La prova è stata condotta su piante di Barbera presenti in un vigneto di Cocconato (AT) suddivise in 3 tesi: piante sane, piante infette da FD e piante *recovered* da FD da 2 anni. L'espressione dei geni codificanti 13 enzimi ritenuti particolarmente importanti nel metabolismo del H_2O_2 è stata analizzata mediante real-time RT-PCR (Tabella 3). Nei tessuti delle piante *recovered* sono state individuate maggiori quantità di H_2O_2 (Figura 3) legate alla

sovraespressione di alcuni geni produttori del perossido di idrogeno (in particolare *germin-like protein*) e per la contemporanea repressione di geni legati al suo catabolismo (ascorbato perossidasi e perossidasi). Nelle piante infette la quantità di H_2O_2 è inferiore sia alle piante sane che a quelle *recovered* per la sovraespressione di ascorbato perossidasi e perossidasi. La regolazione opposta in piante *recovered* ed infette della trascrizione di 3 geni in particolare, APX2, POX4 e POX5, rappresenta un punto di partenza molto importante per individuare una sorta di "marker" precoce del fenomeno del *recovery* (Tabella 3).

In parallelo sono stati analizzati una serie di geni coinvolti nella risposte di difesa delle piante nei confronti dei patogeni. L'accumulo di H_2O_2 osservato in piante *recovered* non induce una modulazione consistente dei geni normalmente coinvolti nelle risposte di difesa della pianta. I geni PR1, BGL2 e TAU1 coinvolti nella risposte di difesa mediata dall'acido salicilico vengono sovraespressi solo nelle piante infette. L'infezione da FD causa un'alterazione nelle biosintesi degli ormoni. NCED e quindi l'ABA viene fortemente indotto in piante infette (Tabella 3). Il ruolo dell'ABA nelle risposte di difesa in pianta è ancora controverso, in quanto varia notevolmente in base al tipo di patogeno e alla pianta interessata. Nel caso specifico questa forte attivazione sembra essere legata maggiormente a fenomeni di senescenza in corso nei tessuti sintomatici delle piante infette, piuttosto che ad una vera forma di resistenza. Viceversa ACO legato alla sintesi di etilene viene indotto solo nelle piante *recovered.* I dati ottenuti sembrano indicare che il mantenimento dello stato di *recovery* non sia determinato dall'attivazione di risposte di difesa legate all'acido salicilico, bensì a risposte riconducibili all'etilene e all'attivazione di altri geni (WRKY2). Viceversa l'induzione dei geni legati all'acido salicilico nelle piante infette da FD indica che queste reagiscono all'invasione del fitoplasma mediante forme di difesa comuni a diversi agenti biotici, ma non sono sufficienti ad indurre resistenza al patogeno.

Questi dati sono stati confermati nel 2012 in piante di Barbera *recovered* da 4 anni e mantenute per 2 anni in vaso ed in ambiente controllato. Le viti *recovered* conservano una sorta di "ricordo" della loro infezione da FD anche dopo diversi anni di mancata diagnosi del patogeno, probabilmente a causa di alterazioni permanenti o semi-permanenti nella pianta (per esempio modificazioni epigenetiche).

Nel complesso questi risultati evidenziano una chiara correlazione tra H_2O_2 ed il fenomeno del *recovery*. Analisi approfondite sulle relazioni fisiologiche e molecolari che intercorrono tra la vite e l'FD nelle prime fasi del *recovery* sarebbero molto utili per comprendere meglio i processi metabolici che sono alla base dell'induzione e del mantenimento del fenomeno, con ricadute pratiche importanti per la gestione in vigneto delle fitoplasmosi.

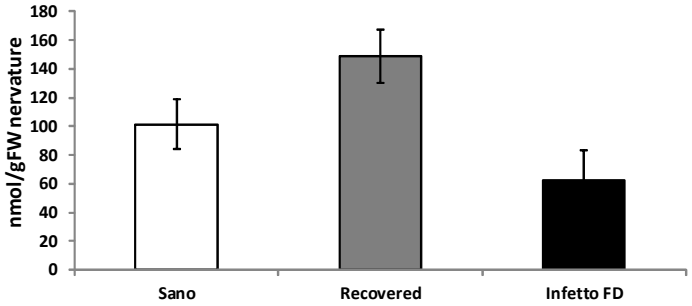


Figura 3. Determinazione della quantità di H_2O_2 presente nelle nervature di piante sane (S), infette (I) e recovered (R) mediante attività enzimatica di una perossidasi aggiunta all'estratto vegetale e

lettura dei cambiamenti di assorbanza a 590 nm. I dati sono riportati come media ± l'errore standard di 6 repliche.

Tabella 3. Schema riassuntivo delle modificazioni trascrizionali in 44 geni analizzati nel corso dei 3 anni del progetto in piante *recovered* (*Recovered*/Sano) ed infette (Infetto/Sano) in rapporto ai livelli rilevati in piante sane. Quadrati rossi: la trascrizione del gene viene significativamente indotta in piante *recovered* e/o infette rispetto alle sane. Quadrati verdi: la trascrizione del gene viene significativamente repressa in piante *recovered* e/o infette rispetto alle sane. nt.: geni non testati.

Geni	*Recovered*/Sano			Infetto/Sano	
	2010	2011	2012	2010	2011
GOX (glicolato ossidasi)					
GLP1(*germin-like protein*)					
GLP3					
ACX1 (acyl-CoA ossidasi)					
ACX2					
NOX1 (NADPH ossidasi)					
NOX3					
NOX5					
SOD1 (superossido dismutasi)					
SOD2					
SOD3					
GPX1 (glutatione perossidasi)					
GPX2					
APX1 (ascorbato perossidasi)					
APX2					
APX3					
APX6					
CAT1 (catalasi)					
CAT2					
POX4 (perossidasi)					
POX5					
GR1 (glutatione reduttasi)					
GR2					
MDHAR1 (monodeidroascorbato reduttasi)					
MDHAR2					
DHAR1 (deidroascorbato reduttasi)					
DHAR2					
GST1 (glutatione S-trasferasi)					
GST2					
γ–ECS (glutamilcisteina sintetasi)	nt			nt	
GSH-S (glutatione sintetasi)	nt			nt	
PR1 (*pathogenesis related genes*-1)	nt			nt	
PR10 (*pathogenesis related genes*-10)	nt			nt	
BGL1 (*β 1-3 glucanase*)	nt			nt	
BGL2	nt			nt	
TAU1 (*thaumatin-like protein*)	nt			nt	
TAU2	nt			nt	
NPR1.1 (*nonexpressor PR-1 gene*)	nt			nt	
NPR1.2	nt			nt	
WRKY1	nt			nt	
WRKY2	nt			nt	
NCED (*9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase*)	nt			nt	
ACO (*1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase*)	nt			nt	
OPR (*12-oxophytodienoate reductase 2-like*)	nt			nt	