



# Difesa fitosanitaria





#### **Coordinamento editoriale**

Andrea Marelli

#### **Coordinamento tecnico**

Paolo Aceto, Alba Cotroneo, Luisa Ricci, Alberto Turletti

#### **Per informazioni**

REGIONE PIEMONTE  
Assessorato Agricoltura, Foreste, Caccia e Pesca  
Direzione Agricoltura

*Settore Servizi di Sviluppo Agricolo*  
C.so Stati Uniti, 21 – 10128 Torino  
Tel: 011.4321466 – Fax: 011.537726

*Settore Fitosanitario Regionale*  
Via Livorno, 60 – 10144 Torino  
Tel: 011.4321473 – Fax: 011.4323710

[www.regione.piemonte.it/agri/](http://www.regione.piemonte.it/agri/)

È vietata la riproduzione dei testi e dei materiali iconografici senza autorizzazione e citazione della fonte.

**Impaginazione e grafica:** Verba Volant, Torino

**Stampa:** Centro stampa Regione Piemonte

**Tiratura:** 1000 copie – giugno 2012

Pubblicazione in distribuzione gratuita

Supplemento al n. 77 dei Quaderni della Regione Piemonte – Agricoltura

Registrazione al Tribunale di Torino n. 4184 del 5 maggio 1990

Direttore responsabile: Luciano Conterno

## Presentazione

La ricerca in agricoltura costituisce un fattore essenziale per la competitività e la sempre maggiore sostenibilità ambientale e sanitaria del settore e delle diverse filiere agricole, all'interno di un contesto di attenzione alla qualità e alla tutela del consumatore e al benessere degli animali, come quello piemontese.

L'innovazione prodotta con l'attività di ricerca risulta strategica per le scelte imprenditoriali degli operatori delle filiere stesse e alimenta l'informazione che sta alla base della pianificazione della politica agricola regionale.

La presente collana dal titolo *Innovazione e sperimentazione in agricoltura* intende divulgare in modo sintetico i risultati ottenuti dall'attività di ricerca finanziata negli ultimi anni dalla Regione Piemonte ed è composta da quattro fascicoli monografici:

- *Reflui zootecnici e fertilizzazione organica*
- *Coltivazioni e allevamento estensivi e biologici*
- *Qualità del latte e dei formaggi*
- *Difesa fitosanitaria*

Tale produzione editoriale integra e completa la divulgazione dei risultati della ricerca effettuata attraverso la pubblicazione degli stessi sulla rivista regionale "Quaderni della Regione Piemonte – Agricoltura".

Ogni volume contiene numerosi articoli divulgativi riferiti all'area tematica propria di ciascun fascicolo e si rivolge agli agricoltori, ai tecnici che operano in stretto contatto con gli operatori agricoli e alla comunità scientifica, tutti soggetti sempre più chiamati a fare sistema in un periodo difficile e di necessarie ristrutturazioni del settore quale quello attuale.

I quattro volumi della collana sono scaricabili in pdf dalla sezione "Pubblicazioni" del portale web della Direzione Agricoltura: [www.regione.piemonte.it/agri/](http://www.regione.piemonte.it/agri/)

## Flavescenza dorata della vite: le novità della ricerca

Il 2010 e il 2011 sono stati anni di recrudescenza della flavescenza dorata. La Regione Piemonte fin dall'inizio della comparsa della malattia ha promosso e finanziato progetti di ricerca integrata per chiarirne gli aspetti epidemiologici e ambientali al fine di mettere a punto idonee misure di lotta. Nel triennio 2007-2009 è stato finanziato il progetto:

Studi su fitoplasmi della vite e loro vettori: sensibilità varietale e efficienza di acquisizione di flavescenza dorata (FD), caratterizzazione, diffusione e vettori di legno nero (LN), tecniche di riduzione del danno – VIPLASMI coordinato dal Settore Fitosanitario e con i seguenti partecipanti:

- Settore Fitosanitario regionale (S.F.R.).
- Istituto di Virologia Vegetale (I.V.V.) – C.N.R., Torino e Unità di Grugliasco.
- Di.Va.P.R.A. Entomologia e Zoologia applicate all'Ambiente "Carlo Vidano", Università di Torino.
- Cadir Lab S.r.l.
- Università Cattolica Piacenza, Facoltà di AGRARIA, Sede di Piacenza.

Gli studi condotti hanno avuto come obiettivo quello di dare risposta ad alcune delle molte incertezze legate ai giallumi della vite ed in particolare alla flavescenza dorata.

### ■ Le domande più frequenti

#### I vitigni coltivati in piemonte hanno una diversa sensibilità alla flavescenza dorata (FD): perché?

Per dare risposta a questa domanda si è messo a punto un metodo per quantificare la concentrazione del **fitoplasma FD** nella pianta infetta. Questo

Paola Gotta  
Chiara Morone  
*Regione Piemonte  
Settore Fitosanitario*

Cristina Marzachi  
Sabrina Palmano  
Franco Mannini  
Ivana Gribaudo  
*Istituto Virologia Vegetale C.N.R.,  
Torino e Unità di Grugliasco (TO)*

Alberto Alma  
Domenico Bosco  
Federico Lessio  
*Università di Torino (Di.Va.P.R.A.)  
Entomologia e Zoologia applicate  
all'ambiente "Carlo Vidano"*

metodo è stato utilizzato per valutare, nei tre anni del progetto, il **titolo di FD** in viti infette appartenenti a due cv con diversa sensibilità alla malattia: **Barbera e Nebbiolo**.

**Figura 1**

Flavescenza dorata su Barbera.



**Figura 2**

Sintomi di flavescenza dorata su Nebbiolo (foto G. Bosio).



In ciascuna delle cv analizzate, l'**intensità della manifestazione dei sintomi** primaverili e di quelli estivi **non** è risultata **correlata alla concentrazione del patogeno** nella pianta infetta. L'espressione del sintomo è quindi legata alla **situazione fisiologica** della pianta ed a differenze in tal senso tra le due cv. Complessivamente, si è osservato che nel corso della stagione vegetativa il **titolo di FD** era sempre **maggiore** nelle viti della **cv Barbera** rispetto a quelle di **Nebbiolo** (*Tabella 1*).

**Tabella 1**

Numero di cellule di fitoplasmici agenti di FD per ng di DNA di vite nelle viti delle cv Barbera e Nebbiolo nel corso dei campionamenti estivi ed autunnali del 2007, 2008 e 2009.

	Barbera	Nebbiolo
Campionamento	cellule FD/ng vite	cellule FD/ng vite
estate	9725	992
autunno	2320	288

La concentrazione del fitoplasma all'inizio della ripresa vegetativa era influenzata dall'anno di osservazione. L'inverno meteorologico 2006-2007 è stato molto mite e la concentrazione di FD nelle viti di entrambe le cv nella primavera del 2007 è risultata la più alta del triennio. Negli inverni successivi, molto più freddi, la concentrazione primaverile di FD in entrambe le cv si è abbassata significativamente. È ipotizzabile che inverni rigidi risultino in una diminuzione della concentrazione del fitoplasma in primavera, benché un effetto indiretto della temperatura sulla fisiologia della vite, con ripercussioni sulla moltiplicazione del fitoplasma non possa essere escluso.



Figura 3

Sindrome precoce di flavescenza dorata su Moscato.

## Diagnosi dei giallumi e dei virus della vite: semplificazione dei metodi

L'utilizzo di metodiche di diagnosi rapide ed affidabili, abbinate ad un costante monitoraggio dello stato fitosanitario dei vigneti, sono fondamentali per limitare la diffusione delle malattie della vite, ma soprattutto nel caso dei giallumi della vite, queste prevedono l'utilizzo di protocolli laboriosi non applicabili su larga scala. L'attività di ricerca condotta negli ultimi tre anni ha riguardato lo sviluppo di metodiche innovative per la diagnosi rapida, adatta ad un monitoraggio su ampia scala, delle principali malattie della vite associate a fitoplasmi, Flavescenza dorata (FD) e Legno nero (LN), ed ad alcuni virus floematici della vite, con particolare riferimento ai virus associati all'accartocciamento fogliare, *Grapevine Leafroll-associated Virus 1 e 3* (GLRaV-1 e GLRaV-3), ed al complesso del legno riccio, *Grapevine Virus A* (GVA).

Sono stati messi a punto e validati protocolli sensibili ed affidabili che da un'unica estrazione iniziale estremamente rapida e semplice, applicabile a livello massale, permettono la diagnosi rapida di cinque tra i più importanti patogeni floematici della vite. Nel caso della diagnosi di fitoplasmi si è riusciti a quadruplicare il numero delle analisi rispetto alle tecniche usate precedentemente a parità di impegno economico e temporale.

## **Quali sono i meccanismi di infezione e trasmissione dei fitoplasmi, e sui meccanismi di risposta e difesa all'infezione da parte della pianta?**

Indagare su questi aspetti non è semplice. Le funzioni degli organismi viventi dipendono dai loro geni ma a livello molecolare i giochi si svolgono soprattutto a livello delle proteine: per questo motivo si è voluto procedere ad un'analisi comparativa del profilo delle proteine totali di viti sane ed infette da FD. L'obiettivo è quello di capire quali siano i sistemi coinvolti nella difesa della vite all'infezione di FD e quali invece siano i sistemi infettivi del fitoplasma correlato, tutte informazioni che potranno avere importanti ricadute sulle strategie di controllo della malattia.

L'analisi di campioni di viti sani ed infetti da FD ha portato all'individuazione di proteine sovra o sotto-espresse nella pianta malata rispetto alla sana. Tali proteine sono state identificate ed è stata individuata la loro possibile funzione biologica.

La sovra o sotto-espressione di alcune di queste proteine in viti infette è stata confermata anche a livello di trascrizione dei rispettivi geni. I dati ottenuti hanno avvalorato l'ipotesi di un possibile coinvolgimento di questi geni nei processi di risposta dell'ospite specifici all'infezione da fitoplasma.

## **Qual è il ruolo degli incolti ricchi di vite americana sviluppatasi da vecchi ceppi di portinnesto e presente come specie a portamento lianoso?**

Tali incolti possono ospitare popolazioni talvolta consistenti di *Scaphoideus titanus*, il vettore della FD, che si nutre e si riproduce comunque solo sulla vite (sia americana che europea): gli stadi giovanili sono stati ritrovati dalla fine di maggio fino alla metà di agosto, con un picco alla terza decade di giugno (prevalentemente ninfe di III età); dalla metà di luglio in poi, sono state trovate solo ninfe. Gli adulti sono presenti dall'inizio di luglio alla fine di settembre-metà di ottobre. Talvolta gli stadi giovanili risultano infetti da FD, acquisita dalla vite americana stessa.

## **Dove depone di preferenza le uova *S. titanus*?**

La capacità di *S. titanus* di deporre le uova sul legno di uno o due anni è stata studiata in ambiente controllato, immettendo circa 350 femmine mature in un gabbione di rete escludi-insetto contenente circa 60 barbatelle di vite in vaso, su 30 delle quali il legno di 2 anni era stato coperto da carta stagnola.

Nell'anno successivo, sono stati notati giovani di *S. titanus* in numero maggiore sulle barbatelle con disponibilità di legno di due anni; tuttavia, sono state registrate nascite anche dal legno di un anno, che può quindi essere usato dall'insetto per deporre le uova. Tale aspetto deve essere considerato un rischio soprattutto nella filiera vivaistica, data la possibile contaminazione del materiale di propagazione con le uova del vettore.

### **S. titanus può compiere lunghi spostamenti in volo e può colonizzare nuovi ambienti**

Per lo studio della dispersione di *S. titanus* è stato applicato un tracciante (una soluzione acquosa di latte o albume d'uovo), con una pompa a spalla, direttamente sulle piante in un vigneto e in un incolto con vite americana adiacente: gli insetti, posandosi sulle piante trattate, risultano quindi marcati. Nel vigneto e nell'incolto sono poi state posizionate le trappole cromotattiche gialle; gli adulti catturati sono stati sottoposti a diagnosi di laboratorio (ELISA) per la ricerca del tracciante (latte o albume) e la verifica della distanza percorsa in volo.

Nel corso di tale prova preliminare, sono stati catturati complessivamente 65 adulti di *S. titanus*; fra questi, 15 sono risultati marcati con latte (distribuito nel vigneto) e 9 con albume (distribuito nell'incolto). Dei 9 insetti marcati con albume, 5 sono stati ritrovati nel vigneto (2 su trappole di confine) e 4 nell'incolto; 3 insetti su 15 marcati con latte sono stati catturati nell'incolto, su una trappola posta a meno di 3 m dal vigneto; gli altri 12 adulti marcati con latte sono stati catturati nel vigneto. Il 60% degli adulti marcati con albume è stato catturato entro 10 m dal punto trattato più vicino, mentre la massima distanza di dispersione dall'incolto al vigneto è stata registrata a 21 m; gli insetti marcati con latte, nel complesso, hanno fatto registrare una distribuzione più uniforme con catture fino a 30-32 m di distanza.

Questo studio è in corso di completamento: allo stato attuale, sono in fase di analisi oltre 4000 esemplari di *S. titanus* catturati in incolti (trattati col tracciante) e in vigneti posti a una distanza dall'incolto stesso compresa tra 2 e oltre 200 m.

### **In quale periodo è più efficiente l'acquisizione di FD? Le viti risanate possono contenere ancora il fitoplasma e trasmetterlo?**

Per determinare l'efficienza di acquisizione dei fitoplasmi agenti di FD da parte di *S. titanus* su viti risanate (viti dove si osserva la scomparsa, naturale o indotta da potatura, dei sintomi della malattia) e sintomatiche sono state



Figura 4

Uova deposte nel ritidoma della vite.



isolate ninfe sane su piante di cv Barbera e Nebbiolo infette in fase precoce (fine maggio) e tardiva (agosto), e su piante di cv Nebbiolo risanate. Dopo sette giorni, le cicaline sopravvissute sono state trasferite su viti sane in laboratorio, e dopo un mese di incubazione sono state analizzate in PCR nested per la presenza di FD.

Le prove di acquisizione hanno evidenziato un'efficienza bassa in fase precoce. Le cicaline isolate su Nebbiolo risanato non hanno acquisito il patogeno.

### **È possibile indurre la resistenza a flavescenza dorata nelle piante?**

Sono state realizzate prove di trasmissione di FD mediante *S. titanus* da fava a vite trattata con l'elicitore di resistenza benzotiadiazolo (BTH). Un campione di insetti è stato poi recuperato dopo l'inoculazione e sottoposto ad analisi molecolare per accertare l'efficienza di acquisizione del fitoplasma. Le piante sono state analizzate per la presenza di FD circa 3 mesi dopo l'inoculazione. Al termine del periodo di inoculazione sono sopravvissute percentuali identiche di cicaline sulle viti di controllo trattate con acqua (13) e su quelle sottoposte ad uno o due trattamenti con BTH (11), che non sembra avere attività tossica diretta su *S. titanus*. La FD è stata rilevata in una vite su 13 di controllo mentre nessuna delle 22 viti trattate con BTH è risultata infetta. Complessivamente, nelle prove svolte nel 2008 e nel 2009, 2 viti di controllo su 36 sono state infettate, mentre nessuna delle 56 viti sottoposte a uno (28 piante) o due (28 piante) trattamenti con BTH 2,4 mM è risultata infetta. La bassa efficienza di trasmissione ottenuta sulle viti di controllo non permette però di trarre conclusioni certe.

### **Quali sono i ceppi di legno nero (LN) presenti, quali sono le piante ospiti spontanee e i potenziali vettori?**

È stata analizzata la variabilità genetica esistente tra gli isolati del fitoplasma dello Stolbur, agente del LN della vite, trasmesso in natura da *Hyalesthes obsoletus*. A questo scopo, isolati di LN da viti appartenenti a cv. diverse, piante spontanee ed entomofauna potenzialmente vettrice sono stati caratterizzati in otto vigneti rappresentativi della viticoltura piemontese nelle provincie di AL, AT, BI, CN, TO e VC.

Nei vigneti in studio, il ciclo epidemiologico "convolvolo-*H. obsoletus*-vite europea" è risultato più rappresentato rispetto a quello "ortica-*H. obsoletus*-vite europea". I risultati ottenuti hanno evidenziato la presenza stabile del fitoplasma agente del LN all'interno dei serbatoi di piante spontanee nei vi-

gneti in esame. I casi di infezione registrati su vite sono invece diminuiti nel corso dei tre anni. Anche all'interno di un singolo vigneto la popolazione di isolati di LN non si presentava uniforme dal punto di vista genetico, e tale variabilità si manteneva costante nel tempo nei diversi ambienti. Sono state identificate specie vegetali spontanee ospiti di LN che potrebbero avere un ruolo nella sua epidemiologia; è stato evidenziato il ruolo fondamentale di una corretta gestione delle infestanti nei vigneti per il contenimento della malattia in vite.

Per quanto riguarda i potenziali vettori di LN, è stato svolto un campionamento delle forme giovanili di insetti appartenenti alla famiglia Cixiidae dalla metà di maggio alla metà di luglio, sugli apparati radicali di piante erbacee spontanee quali ortica (*Urtica dioica*), convolvolo (*Convolvulus arvensis*) e artemisia (*Artemisia verlotiorum*). Le forme adulte di tali insetti sono invece state raccolte da maggio a ottobre con retino entomologico, su piante erbacee e arboree, e determinate in laboratorio. Gli esemplari sono stati sottoposti a estrazione del DNA e Real-time PCR per l'identificazione del fitoplasma agente causale del LN. Il campionamento con retino ha consentito di catturare 319 esemplari appartenenti alle specie: *H. obsoletus* (su ortica e convolvolo), *Hyalesthes scotti* (su olmo, salice e susino), *Hyalesthes luteipes* (su olmo), *Cixius wagneri* (su olmo), *Reptalus cuspidatus* (su *A. verlotiorum*), *Reptalus melanochaetus* (su olmo), *Reptalus. panzeri* (su rovo bluastro) e *Reptalus quinquecostatus* (su olmo). Il ritrovamento di forme giovanili sulle radici ha confermato *A. verlotiorum* come pianta ospite per *R. cuspidatus* e il convolvolo per *H. obsoletus* (quest'ultimo in passato allo stadio giovanile era stato rinvenuto solo sulle radici dell'ortica). Dopo analisi PCR sono risultati positivi a fitoplasmici agenti di LN le seguenti specie: *H. obsoletus*, *H. scotti*, *H. luteipes* e *R. cuspidatus*.

Inoltre, è stata effettuata una caratterizzazione molecolare delle seguenti specie: *H. obsoletus*, *H. scotti*, *H. luteipes*, *R. cuspidatus*, *R. melanochaetus*, *R. panzeri* e *R. quinquecostatus*. Dal momento che le diverse specie del genere *Hyalesthes* non sono facilmente distinguibili tra loro semplicemente osservandole al microscopio, e lo stesso vale per le specie appartenenti al genere *Reptalus*, tale studio è servito a predisporre due chiavi di identificazione molecolare, una per le quattro specie di *Reptalus* e una per le tre specie di *Hyalesthes* più frequenti negli agroecosistemi vigneto. È stata evidenziata l'assenza di variabilità intra-specifica in *H. obsoletus*, con particolare riferimento alle popolazioni ottenute da ortica e da convolvolo.

Infine l'identificazione molecolare può essere applicata agli stadi giovanili, privi di tratti morfologici distintivi, consentendo di ampliare il periodo di monitoraggio degli insetti vettori e permettendo l'inequivocabile associazione di ciascuna specie con l'effettiva pianta ospite. Le nuove chiavi potranno pertanto facilitare l'attività di monitoraggio dei potenziali vettori di legno nero.

## ■ La termoterapia del materiale vivaistico

Dal 2004 sono in corso studi finalizzati all'**ottimizzazione della tecnica di termoterapia in acqua** per l'ottenimento di materiale di moltiplicazione viticolo esente da fitoplasmi. Tali studi hanno potuto realizzarsi grazie alla messa in servizio presso il CEPREMAVI di una apposita apparecchiatura finanziata dai Vivaisti Piemontesi associati alla Vignaioli piemontesi.

La sperimentazione ha permesso di acquisire la necessaria esperienza nella gestione della termoterapia in acqua, evidenziando l'**idoneità del trattamento a 50°Cx45'** sia effettuato sul materiale di moltiplicazione prima dell'innesto sia sulle barbatelle innestate prima della commercializzazione. Prove preliminari hanno indicato anche la **praticabilità del trattamento a 52°Cx45'**, che pare più efficace nell'eliminazione del legno nero, ma con qualche cautela in più per evitare riduzioni nella resa se applicato a cultivar considerate sensibili.

Sulla scorta dell'esperienze maturate negli anni precedenti, la sperimentazione condotta nel corso del triennio 2007-2009 è proseguita per cercare di dare risposte alle seguenti domande.

### La durata della frigo-conservazione del legno dopo la termoterapia in acqua comporta effetti negativi sulla resa vivaistica?

L'esperienza è stata condotta per due anni (2008 e 2009) sottoponendo un migliaio di marze clonali di Barbera e Nebbiolo, ed i rispettivi portinnesti, a termoterapia in due date differenti in modo che metà del materiale subisse **circa due mesi di frigo-conservazione** prima della propagazione per innesto e la restante metà solo 1 giorno. L'obiettivo era quello di verificare sulla resa vivaistica l'effetto congiunto della termoterapia e della durata della frigo-conservazione del materiale di propagazione.

Nel 2008 è stato adottato il trattamento termoterapico più severo a 52°Cx45' effettuato rispettivamente in data 14/02 e 27/03. L'innesto del materiale è stato eseguito il 28/03. Dopo il periodo di forzatura gli innesti-talea sono stati posti in vivaio per poi essere estirpati in autunno. La durata del periodo di frigo-conservazione dopo il termotrattamento in acqua **non ha evidenziato differenze sensibili** tra le diverse tesi, anche se quest'ultimo ha penalizzato la resa vivaistica che si è attestata per entrambe le cultivar su un modesto 50 % di barbatelle di prima scelta.

Nel 2009 è stato adottato il trattamento tradizionale a 50°Cx45' effettuandolo rispettivamente in data 16/02 e 7/04. La resa vivaistica è nettamente migliorata (tra il 60 e l'80 %) ma anche in questo caso i dati non hanno consentito di fornire un'indicazione precisa su quale tra le due modalità sia preferibile adottare.



Figura 5

Particolare della vasca per termoterapia in acqua.

In linea generale quindi si può concludere che la diversa **durata di frigoconservazione** in relazione al momento del termotrattamento in acqua è **risultata ininfluente** sulla resa vivaistica finale.

## Quali modificazioni fisiologiche e biochimiche avvengono nel materiale sottoposto a termoterapia?

Nel corso della prova del 2009 sopra descritta sono anche stati condotti studi per esaminare **l'evoluzione delle riserve glucidiche del materiale legnoso termotrattato**. Le talee legnose di Nebbiolo e Barbera, raccolte in febbraio e conservate in frigorifero per pochi giorni, hanno rappresentato il punto di partenza dell'analisi (tesi 1). Altre tesi erano rappresentate dal materiale termotrattato (50°C x 45'):

- materiale trattato in febbraio (tesi 2) e quindi frigoconservato fino ad aprile (tesi 4);
- materiale mantenuto in cella frigorifera fino al trattamento termico tardivo avvenuto in aprile (tesi 3).

Parte del materiale (controllo) è stato frigoconservato per l'intero periodo senza subire trattamenti termici (tesi 5).

Le analisi sono state effettuate presso il Laboratorio della Camera di Commercio di Torino in febbraio (tesi 1 e 2) e in aprile (tesi 3, 4 e 5). Un elemento comune alle due cultivar è stata la variazione dei contenuti di zuccheri ed amido del materiale stoccato in frigorifero tra febbraio ed aprile (tesi 1 vs tesi 5): le percentuali dei vari zuccheri presenti diminuiscono a fronte di un aumento dell'amido. Questi andamenti indicano una parziale conversione della frazione solubile in amido, che secondo la letteratura avviene nelle piante coltivate in campo nel periodo gennaio-marzo (2ª parte dell'inverno). In linea generale **la termoterapia ha causato una riduzione del contenuto in glucidi solubili**. Un altro aspetto è il calo drastico del contenuto in zuccheri quando il materiale è stoccato per due mesi in frigorifero dopo la termoterapia precoce (tesi 2 vs tesi 4). L'effetto del trattamento termico sulla percentuale di amido invece non è risultato univoco; la variabilità osservata potrebbe essere giustificata da una maggiore eterogeneità della presenza di amido nella pianta e conseguentemente nel materiale di partenza.

Il germogliamento di talee uninodali sottoposte agli stessi trattamenti ha confermato quanto già osservato in precedenza: **la termoterapia causa un ritardo nel germogliamento** a 8 giorni nella cv Barbera, mentre per il Nebbiolo le differenze non sono apprezzabili. I dati raccolti in vivaio negli anni di sperimentazione della termoterapia in acqua hanno sempre mostrato come l'iniziale ritardo del materiale trattato venga **rapidamente recuperato con l'avanzare della stagione**.

I risultati di un anno di sperimentazione non sono esaustivi, dato anche il numero di fattori endogeni ed esogeni che influiscono sulle dinamiche dei carboidrati nella pianta. In ogni caso le variazioni osservate non paiono avere avuto influenza sulla resa vivaistica del materiale trattato, che – come sopra riportato - non è risultata diversa da quella dei controlli.

### **La termoterapia in acqua su barbatelle innestate con presenza di fitoplasmosi può avere un effetto risanante?**

La prova è stata condotta su scala semi-industriale con alcune migliaia di barbatelle innestate in cui erano state riscontrate un certo numero di piantine con sintomi riferibili sia ad FD che a LN, infezioni poi confermate dall'analisi. Nel 2007 le barbatelle sono state sottoposte a tesi di trattamento (testimone, 50°Cx45' e 52°Cx45') e rimesse in campo per un secondo anno di vivaio in condizioni controllate per minimizzare le reinfezioni. Il monitoraggio del barbatellaio nel corso della stagione vegetativa ha evidenziato la ricomparsa di sintomi in numerose piantine della tesi testimone (pari allo 0,8 %), di una sola piantina sintomatica nel 50°Cx45' (pari allo 0,01 %) e di nessuna nella tesi 52°Cx45'.

**Tali risultati confermano** da un lato la possibilità, pur numericamente modesta, di diffondere l'infezione tramite il materiale vivaistico a causa di fenomeni di latenza e dall'altro **l'utilità di un trattamento termoterapico preventivo.**

Analogamente nella primavera 2008 sono state termotrattate in acqua (testimone non trattato, 50°Cx45' e 52°Cx45') barbatelle innestate di Chardonnay in cui nel corso dell'estate precedente erano stati segnalati casi positivi di LN. Tali barbatelle, nell'ordine di oltre un migliaio, dopo il trattamento sono state rimesse in vivaio in luogo controllato. Il monitoraggio effettuato nel corso della stagione vegetativa però non ha riscontrato sintomi potenzialmente riferibili a fitoplasmi. Il vivaio è stato mantenuto in sede senza effettuare l'estirpo e nel corso del 2009 è proseguito il monitoraggio sulla comparsa tardiva di eventuali sintomi senza peraltro riscontrare manifestazioni ascrivibili a fitoplasmi.

### **La termoterapia in acqua è efficace anche nei confronti del Legno nero?**

Esperienze precedenti hanno indicato che con la termoterapia in acqua il LN viene eliminato dal materiale di propagazione con maggior difficoltà rispetto alla FD. Al fine di individuare un trattamento in grado di garantire

l'idoneità del materiale anche nei confronti del LN si è testata l'efficacia risanante del trattamento a 52°Cx45'.

A tal fine materiale legnoso prelevato con la potatura da 12 ceppi di svariate cultivar che nell'anno precedente erano risultate infette da Legno nero è stato sottoposto nel 2008 al trattamento termoterapico in acqua a 52°Cx45'.

Una quota corrispondente di materiale non è stato trattato per fungere da testimone. Per ciascuna tesi oltre un centinaio di talee bigemma è stato posto in vaso e collocato in una apposita serra a prova di insetto. Le analisi di laboratorio (PCR-*nested* seguita da RFLP) hanno evidenziato la presenza di 9 campioni infetti da LN nelle piante testimoni (pari al 7,8 % del totale) mentre tutte quelle delle tesi termotrattate sono risultate negative (*Tabella 3*). Va sottolineato inoltre che considerando solo lo Chardonnay, la trasmissione nelle talee non trattate è risultata ben superiore rispetto alle altre cultivar con il 35,3 % di piantine positive sul totale di quelle messe in vaso.

Nel 2009 tutte le piante in vaso sono state nuovamente sottoposte a diagnosi tramite PCR evidenziando la positività al Legno nero in altri due campioni delle tesi non trattate (quindi sfuggiti ai controlli '08) mentre i test di tutte le piante originate dalle talee trattate a 52°Cx45' si sono confermati negativi.

**Il termotrattamento in acqua a 52°Cx45' si è quindi rilevato efficace nell'eradicazione del LN** e pertanto se ne consiglia l'utilizzo in tutte le situazioni ad alto rischio di diffusione della malattia, anche se questo può potenzialmente comportare un abbassamento della resa vivaistica.