



## Piano per il contrasto alla diffusione delle patologie della vite

### Azione 1. Ricerca e Sperimentazione

**Titolo:** Studi epidemiologici sulla flavescenza dorata: valutazione sull'efficienza di trasmissione di *Scaphoideus titanus* in diversi genotipi di vite e ruolo dei potenziali vettori

**Proponente:** Università degli Studi di Verona - Dipartimento di Biotecnologie Università degli Studi di Verona

**Durata del progetto:** 2022-2024

### PREMESSA

I fitoplasmi sono piccoli batteri privi di parete, che sopravvivono in natura solo nei vasi conduttori (floemi) delle piante infette o nel corpo dei loro vettori. In questa attività parassitaria essi sono estremamente specializzati e in grado di modificare il metabolismo della pianta e del vettore a proprio vantaggio (Sugio *et al.*, 2011). La suscettibilità/tolleranza di una cultivar di vite alla Flavescenza dorata (FD) svolge un ruolo importante nell'influenzare la percentuale di vettori infetti dal fitoplasma agente della malattia (FDP) e quindi condizionare la capacità di diffusione del giallume nei vigneti (Bressan *et al.*, 2007). L'efficienza di trasmissione è in relazione alla quantità di fitoplasma all'interno della fonte di inoculo, che è maggiore nelle cultivar suscettibili rispetto a quelle tolleranti (Galetto *et al.*, 2014), ma soprattutto in relazione al rapporto tra cultivar e vettore (Galetto *et al.*, 2016). È stato dimostrato che la fase di nutrizione floematica dello *Scaphoideus titanus* è molto diversa da cultivar a cultivar (Ripamonti *et al.*, 2022) e quindi anche varietà che supportano una bassa moltiplicazione di FDP (tolleranti) possono essere buone fonti di infezione per il vettore. Queste informazioni sono presenti in letteratura per alcune cultivar internazionali (Eveillard *et al.*, 2016) e per varietà di vite delle regioni del Nord-Ovest (Ripamonti *et al.*, 2021) mentre sono assenti per le principali cultivar locali Venete apparentemente sia suscettibili (es. Glera e Garganega) che tolleranti (Corvina, Corvinone, Rondinella) e per gli incroci resistenti a peronospora e/o oidio (viti Piwi, Cabernet Cortis, Artaban, Solaris, Pannonia, Soreli) spesso impiegati in ambienti fortemente antropizzati.

Da ricerche finanziate dal Servizio Fitosanitario della Regione Veneto (Ricerca delle cause associate alle nuove epidemie di Flavescenza dorata della vite in Veneto - FD.NEW) emerge che le recrudescenze di FD che si stanno manifestando in numerose aree viticole nel Veneto sono ascrivibili principalmente alla diminuita disponibilità di insetticidi efficaci per il contenimento del vettore e alla presenza di vigneti non trattati che fungono da serbatoi di FDP per *S. titanus*. In alcuni vigneti però la presenza del principale vettore è assente o fortemente limitata mentre sono risultate infette altre cicaline potenziali vettrici di FDP a vite: *Orietus ishidae*, già conosciuto



come vettore di FD a vite (Lessio et al 2019); *Phlogotettix cyclops*, sospetto vettore di FD (Strauss e Reisenzein 2018); *Allygus* spp, già identificato come potenziale vettore di FD dall'ambiente boschivo alla vite (Malembic Maher et al, 2020) e *Hishimonus hamatus*, cicalina esotica da poco arrivata in Italia, presente nei vigneti e ritrovata positiva a FDP (Belgeri et al., 2022).

### SCOPO DEL PROGETTO

La conoscenza della suscettibilità alla Flavescenza dorata e dell'interazione con lo *Scaphoideus titanus* delle diverse varietà di vite coltivate in Veneto è di fondamentale importanza per valutare la capacità di diffusione del giallume nei vigneti.

Inoltre, l'assenza di *S. titanus* in vigneti dove la malattia è in fase epidemica impone lo studio del ruolo epidemiologico delle cicaline recentemente ritrovate abili a veicolare e/o trasmettere il fitoplasma agente della malattia.

Il progetto si compone di due parti:

- valutazioni sull'efficienza di trasmissione di *Scaphoideus titanus* in diversi genotipi di vite
- ruolo epidemiologico dei nuovi vettori

### Azione 1: Valutazioni dell'efficienza di trasmissione di *Scaphoideus titanus*

#### Analisi efficienza inoculazione

Piante di varietà prescelte saranno allevate in vaso in ambiente controllato, e infettate artificialmente con adulti di *S. titanus* provenienti da allevati su viti sintomatiche e con nota concentrazione di fitoplasma. La scelta delle varietà da saggiare comprenderà:

- tre cultivar tipiche del territorio regionale che manifestano apparentemente una ridotta sensibilità alla malattia (Corvina, Oseleta, Corvinone)
- una cultivar tipica del Veneto particolarmente sensibile (Garganega)
- un vitigno internazionale ampiamente coltivato anche in Veneto, sensibile (Pinot Grigio)
- un vitigno internazionale ampiamente coltivato anche in Veneto, poco sensibile (Merlot)
- una varietà resistente ad altre patologie, iscritte al registro varietale italiano (Sauvignon Kretos, .
- un portainnesto ampiamente coltivato in Veneto (Kober 5BB)

Verranno impiegate dieci piante per vitigno che saranno mantenute in condizioni controllate a temperatura costante di 25°C, ottimale per la moltiplicazione del fitoplasma (Salar et al., 2013).

Dopo il periodo di trasmissione (almeno 1 settimana), per ciascun vitigno, sarà calcolata la percentuale di piante che si infettano mediante test molecolare e sarà misurata la concentrazione di



fitoplasma in ciascuna pianta a 5 e 15 settimane dopo l'infezione, mediante Real-time PCR sul gene *tuf*, presente in singola copia nel cromosoma del fitoplasma (Malembic-Maher, 2008; Eveillard et al., 2016). Tali attività verranno effettuate in collaborazione con l'Università di Padova (DAFNAE) per quanto riguarda la parte entomologica e le indagini sui vitigni internazionali e con il CREA-VIT di Conegliano per le indagini sul portainnesto e la caratterizzazione dei fitoplasmi.

#### Analisi efficienza acquisizione

Parallelamente, verrà indagata la capacità di acquisizione del fitoplasma agente della FD da parte di *S. titanus* sui sopracitati vitigni. Su viti sintomatiche in pieno campo o sulle piante in vaso preventivamente inoculate e risultate positive, verranno confinati (per almeno 2 settimane) giovani e adulti di *S. titanus* non infetti provenienti da allevamenti di laboratorio. Sulle viti fonte di inoculo e su tutti gli insetti saranno condotte indagini di laboratorio per valutare la quantità di fitoplasma che è stata acquisita dalla cicalina, valutata con la stessa metodica Real-time PCR impiegata per le piante. Tali attività verranno effettuate in collaborazione con l'Università di Padova (DAFNAE) per le indagini sui vitigni internazionali e con il CREA-VIT di Conegliano per le indagini sul portainnesto e la caratterizzazione dei fitoplasmi.

#### Risultati attesi

La veloce diffusione della FD e la gravità delle manifestazioni del giallume stanno inducendo molti viticoltori all'estirpazione dei vigneti, senza tuttavia di risolvere il problema e senza alcuna garanzia che le piante successivamente reimpiantate non soffrano nel breve-medio periodo della stessa patologia.

Le indagini forniranno indicazioni rigorose in merito alla effettiva suscettibilità a FD delle varietà locali in esame, ed informazioni preliminari in merito ai meccanismi sottesi, in particolare su: i) eventuali difficoltà di trasmissione da parte del vettore, e/o b) eventuale capacità della pianta di inibire la moltiplicazione del patogeno trasmesso. Queste indicazioni pratiche potranno essere sfruttate nella scelta varietale all'impianto, o nella disposizione delle diverse varietà nel vigneto, per ostacolare la diffusione della malattia.

Le ricerche sul portainnesto forniranno chiare indicazioni sul potenziale rischio di infezione in vigneto derivante da fonti esterne quali dei vigneti incolti e/o inselvaticiti. In tal modo si potrà valutare numericamente il reale rischio di infezione da parte delle fonti secondarie di inoculo potenziale rispetto a quelle interne al vigneto, così da capire se sia utile mettere in atto strategie agronomiche di contenimento verso tali ospiti alternativi nel territorio veneto



**Azione 2: Ruolo epidemiologico dei nuovi vettori**Analisi capacità sopravvivenza su vite dei nuovi vettori

Individui di *Orietus ishidae*, *Phlogotettix cyclops*, *Neoliturus fenestratus* e *Hishimonus hamatus* verranno catturati nei vigneti del progetto FD.NEW dove è stata rilevata nel 2021 una loro elevata presenza (Es. Noventa di Piave (VE) per *N. fenestratus* (598 esemplari), Montebello Vicentino (VI) per *P. cyclops* (387 individui)) Circa 100 adulti per ogni specie verranno confinati su 10 viti (5 cultivar Chardonnay e 5 Merlot) in vaso allevate in gabbie di rete anti-insetto. Dopo l'immissione, quotidianamente, verranno contati in numero di individui morti all'interno di ogni gabbia. Il campionamento verrà effettuato fino alla morte di tutti gli insetti confinati.

Analisi capacità acquisizione fitoplama dei nuovi vettori da diverse fonti di FD

Adulti di *O. ishidae*, *P. cyclops*, *N. fenestratus* e *H. hamatus*, verranno confinati su viti sintomatiche e positive alla FD. Come fonte di inoculo verrà impiegata una varietà sensibile e con alto titolo di fitoplasma (Indagini Azione 1). Il periodo di acquisizione sarà in relazione alla capacità di sopravvivenza dimostrata su vite. Inoltre, in collaborazione con il CREA-VIT di Conegliano verranno condotte prove di acquisizione confinando i potenziali vettori sulle loro piante ospiti che risulteranno fonti di inoculo di FD. In particolare, per *O. ishidae* verranno indagate *Quercus* spp., *Betula* spp., *Corylus* spp., *Salix* spp. *Alnus glutinosa*; per *P. cyclops* *Ulmus* spp. e *Clematis vitalba*, per *N. fenestratus* *asteraceae* e per *H. hamatus* *Ligustrum lucidum* e *L. japonicus*.

Su vite verranno condotte almeno 10 prove di acquisizione con 100 individui per ogni specie, per le fonti di inoculo di FD diverse da vite, il numero sarà in relazione a quante piante ospiti positive saranno disponibili. In ogni caso si cercherà di eseguire almeno 10 prove di acquisizione per specie di vettore/fonte di inoculo

Analisi capacità di trasmissione FD dei nuovi vettori a vite

Con i dati delle indagini di sopravvivenza e di acquisizione delle 4 specie saranno organizzate prove di trasmissione diretta a vite impiegando viti micropropagate e talee autoradicate di cultivar sensibili alla FD. Verranno condotte almeno 10 prove per ogni singola specie.

Le prove di acquisizione e di trasmissione saranno supportate da analisi molecolari per la quantificazione (estrazione del DNA e l'amplificazione tramite real time PCR) e caratterizzazione genetica (PCR nested, RFLP, sequenziamento, allineamento) del fitoplasma sia sulle viti che sugli insetti



Risultati attesi

La quantificazione del ruolo epidemiologico nella diffusione della Flavescenza dorata delle cicaline dimostrate essere in grado di trasmettere (*O. ishidae*) o di veicolare (*P. cyclops*, *N. fenestratus* e *H. hamatus*) il fitoplasma agente della malattia è di fondamentale importanza per la pianificazione di adeguate strategie di difesa territoriali contro il giallume. Infatti dai dati preliminari del progetto FD.NEW si evidenzia come in alcuni vigneti la FD sia in espansione nonostante la non presenza di *S. titanus*. I dati sulla capacità di acquisizione da vite o da fonti esterni il vigneto consentiranno la definizione delle specie vegetali che possono venire impiantate ai bordi del vigneto come aree di compensazione ecologica o per azioni di sostenibilità ambientale (necessarie per l'autorizzazione a nuovi impianti) senza impatti negativi sullo stato fitosanitario del vigneto.

**Azione 3: Divulgazione dei risultati e formazione dei tecnici e viticoltori locali**

I risultati delle ricerche saranno prontamente trasferiti agli operatori del settore vitivinicolo per una pronta risposta alla emergenza fitosanitaria causata dalla recrudescenza della FD. Sotto la direzione della U.O. Fitosanitario del Veneto ed in collaborazione con DAFNAE-UNIPD e CREA-VIT verranno organizzati incontri locali nelle diverse aree produttive del Veneto.

In collaborazione con la U.O. Fitosanitario del Veneto verranno inoltre organizzati incontri di formazione dei tecnici e consulenti con lezioni teoriche e con esperienze pratiche di laboratorio e di campo, es. per i nuovi vettori sarà necessaria la formazione sul riconoscimento e sulla biologia.



<b>Costi previsti per la realizzazione del Progetto</b>			
<b>Descrizione spese</b>	<b>Importo</b>		
	<b>2022</b>	<b>2023</b>	<b>2024</b>
Costi a carico della Regione del Veneto			
- Personale	24.000	24.000	24.000
- Missioni	1.500	3.000	2.000
- Materiale di consumo	3.500	4.000	2.000
- Servizi esterni		500	500
- Oneri e Spese generali	3.480	3.780	3.450
<b>Totale costi a carico della Regione del Veneto</b>	<b>32.480</b>	<b>35.280</b>	<b>33.040</b>
Costi a carico dell'Università di Verona			
- Personale	6.650	6.650	6.650
- Missioni			
- Materiale di consumo			
- Servizi esterni			
- Oneri e Spese generali			
<b>Totale costi a carico dell'Università di Verona</b>	<b>6.650</b>	<b>6.650</b>	<b>6.650</b>
<b>Totale costi annui progetto</b>	<b>39.130</b>	<b>41.930</b>	<b>39.690</b>
		<b>Totale complessivo</b>	<b>120.750</b>

## BIBLIOGRAFIA

Belgeri et al., First report of Flavescence dorée phytoplasma identification and characterization in three species of leafhoppers. *Journal of Plant Pathology* (2022), 104:375–379, <https://doi.org/10.1007/s42161-021-01012-y>.

Bressan *et al.*, Acquisition efficiency of Flavescence dorée phytoplasma by *Scaphoideus titanus* Ball from infected tolerant or susceptible grapevine cultivars or experimental host plants. *Vitis* (2005), 3:143–146.

Eveillard et al., Contrasting Susceptibilities to Flavescence Dorée in *Vitis vinifera*, Rootstocks and Wild *Vitis* Species. *Frontiers in plant Science* (2016) Volume7-Article1762, doi: 10.3389/fpls.2016.01762.

Galetto et al., Acquisition capability of the grapevine Flavescence doree by the leafhopper vector *Scaphoideus titanus* Ball correlates with phytoplasma titre in the source plant. *J Pest Sci* (2014) 87:671–679, DOI 10.1007/s10340-014-0593-3.



Galetto et al., Acquisition of Flavescence Dorée Phytoplasma by Scaphoideus titanus Ball from Different Grapevine Varieties. *Int. J. Mol. Sci* (2016), 17, 1563, doi:10.3390/ijms17091563

Lessio et al., Development, Spatial Distributon, and Presence on Grapevine of Nymphs of *Orientalis ishidae* (Hemiptera: Cicadellidae), a New Vector of Flavescence Dorée Phytoplasmas. *Journal of Economic Entomology*, (2019) 112(6), 2558-2564.

Malembic-Maher et al., When a Palearctic bacterium meets a Nearctic insect vector: Genetic and ecological insights into the emergence of the grapevine Flavescence dorée epidemics in Europe. *PLOS Pathogens*, (2020) 16(3): e1007967.

Malembic-Maher et al., A chromosome map of the Flavescence doree phytoplasma. *Microbiology* (2008) 154, 1454–1463.

Ripamonti et al., Susceptibility to flavescence dorée of different *Vitis vinifera* genotypes from north-western Italy. *Plant Pathology* (2021), 70:511–520, DOI: 10.1111/ppa.13301.

Ripamonti *et al.*, Leafhopper feeding behaviour on three grapevine cultivars with different susceptibilities to Flavescence doree. *Journal of Insect Physiology* (2022) Volume 137- 104366

Salar et al., Multiplication kinetics of Flavescence dorée phytoplasma in broad bean. Effect of phytoplasma strain and temperature. *Eur. J. Plant Pathol.* (2013) 135, 371–381.

Strauss & Reisenzein. First detection of Flavescence dorée phytoplasma in *Phlogotettix cyclops* (Hemiptera, Cicadellidae) and considerations on its possible role as vector in Austrian vineyards. *Integrated Protection in Viticulture IOBC-WPRS Bulletin* (2018) Vol. 139, 2018 pp. 12-21.

Sugio, et al. Diverse Targets of Phytoplasma Effectors: From Plant Development to Defense Against Insects. *Annu. Rev. Phytopathol* (2011), 49:175–95

