VII INCONTRO NAZIONALE SUI FITOPLASMI E LE MALATTIE DA FITOPLASMI

GRUGLIASCO (TORINO), 11-13 SETTEMBRE 2017



PROGRAMMA SCIENTIFICO E ABSTRACT

Con il Patrocinio di:

Comitato scientifico

Alberto Alma
Marina Barba
Assunta Bertaccini
Piero Attilio Bianco
Maurizio Conti
Caio Bruno Faraglia
Rita Musetti
Gianfranco Romanazzi

Comitato organizzatore

Alberto Alma
Domenico Bosco
Luciana Galetto
Elena Gonella
Federico Lessio
Cristina Marzachì
Sabrina Palmano
Mattia Pegoraro
Luca Picciau
Marika Rossi
Rosemarie Tedeschi

Programma scientifico

Lunedì 11 settembre – Grugliasco (TO)	
12:30-14:00	**Registrazioni e aperitivo di benvenuto**
14:00	Saluti ai partecipanti
Sessione 1— Epidemiologia e vettori Moderatori: Marina Barba e Nicola Mori	
14:30	**M. JERMINI**, S. SCHAERER, I.E. RIGAMONTI La flavescenza dorata in Svizzera e gli approcci utilizzati per la sua gestione
15:00	**S. FISCHNALLER**, M. MESSNER, M. PARTH, A. IANESELLI, L. OBKIRCHER, C. KERSCHBAMER, K. JANIK Cattura di vettori (potenzialmente) responsabili per la diffusione del fitoplasma degli scopazzi del melo in Alto Adige
15:15	N. SANDER, **B. PANASSITI**, J. BRENNER, L. SANGELANTONI, K. SCHLINK, S. ÖTTL, S. FISCHNALLER, M. MESSNER, M. PARTH, D. BARTHEL, K. JANIK, F. HARTIG Influenza dei fattori ambientali sulla densità di popolazione dei vettori responsabili della malattia degli scopazzi del melo
15:30	S. MUROLO, V. MANCINI, R. FOGLIA, J. CONCAS, A. SERVILI, **G. ROMANAZZI** Distribuzione spaziale di piante infette da legno nero in quattro vigneti marchigiani cv Chardonnay
15:45	**N. MORI**, F. QUAGLINO, M. FACCINCANI, S. FILISETTI, L. BENEDETTI, P.A. BIANCO Ecologia di *Hyalesthes obsoletus* su *Vitex agnus-castus*
16:00	H. ALIZADEH, F. QUAGLINO, M. AZADVAR, S. KUMAR, A. ALIZADEH, F. BOLBOLI, P. CASATI, **P.A. BIANCO** Identificazione di *'Candidatus* Liberibacter asiaticus' e *'Candidatus* Phytoplasma aurantifolia' in piante del genere *Citrus* spp. affette da deperimento in Iran
16:15	**Coffee Break e sessione poster**
17:15	**A. BERTACCINI**, M. CONTI Cinquanta anni dopo...
17:45	**RIUNIONE GRUPPO FITOPLASMI**

Martedì 12 settembre – Alba (CN)

Sessione 2— Flavescenza dorata
Moderatori: Alberto Alma e Gianfranco Romanazzi

9:40	C. PAGLIARANI, M. VITALI, A. FERRANDINO, C. MORABITO, C. LOVISOLO, **A. SCHUBERT** Il progetto INTEFLAVI: effetti di stress abiotici su viti affette da flavescenza dorata
10:00	**A. ALMA**, F. LESSIO Azioni preventive e pratiche agroecologiche per il contenimento dei vettori di fitoplasmi agenti di giallumi della vite
10:15	**N. BERTAZZON**, P. BAGNARESI, L. FILIPPIN, V. FORTE, E. MAZZUCOTELLI, D. GUERRA, E. ANGELINI Analisi RNASeq dell'interazione tra la vite, il fitoplasma della flavescenza dorata e il suo vettore *Scaphoideus titanus*, in due varietà con diversa sucettibilità alla malattia
10:30	**L. FERRETTI**, L. VIZZACCARO, G. BIANCHI, G. MASON, D. RIZZO, M. CALVI, A. BERTACCINI, E. ANGELINI, P. CASATI Validazione di protocolli per la diagnosi dei fitoplasmi agenti di flavescenza dorata della vite: risultati dal progetto nazionale "ASPROPI"
10:45	**M. ROSSI**, M. PEGORARO, M. RIPAMONTI, A. GIRAUDO, D. BOSCO, C. MARZACHÌ Ruolo degli incolti nell'epidemiologia della flavescenza dorata in Piemonte
11:00	**Coffee Break**
11:30	**F. LESSIO**, L. PICCIAU, E. GONELLA, F. TOTA, A. ALMA Rapporti tra vite e *Orientus ishidae*, nuovo vettore di fitoplasmi agenti di flavescenza dorata
11:45	**E. GONELLA**, E. CROTTI, M. MANDRIOLI, D. DAFFONCHIO, A. ALMA Simbionti del genere *Asaia* produttori di biofilm che interferiscono con la trasmissione di fitoplasmi da parte di cicaline in laboratorio
12:00	**V. TRIVELLONE**, E. ANGELINI, D.A. DMITRIEV, C.H. DIETRICH Relazioni filogenetiche fra specie di Deltocephalinae conosciuti e potenziali vettori di fitoplasmi
12:15	**P. GOTTA**, C. MORONE, I. ALBERTIN, A. DEL VECCHIO Progetti Pilota in Piemonte per la gestione della lotta a flavescenza dorata della vite
12:30	**L. GALETTO**, S. PALMANO, M. RIPAMONTI, C. ROGGIA, D. BOSCO, C. MARZACHÌ Aspetti epidemiologici e qualitativi di viti cv Barbera e Chardonnay risanate da flavescenza dorata
13:00	**Pranzo**
14:00-19:00	**Visita in vigneto a progetti pilota per il contenimento di flavescenza dorata**
20:00	**Cena sociale**

Mercoledì 13 settembre – Grugliasco (TO)

Sessione 3— Interazioni e lotta
Moderatori: Cristina Marzachì e Rita Musetti

9:00	**K. JANIK**, A. MITHÖFER, M. RAFFEINER, H. STELLMACH, B. HAUSE, K. SCHLINK Proteine effettrici di fitoplasma - come "apple proliferation phytoplasma" manipola la sua pianta ospite
9:15	**C. MITTELBERGER**, H. YALCINKAYA, C. PICHLER, J. GASSER, G. SCHERZER, T. ERHART, S. SCHUMACHER, B. HOLZNER, K. JANIK, P. ROBATSCHER, T. MÜLLER, B. KRÄUTLER, M. OBERHUBER Degradazione di clorofilla in foglie di melo e albicocco infette da fitoplasmi
9:30	**G. MORO**, P. PECHER, S. CAPDEVIELLE, A. KLIOT, V. PROTA, S. HOGENHOUT Ruolo dell'effettore SAP11 nella mediazione del rapporto tra fitoplasmi e insetti vettori
9:45	**L. PAGLIARI**, S. BUOSO, S. SANTI, A.C.U. FURCH, M. MARTINI, A. LOSCHI,M. REICHELT, A. MITHÖFER, A.J.E. VAN BEL, R. MUSETTI Interazione pianta-fitoplasmi: limitazione del flusso floematico
10:00	**R. TEDESCHI**, M. MONTI; E. GONELLA, G. MELCHIORI, A. ALMA, M. MANDRIOLI Colture primarie di immunociti di insetti vettori: nuova opportunità per lo studio delle interazioni insetto-fitoplasma
10:15	**Y. ZAMBON**, R. LAURITA, N. CONTALDO, M. GHERARDI, V. COLOMBO, A. BERTACCINI Applicazioni di "plasma activated water" (PAW) a viti infette da fitoplasmi
10:30	**Coffee Break**
11:00	**P. RIOLO**, R.L. MINUZ, V. MANCINI, S. RUSCHIONI, G. ROMANAZZI, N. ISIDORO Risposte olfattive di *Hyalesthes obsoletus* a piante trattate con induttori di resistenza
11:15	S. ABBÀ, L. GALETTO, M. VALLINO, M. TURINA, M. PESANDO, M. ROSSI, M. PEGORARO, D. BOSCO, **C. MARZACHÌ** Strategie di interferenza mediata da RNA per indurre il silenziamento genico nell'insetto vettore di fitoplasmi *Euscelidius variegatus*
11:30	**W. JARAUSCH**, M. FRITZ, R. ARIGOSSI, A. PASSERA, P. CASATI, P.A. BIANCO Batteri endofiti potenziali agenti di biocontrollo nei confronti di fitoplasmi agenti di malattie negli alberi da frutto
11:45	M. PEGORARO, M. ROSSI, N. MORI, L. GALETTO, C. PAGLIARANI, P. BOCCACCI, G. GAMBINO, E. DE PAOLI, C. MARZACHÌ, **D. BOSCO** Le viti risanate da flavescenza dorata sono suscettibili a reinfezioni: prove biologiche e molecolari
12:00	**E. SATTA**, S. PALTRINIERI, N. CONTALDO, A. BERTACCINI Trasmissione di fitoplasmi attraverso il seme

Sessione 4— Nuove segnalazioni, caratterizzazione e diagnosi
Moderatori: Assunta Bertaccini e Paolo Ermacora

12:15	M. ROSSI, S. RIZZA, C. MARZACHÌ, **M. TESSITORI** "Multilocus sequence typing" di ceppi di fitoplasmi 16SrV-C da *Spartium junceum*
12:30	**C. RATTI**, M. TURINA "Spot RT-qPCR": impiego di estratto grezzo e dell'RNA come templato per migliorare la diagnosi dei fitoplasmi
12:45	S. MUROLO, V. MANCINI, J. CONCAS, **G. ROMANAZZI** Caratterizzazione molecolare di '*Candidatus* Phytoplasma solani' in vigneti marchigiani
13:00	**N. CONTALDO**, G. D'AMICO, Y. ZAMBON, A. BERTACCINI Caratterizzazione biologico-molecolare di isolati di fitoplasmi
13:15	**Chiusura lavori**
13:45	**Pranzo**

Elenco poster

1	**D. BARTHEL**, C. KERSCHBAMER, B. PANASSITI, K. JANIK Importanza della fascia oraria di campionamento e dell'altezza della chioma per la determinazione della densità di popolazione dei vettori degli scopazzi del melo
2	N. ARRICAU-BOUVERY, S. DURET, M.P. DUBRANA, B. BATAILLER, D. DESQUÉ, L. BÉVEN, J.L. DANET, M. MONTICONE, **D. BOSCO**, S. MALEMBIC-MAHER, X. FOISSAC La proteina variabile di membrana VmpA del fitoplasma flavescenza dorata interagisce con le cellule dell'insetto vettore *Euscelidius variegatus*
3	M. MARTINI, F. FERRINI, P. SAITONUANG, R. MUSETTI, D. PRATAVIERA, N. LOI, **P. ERMACORA** Fitoplasma della fillodia della cicoria (ChiP) e *Spiroplasma citri* in Friuli Venezia Giulia (Nord-est Italia): un aggiornamento
4	**V. FORTE**, N. BERTAZZON, L. FILIPPIN, L. DALLA CIA, E. ANGELINI *Orientus ishidae* nei vigneti del Veneto orientale
5	**A. GELMETTI**, F. GHIDONI, C. CAINELLI, F. PEDRAZZOLI, M. BOTTURA Fitoplasmi della vite in Trentino: evoluzione, monitoraggi, analisi molecolari
6	**E. GONELLA**, F. LESSIO, F. TOTA, A. ALMA Prevalenza di fitoplasmi riferibili a flavescenza dorata in cicaline vettori in Piemonte
7	**B. JARAUSCH**, S. BIANCU, M. MAIXNER Ricerca di fitoplasmi riferibili a flavescenza dorata e potenziali vettori nella Germania sud-occidentale
8	S. FISCHNALLER, **M. MESSNER**, M. PARTH, K. JANIK Specie di *Cacopsylla* (Hemiptera, Psyllidae) presenti nei meleti in Alto Adige
9	**C. MITTELBERGER**, L. OBKIRCHER, S. ÖTTL, T. OPPEDISANO, F. PEDRAZZOLI, B. PANASSITI, C. KERSCHBAMER, G. ANFORA, K. JANIK Trasmissione transovarica di '*Candidatus* Phytoplasma mali'nel suo vettore *Cacopsylla picta*
10	D. PACIFICO, M. LEGOVICH, L. GALETTO, C. MARZACHÌ, **S. PALMANO** Analisi dell'espressione genica in viti cv Barbera e Nebbiolo risanate da flavescenza dorata
11	**S. PALTRINIERI**, N. CONTALDO, A. BERTACCINI, M.G. BELLARDI Individuazione di fitoplasmi del giallume dell'astro in *Lachenalia* e *Gazania*
12	**M. PARTH**, S. FISCHNALLER, M. MESSNER, A. GRUBER, K. JANIK L'impatto della lotta chimica ai vettori degli scopazzi del melo sulla densità di popolazione degli acari fitoseidi e *Panonychus ulmi* nei frutteti dell'Alto Adige
13	**M. PEGORARO**, D. SANTINI, M. PESANDO, L. GALETTO, D. BOSCO, I. GRIBAUDO, C. MARZACHÌ Studio della suscettibilità a flavescenza dorata di viti Piemontesi
14	F.M. BOCCA, **L. PICCIAU**, A. ALMA Ruolo delle aree non coltivate per il contenimento di cicaline vettori di fitoplasmi nell'agroecosistema vigneto
15	**F. QUAGLINO**, N. MORI, M. FACCINCANI, P. CASATI, T. MARZORATI, S. FILISETTI, A. PASSERA, P.A. BIANCO Variabilità genetica di '*Candidatus* Phytoplasma solani' in viti sintomatiche e asintomatiche
16	**F. QUAGLINO**, P. CASATI, M. FRATTINI, R. TEDESCHI, A. ALMA, P.A. BIANCO Identificazione e caratterizzazione del gene *BI-1* (*bax inhibitor-1*) in fitoplasmi geneticamente distinti
17	R.L. MINUZ, E. RANIERI, S. RUSCHIONI, S. MUROLO, S. CASAVECCHIA, G. ROMANAZZI, N. ISIDORO, **P. RIOLO** Indagini sulle popolazioni di Auchenorrinchi in un vigneto con elevata incidenza di legno nero
18	S. RIZZA, C. MARZACHÌ, **M. TESSITORI** Primer "tengu"-specifici per l'individuazione di fitoplasmi gruppo 16SrI

Comunicazioni orali

La flavescenza dorata in Svizzera e gli approcci utilizzati per la sua gestione

M. Jermini[1], S. Schaerer[2], I.E. Rigamonti[3]
[1]Agroscope Cadenazzo, A Ramèl 18, 6593 Cadenazzo (Svizzera); [2]Agroscope Changins, Route de Duillier 50, 1260 Nyon (Svizzera); [3]Università degli studi di Milano, Dipartimento di Scienze per gli Alimenti, la Nutrizione e l'Ambiente, Via Celoria 2, 20133 Milano

La cicalina *Scaphoideus titanus* (Ball.) fu rilevata per la prima volta in Svizzera nel 1967 nei vigneti del Canton Ticino dove rimase confinata fino al 1996, anno in cui fu ritrovata nelle zone viticole del Canton Ginevra. In seguito a questo ritrovamento si applicò un piano di monitoraggio in tutte le aree viticole svizzere per seguirne l'espansione e che permise di rilevarne la presenza nel 2006 nei vigneti del Lavaux (regione viticola sul lago Lemano). Questa colonizzazione fu frutto di una disseminazione antropica e non di una sua migrazione attiva dal vigneto ginevrino. Oggigiorno *S. titanus* è presente, oltre che in Ticino e Ginevra, nelle aree viticole sul lago Lemano e in Vallese. La flavescenza dorata fu scoperta per la prima volta in Ticino nel 2004 per poi apparire di nuovo nel 2015 nel Lavaux e nel 2016 con un focolaio in Vallese. Questa situazione ha portato a un'estensione del piano di monitoraggio nazionale e a una maggiore sensibilizzazione della filiera produttiva e degli organi ufficiali.

Da subito è emerso come *S. titanus* sia una componente di un sistema complesso ed egli stesso rappresenti un elemento con elevata complessità. Un sistema complesso comprende elementi di incertezza e ne sono stati evidenziati tre: l'incertezza sulle osservazioni e sulle misurazioni, sul comportamento del sistema e infine sul ruolo dell'ambiente. Per affrontare problemi complessi con elevati componenti d'incertezza si è sviluppata e implementata una strategia di gestione adattativa incentrandola su un processo di modellizzazione in grado di accrescere le conoscenze sul funzionamento del sistema. L'applicazione di tale concetto ha permesso di: i) elaborare piani dei campionamento per la stima delle densità delle popolazioni di *S. titanus* e migliorare le tecniche e la metodologia di studio; ii) razionalizzare le operazioni di lotta con lo sviluppo di un modello fenologico, il quale costituisce il punto d'entrata del sistema di gestione adattativa. Il modello integra in modo continuo i dati meteorologici e di monitoraggio così da migliorarne le capacità esplicative e predittive. Esso costituisce pure l'interfaccia tra ricerca, gestione eanalisi del sistema; iii) aumentare la conoscenza nella dinamica delle popolazioni di *S. titanus* grazie allo sviluppo di un modello plurigenerazionale. Questo modello vuole essere uno strumento per l'organizzazione delle attività di monitoraggio e di gestione della lotta, la valutazione della stabilità nel tempo delle popolazioni, il controllo del potenziale di colonizzazione della cicalina e lo sviluppo di strategie di lotta; iv) studiare il ruolo del paesaggio come serbatoio di flavescenza dorata e dei suoi vettori alternativi e putativi.

La strategia di gestione adattativa adottata si è dimostrata valida permettendo di affrontare le molte incertezze associate alle complessità del sistema. Essa ha permesso un miglioramento continuo delle tecniche e delle metodologie, migliorato l'approfondimento delle dinamiche dei modelli d'infestazione permettendo lo sviluppo di attività di controllo razionali e preparando la base per ulteriori studi volti a meglio comprendere la gestione e la dinamica delle popolazioni degli altri elementi che compongono il patosistema della flavescenza dorata.

Cattura di vettori (potenzialmente) responsabili per la diffusione del fitoplasma degli scopazzi del melo in Alto Adige

S. Fischnaller, M. Messner, M. Parth, A. Ianeselli, L. Obkircher, C. Kerschbamer, K. Janik
Centro di Sperimetazione Laimburg, Laimburg 6- Vadena, 39040 Ora (BZ)

Gli scopazzi del melo (AP) sono associati alla presenza di '*Candidatus* Phytoplasma mali' che è elencato nella lista EPPO come patogeno da quarantena. Negli ultimi decenni hanno avuto un impatto devastante sulla melicoltura in diverse zone dell'Alto Adige. Dal 2011 al 2013 nelle zone più colpite la percentuale di alberi visibilmente infetti è aumentata dal 1,1 al 3,2%. Acquisire conoscenze precise sulla biologia e la diffusione degli insetti vettori coinvolti nella diffusione della malattia è fondamentale per implementare strategie fitosanitarie efficienti. È altrettanto importante studiare la possibilità che anche alcune specie di cicaline (Fulgoromorpha e Cicadomorpha) possano essere coinvolte nella diffusione di AP. Dal 2014 al 2016, nell'ambito di un intenso monitoraggio in pieno campo nelle zone più colpite dell'Alto Adige, sono stati catturati ed identificati morfologicamente 7.486 adulti di *Cacopsylla* spp., tra cui 470 *C. melanoneura* e 141 *C. picta*. I dati hanno dimostrato un'apparente diminuzione di *C. picta* negli ultimi due anni, attribuibile al trattamento raccomandato durante la fioritura a partire dal 2013. Nei meleti monitorati la presenza di piante visibilmente colpite da AP è diminuita dallo 0,9% nel 2014 allo 0,15% nel 2016. Negli anni 2014 e 2015 nell'ambito di un'indagine faunistica sulle cicaline (Fulgoromorpha e Cicadomorpha) presenti nel meleto sono stati catturati più di 17.000 individui adulti usando sia il metodo del frappage, sia il retino nelle zone marginali e negli interfilari. L'80% degli esemplari catturati sono stati determinati a livello specifico, identificando 74 specie. Fino al 90% degli esemplari di *C. picta* e *C. melanoneura* catturati sono stati analizzati mediante real-time PCR con l'obiettivo di verificare la presenza di '*Ca*. P. mali'. Nel 22% degli individui di *C. picta* è stato ritrovato il fitoplasma, mentre in *C. melanoneura* la percentuale di individui positivi è risultata inferiore al 1%, indicando un possibile ruolo secondario di quest'ultima nella diffusione della malattia in Alto Adige. Per le successive analisi sono state considerate 20 specie di cicaline secondo criteri predefiniti (abbondanza, frequenza, biologia). Su 2.458 individui analizzati, solo otto sono risultati positivi: confrontando la concentrazione di '*Ca*. P. mali' negli individui di *C. picta* e *C. melanoneura* e nelle cicaline, queste ultime hanno fatto registrare una concentrazione molto più bassa del patogeno.

Questo lavoro è stato realizzato nell'ambito del progetto APPLClust ed è stato cofinanziato dalla Provincia Autonoma di Bolzano-Alto Adige e dal Consorzio Mela Alto Adige.

Influenza dei fattori ambientali sulla densità di popolazione dei vettori responsabili della malattia degli scopazzi del melo

N. Sander[1], B. Panassiti[2], J. Brenner[3], L. Sangelantoni[4], K. Schlink[2], S. Öttl[2], S. Fischnaller[2], M. Messner[2], M. Parth[2], D. Barthel[2], K. Janik[2], F. Hartig[1, 5]

[1]Biometry and Environmental System Analysis, Faculty of Environment and Natural Resources, Tennenbacher Straße 4, 79106 Freiburg i. Br., Germany; [2]Centro di Sperimentazione Laimburg, Laimburg 6, 39040 Ora (BZ); [3]Institute for Alpine Environment, EURAC Research, Viale Druso 1, 39100 Bolzano; [4]Università Politecnica delle Marche, Department of Life and Environmental Science, Via Brecce Bianche, 60100 Ancona; [5]Theoretical Ecology,Faculty of Biology and Pre-Clinical Medicine, University of Regensburg, Universitätsstraße 31, 93053 Regensburg, Germany

La malattia degli scopazzi del melo ("apple proliferation", AP) causa gravi danni economici in molte aree melicole europee ed è associata alla presenza del fitoplasma '*Candidatus* Phytoplasma mali'. Questo patogeno viene trasmesso dalle psille *Cacopsylla melanoneura* (*C. melanoneura*) e *Cacopsylla picta* (*C. picta*) (Hemiptera-Psyllidae). Anche se la lotta contro i vettori è una delle misure principali contro la diffusione di AP, molti aspetti dell'ecologia di questi vettori sono ancora sconosciuti. Gli obiettivi di questo studio sono stati: (1) l'identificazione e la quantificazione di importanti fattori ambientali che si correlano con le densità di popolazione dei vettori e (2) la determinazione dei periodi di migrazione dei due vettori in Alto Adige. Le psille sono state campionate tramite battitura delle branche in 168 meleti tra il 2013 e il 2016 in Alto Adige (Nord-Est Italia). La percentuale rappresentata da ciascuna variabile ambientale all'interno di un'area che circonda i siti di campionamento del vettore è stata quantificata usando un sistema d'informazione geografica. La temperatura media annuale è stata calcolata utilizzando i dati delle stazioni meteorologiche, con i quali sono stati simulati due scenari climatici. Le simulazioni climatiche sono state assegnate ai meleti usando analisi di tipo cluster. Le densità di popolazione dei vettori sono state correlate con le variabili ambientali mediante "habitat modeling" che si basa sull'inferenza di Bayes. Dal risultato di queste analisi si evince che entrambi i vettori differiscono in modo significativo per le loro esigenze di habitat. *C. melanoneura* risultava correlata positivamente con un aumento di orniello e di carpino nero nel raggio di 2,5 km dal sito di campionamento, mentre la densità di popolazione di *C. picta* aumentava in proporzione alla presenza di foreste alluvionali e di foreste di abete rosso di tipo subalpino. La percentuale di piceo-abieteti e pino-piceo-abieti-faggete risultava negativamente correlata con la densità di popolazione di *C. picta*. Inoltre, è stata identificata una maggiore densità di *C. picta* e minore densità di *C. melanoneura* a temperature annuali medie più elevate. Il periodo di migrazione e la presenza di adulti svernanti nei meleti sono diversi per entrambi i vettori e variano tra i diversi distretti dell'Alto Adige. In genere, gli adulti svernanti di *C. melanoneura* sono presenti nei frutteti da metà gennaio a metà maggio; mentre gli adulti svernanti di *C. picta* si manifestano tra metà febbraio e metà luglio. La conoscenza degli effetti dei tipi forestali sulla presenza dei vettori e sulla loro densità di popolazione potrebbe fornire informazioni sui siti di svernamento delle due specie - attualmente sconosciute per l'Alto Adige; e a determinare con maggiore precisione gli spostamenti di queste due specie. I risultati forniscono importanti informazioni sull'ecologia dei vettori e sono la base per la creazione di mappe di rischio e per l'ottimizzazione delle misure contro la diffusione di AP. Questo lavoro è stato realizzato nell'ambito del progetto APPLClust ed è stato cofinanziato dalla Provincia Autonoma di Bolzano-Alto Adige e dal Consorzio Mela Alto Adige.

Distribuzione spaziale di piante infette da legno nero in quattro vigneti marchigiani cv Chardonnay

S. Murolo, V. Mancini, R. Foglia, J. Concas, A. Servili, G. Romanazzi
Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali, Università Politecnica delle Marche, Via Brecce Bianche, 60100 Ancona

Il legno nero (LN), associato alla presenza di '*Candidatus* Phytoplasma solani', è la fitoplasmosi della vite più diffusa negli areali italiani, europei e mediterranei, è in grado di determinare gravi perdite di produzione soprattutto in vitigni pregiati particolarmente suscettibili come quelli della cv. Chardonnay.

Nel periodo estivo-autunnale del 2014, sono stati effettuati sopralluoghi in quattro vigneti commerciali cv. Chardonnay nella regione Marche, durante i quali è stata registrata la presenza dei sintomi e la gravità della malattia, descritta mediante una scala empirica con 5 classi (0 = assenza di sintomi, 1= alcune foglie sintomatiche, 2= un tralcio sintomatico, 3 = diversi tralci con foglie sintomatiche, 4 = sintomi sistemici).

Per poter effettuare un'analisi della distribuzione spaziale delle piante sintomatiche nei vigneti oggetto di studio, la posizione di ciascuna pianta è stata identificata facendo riferimento al numero del filare (X) e alla posizione all'interno del filare (Y). Ciò ha consentito di realizzare mappe bidimensionali che riproducono la distribuzione spaziale delle piante infette nel vigneto, utilizzando il software SYSTAT v.13 (Systat Software Inc.). Lo stesso software ha permesso di realizzare mappe a mosaico del vigneto che oltre a tener conto della posizione delle piante (X, Y), considerano anche i dati di gravità (Z).

Nel vigneto 1, l'infezione di LN è stata pari al 11,7% (204/1744), e la maggior parte delle piante sintomatiche rientravano nella classe 2 (40,2%) e 3 (40,7%).

Nel vigneto 2, su un totale di 2.884 piante monitorate, 259 piante presentavano sintomi ascrivibili a LN (9%), con una gravità che rientrava prevalentemente nelle classi 2 (34,7%) e 3 (46,3%).

Nel vigneto 3, il 15,8% delle piante monitorate (414 piante su 2.614) mostrava sintomi di LN, con una gravità che rientrava prevalentemente nelle classi 2 (26,8%) e 3 (41,1%). Circa il 26% delle piante sintomatiche mostrava sintomi sistemici (classe 4).

Nel vigneto 4, costituito complessivamente da 5.618 piante, sono state individuate 734 piante sintomatiche (13,1%). La maggior parte di queste rientrava nelle classi 3 (37,6%) e 4 (33,5%), seguite dalla classe 2 (25,9%).

In tutti i vigneti oggetto di studio, le piante sintomatiche erano distribuite in modo raggruppato, in quanto l'indice di Morosita, che consente di verificare lo stato di aggregazione, è risultato maggiore di 1. Analizzando la posizione delle viti malate rispetto alla distanza dal bordo dell'appezzamento, nei vigneti 3 e 4 è stata osservata una più elevata pressione di malattia nei filari più esterni rispetto a quelli interni. Inoltre, nei vigneti analizzati, le piante che mostravano i sintomi più gravi di LN erano in genere localizzate verso almeno uno dei bordi. Tale distribuzione delle piante infette in relazione alla gravità dei sintomi sembra confermare la presenza di una naturale fonte di inoculo e l'attività di potenziali vettori nella diffusione del LN.

L'analisi della distribuzione spaziale di LN nei quattro vigneti, associata ai dati di caratterizzazione molecolare di '*Ca*. P. solani', può contribuire alla gestione sostenibile della malattia, che in cultivar suscettibili come Chardonnay può determinare importanti cali di produzione, rendendo in alcuni casi non più economicamente conveniente il prosieguo della coltivazione.

Ecologia di *Hyalesthes obsoletus* su *Vitex agnus-castus*

N. Mori[1], F. Quaglino[2], M. Faccincani[3], S. Filisetti[3], L. Benedetti[4], P.A. Bianco[2]
[1]Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente, Università degli Studi di Padova, Agripolis, viale dell'Università 16, Legnaro (PD); [2]Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali - Territorio, Produzione, Agroenergia, Università degli Studi di Milano, via Celoria 2, 20133 Milano; [3]Consorzio per la tutela del Franciacorta, via G. Verdi 53, 25030 Erbusco (BS); [4]Dipartimento di biotecnologie, Università degli Studi di Verona, Strada Le Grazie 15, 37134 Verona

Il legno nero è un giallume della vite associato alla presenza di '*Candidatus* Phytoplasma solani' ed è un importante fattore limitante per la produzione vitivinicola in Europa. L'omottero Cixiide *Hyalesthes obsoletus* Signoret è il principale insetto vettore responsabile della diffusione del fitoplasma agente della malattia.
Le piante ospiti del vettore e serbatorio del fitoplasma sono principalmente *Urtica dioica* e *Convolvulus arvensis* in Europa centrale ed occidentale. In Israele il Ciixide completa il proprio ciclo vitale anche su *Vitex agnus-castus*, pianta che recentemente è stata ritrovata infetta da '*Ca.* P. solani' nell'Est europa. Questo arbusto in Italia è diffuso nelle regioni centro-meridionali e nelle zone costiere.
Nel presente lavoro sono state studiate le interazioni tra *V. agnus-castus* e *H. obsoletus* mediante prove di sopravvivenza, attrattività ed ovideposizione. Le indagini hanno previsto il confronto di *V. agnus-castus* con *U. dioica* e *V. vinifera*.
Dai dati raccolti è emerso che gli adulti di *H. obsoletus* sono in grado di sopravvivere sulla verbenacea e su vite per una settimana nonostante il cambio repentino di alimentazione, essendo stati gli individui catturati su ortica subito dopo il loro sfarfallamento. Dai risultati ottenuti dalle prove di attrattività l'agnocasto risulta significativamente preferito alla vite, sia dai maschi che dalle femmine. *H. obsoletus* è in grado di ovideporre e svernare come forma giovanile su agnocasto anche se in misura molto inferiore rispetto all'ortica.
In conclusione, i risultati acquisiti hanno permesso di ottenere maggiori informazioni relative all'ecologia di *H. obsoletus* su agnocasto; ulteriori indagini sono necessarie per determinare il ruolo della verbenacea nell'epidemiologia del legno nero della vite.

Identificazione di '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' e '*Candidatus* Phytoplasma aurantifolia' in piante del genere *Citrus* spp. affette da deperimento in Iran

H. Alizadeh[1], F. Quaglino[2], M. Azadvar[3], S. Kumar[2], A. Alizadeh[1], F. Bolboli[1], P. Casati[2], P.A. Bianco[2]
[1]Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Jiroft, Iran; [2]Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali - Territorio, Produzione, Agroenergia, Università degli Studi di Milano, via Celoria 2, 20133 Milano; [3]Plant Protection Department, South Kerman Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Jiroft, Iran

A partire dal 2010 una nuova malattia denominata "citrus decline disease" (CDD) si è diffusa nel sud della regione del Kerman in Iran. I sintomi, osservabili su diverse specie di *Citrus*, sono: ingiallimenti delle foglie, riduzione del vigore, arresto della crescita e progressivo deperimento della pianta fino alla morte entro 5-6 anni dalla comparsa dei sintomi. In particolare le piante maggiormente suscettibili sono arancio dolce, pompelmo e mandarino innestate sul portainnesto Bakraee.
Poiché i sintomi osservati sono correlabili ad altre malattie descritte su *Citrus* spp e associate a patogeni obbligati quali '*Candidatus* Liberibacter' e '*Candidatus* Phytoplasma' sono state avviate indagini volte ad identificare tali patogeni in piante con sintomi di CDD. Durante un monitoraggio condotto nel mese di marzo 2017 nel sud del Kerman sono state campionate sei piante di *Citrus sinensis* (L.) dal differente stato sanitario. In particolare sono state raccolte radici e foglie da 6 piante con sintomi di CDD e da 3 piante asintomatiche. Il DNA totale estratto dai 18 campioni è stato sottoposto ad analisi PCR al fine di amplificare il gene 16S rRNA sia di batteri appartenenti al genere '*Ca*. Liberibacter', utilizzando la coppia di primer OI1/OI2c sia al genere '*Ca.* Phytoplasma' utilizzando le coppie di primers P1/P7 e R16F2n/R2.
I risultati ottenuti dalle analisi di amplificazione genica indicano la presenza sia di '*Ca.* Liberibacter' sia di '*Ca.* Phytoplasma' in 4 campioni sintomatici. Le restanti due piante sintomatiche erano singolarmente infette o da ,'*Ca*. Liberibacter' o da fitoplasmi. Nessuna amplificazione è stata ottenuta nei campioni asintomatici. In particolare ,'*Ca*. Liberibacter' è stato individuato esclusivamente nei campioni di radici mentre '*Ca.* Phytoplasma' è stato identificato sia nelle radici che nelle foglie campionate.
Il sequenziamento e l'analisi dei 5 frammenti OI1/OI2c ha permesso di identificare la presenza di '*Ca*. Liberibacter asiaticus'. In particolare l'omologia di sequenza dei ceppi identificati nei campioni con sintomi di CDD varia tra il 99,9 e il 100% con i ceppi GFB-Selangor (EU224393) e H36YPENINSULAR (JQ867409). Tale risultato è confermato dall'analisi delle sequenze del gene codificante la proteina ribosomica *rplJ*.
Il sequenziamento e l'analisi dei 6 frammenti R16F2n/R2 ha permesso di identificare '*Ca*. P. aurantifolia', con una omologia di sequenza compresa fra 99,4-99,7% con il ceppo di riferimento WBDL (U15442). L'analisi di restrizione *in silico*, condotta con il software *i*PhyClassifier, ha permesso di attribuire i ceppi fitoplasmatici associati a CDD ai sottogruppi 16SrII-B e -C.
Studi ulteriori saranno svolti per descrivere più accuratamente l'eziologia e l'epidemiologia di CDD.

Cinquanta anni dopo....

A. Bertaccini[1], M. Conti[2]
[1]*DipSA, Patologia Vegetale,* Alma Mater Studiorum *Università di Bologna;* [2] *Istituto di Ricerca sulla Crescita Economica Sostenibile, CNR, Via Real Collegio 30, 10024 Moncalieri (TO)*

Cinquant'anni sono trascorsi da quando un gruppo di ricercatori giapponesi riuscì a chiarire la natura delle malattie note come "aster yellows", i giallumi delle piante che dalla metà circa del secolo scorso tanto interesse avevano attratto da parte di virologi, patologi vegetali e studiosi di discipline affini al fine di comprenderne l'eziologia che risultò, infine, legata alla presenza di microrganismi micoplasma-simili ("mycoplasma-like organisms", MLO), oggi fitoplasmi. La scoperta fu oggetto di pubblicazione nel 1967 e successivamente, nel 1968, presentata in una comunicazione verbale al "1st International Congress of Plant Pathology", a Londra, nella sede del "Victoria and Albert Museum".
La notevole curiosità suscitata dai giallumi delle piante nel mondo scientifico è imputabile innanzi tutto alla insolita, peculiare sintomatologia consistente in alterazioni della vegetazione quali, tra l'altro, virescenza e fillodia dei fiori, produzione abnorme di ricacci ascellari (scopazzi), ingiallimento e/o arrossamento diffuso della pianta, pronunciata riduzione di sviluppo, sterilità. La tipologia dei sintomi e poi la dimostrazione del carattere infettivo dei giallumi con la trasmissione per innesto e successivamente per mezzo di cicaline in modo analogo a quello tipico di alcuni gruppi di virus, quali *Fitoreovirus* e *Rhabdovirus* – avevano indirizzato i fitopatologi alla ricerca di particelle virali nelle piante infette soprattutto mediante microscopia elettronica a trasmissione. L'esito costantemente negativo di queste indagini aveva indotto molti ricercatori a concludere, col tempo, che gli agenti eziologici potessero essere virus indistinguibili dai ribosomi oppure virus "difettivi", ossia privi del capside quindi, in entrambi i casi, non rilevabili al microscopio elettronico.
Sembra che, dato l'esiguo numero di microscopi elettronici allora disponibili, quello impiegato dai ricercatori giapponesi autori della scoperta fosse utilizzato a turno anche da studiosi di altre discipline, soprattutto da medici e veterinari ai quali erano già ben noti i micoplasmi come agenti di infezioni nell'uomo e in altri animali. Proprio un ricercatore veterinario fortuitamente osservò i negativi delle foto del collega fitopatologo e in breve individuò nei vasi cribrosi, e riconobbe immediatamente, quelli che per lui erano micoplasmi. Da questo momento l'interesse per i giallumi delle piante si indirizzò allo studio dei fitoplasmi con ricerche specifiche soprattutto su insetti vettori e modalità di trasmissione. Con l'avvento di metodiche molecolari si sono ottenuti dapprima il differenziamento poi una classificazione preliminare dei fitoplasmi basata sul gene ribosomico 16S come per tutti gli altri batteri. Lo studio dei fitoplasmi è entrato a pieno titolo fra quelli batteriologici per motivi ovvi dovuti alla morfologia di questi procarioti derivanti da batteri Gram positivi che sono però risultati privi di un numero elevato di geni presenti in altri batteri nonché della capacità di sintetizzare una parete. Negli ultimi venti anni il numero delle malattie associate a fitoplasmi è cresciuto esponenzialmente grazie alla diagnostica molecolare, ma le conoscenze biologiche ed epidemiologiche non hanno avuto lo stesso incremento. Sono stati sequenziati i genomi di cinque fitoplasmi e sono state individuate molecole possibili responsabili di alcune delle alterazione dovute alla presenza di fitoplasmi nei tessuti vegetali e/o negli insetti vettori. Si è scoperto che in alcune combinazioni insetto vettore/fitoplasma questi ultimi sono in grado di passare alle nuove generazioni attraverso l'uovo, si è verificata anche la loro trasmissione attraverso il seme, anche se in percentuali solitamente ridotte, e molto recentemente è stato finalmente possibile ottenere i fitoplasmi in coltura su substrati artificiale, primo passo fondamentale per poter finalmente soddisfare i postulati di Kock ed avviare una ricerca mirata ad una puntuale conoscenza della loro biologia per efficiente gestione delle fitopalsmosi.

Il progetto INTEFLAVI: effetti di stress abiotici su viti affette da flavescenza dorata

C. Pagliarani[1], M. Vitali[2], A. Ferrandino[2], C. Morabito[2], C. Lovisolo[2], A. Schubert[2]

[1]*Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante, CNR, Strada delle Cacce 73, 10135 Torino;*
[2]*Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari, Università degli Studi di Torino, Largo Braccini 2, 10095 Grugliasco (TO)*

Il progetto INTEFLAVI (Un approccio integrato alla lotta contro la flavescenza dorata della vite), ha esplorato diverse line di ricerca: caratterizzazione genetica fine del fitoplasma, epidemiologia, comportamento delle piante risanate, lotta simbiotica nel vettore, fisiologia e risposte molecolari della vite all'infezione, al fine di ottenere conoscenze che permettano di sviluppare nuovi metodi di controllo della FD. Questo contributo descrive in particolare studi di espressione genica della vite a seguito di infezione con fitoplasma FDp e risanamento.

Sono stati raccolti campioni fogliari di cv. Barbera in vigneto da piante sane, infette, e risanate. Dopo estrazione di RNA e preparazione delle librerie si è proceduto all'analisi di concentrazione dei trascritti attraverso RNA-seq. In parallelo, è stata studiata l'evoluzione dell'infezione e del risanamento in piante in vaso, infettate e mantenute in condizioni controllate in serra. Queste piante sono state soggette a stress abiotico (alta temperatura, stress idrico, incisione anulare) e su di esse è stata quantificata la concentrazione di FDp e l'espressione di un gruppo selezionato di geni attraverso RT-qPCR:

L'elaborazione dei dati di sequenziamento dei trascritti ha mostrato variazioni significative nell'espressioni di geni legati al metabolismo e trasporto degli zuccheri, e alla biosintesi dei flavonoidi. Nelle piante infettate in condizioni controllate, i trattamenti, e in particolare l'incisione anulare, hanno influenzato il titolo di FDp nelle nervature fogliari e l'espressione di alcuni geni del metabolismo degli zuccheri e dei flavonoidi, suggerendo che le condizioni fisiologiche possono avere un impatto sulla moltiplicazione e diffusione del fitoplasma.

Ringraziamenti: Questo lavoro è parte del progetto "INTEFLAVI" finanziato da Fondazione CRC (Cuneo), CRA (Asti), e CRT (Torino).

Azioni preventive e pratiche agroecologiche per il contenimento dei vettori di fitoplasmi agenti di giallumi della vite

A. Alma, F. Lessio
Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari, Università degli Studi di Torino, Largo Braccini 2, 10095 Grugliasco (TO)

La difesa del vigneto dalle fitoplasmosi, in particolare da flavescenza dorata (FD) e da legno nero (LN) necessita di una strategia d'intervento su diversi fronti, in una visione olistica dell'agroecosistema. Un approccio troppo settoriale risulta insufficiente nella maggior parte dei casi, e porta comunque a risultati parziali. Il punto di partenza in tal senso è costituito dalla scelta del materiale vivaistico, e dall'attenta valutazione ambientale del sito d'impianto. Nel primo caso, è necessario utilizzare materiale esente da fitoplasmi, ricorrendo eventualmente alla termoterapia. Nel secondo, un'elevata presenza di focolai di reinfestazione di *Scaphoideus titanus* Ball, costituiti da vite americana inselvatichita, dovrebbe far ricadere la scelta su vitigni meno sensibili a FD. Inoltre, dato che gli adulti di *S. titanus* tendono a muoversi preferibilmente lungo i filari, l'orientamento dei filari stessi del nuovo impianto in relazione al fronte di un eventuale incolto può favorire (orientamento perpendicolare) o limitare (orientamento parallelo) la colonizzazione del vigneto. L'eliminazione della vite americana dagli incolti circostanti è una pratica basilare per ridurre il rischio di ricolonizzazione, avendo cura di non eseguirla quando sono già presenti gli adulti (luglio-ottobre). Per rendere stabile nel tempo l'eradicazione della vite americana, è utile sostituirla con altre essenze botaniche quali ad esempio miscugli di leguminose, utilizzati anche come flora mellifera. Recenti ricerche hanno dimostrato come tali fasce di bordura, se correttamente gestite, non ospitano altre specie di noti o potenziali vettori di fitoplasmi agenti di giallumi della vite, se non in numero irrisorio. Viceversa, in mancanza di una corretta gestione, può svilupparsi una flora infestante (es. composite, convolvolo, amaranto, ecc.) ospite di vettori noti o potenziali, quali *Dictyophara europaea* (L.), *Hyalesthes obsoletus* Signoret e *Neoaliturus fenestratus* (Herrich-Schaffer). Altre importanti pratiche agronomiche da attuare nei confronti dei vettori di LN (*H. obsoletus*) consistono nella spollonatura della vite e nella gestione della flora erbacea dell'interfila e dei bordi con l'eliminazione delle loro piante ospiti (es. ortica, convolvolo). La stessa scelta della conduzione del vigneto (biologica o convenzionale) lo espone a rischi maggiori o minori in caso di presenza di focolai di reinfestazione di *S. titanus*, in base alla diversa efficacia dei principi attivi insetticidi, utilizzabili in quel determinato contesto, nei confronti degli adulti provenienti dall'esterno. La scelta del momento d'intervento insetticida deve idonei metodi di monitoraggio quali conteggi visivi dei giovani, trappole per gli adulti ed eventualmente impiego di modelli previsionali. In tal senso, nell'ultimo decennio è stato osservato un aumento della presenza di adulti di *S. titanus* nel periodo autunnale (settembre-ottobre) in conseguenza dell'aumento delle temperature: questo aspetto rende spesso necessari trattamenti insetticidi nei confronti degli adulti in tarda stagione, in post-vendemmia o in pre-vendemmia, sempre nel rispetto dell'intervallo di carenza del principio attivo. Infine, risultati interessanti sono attesi dalla ricerca dei limitatori naturali (parassitoidi) di *S. titanus* per una loro eventuale valorizzazione in ambienti incolti di difficile gestione e dove non è possibile l'impiego d'insetticidi, per ridurre la densità di popolazione del vettore.

Analisi RNASeq dell'interazione tra la vite, il fitoplasma della flavescenza dorata e il suo vettore *Scaphoideus titanus*, in due varietà con diversa suscettibilità alla malattia

N. Bertazzon[1], P. Bagnaresi[2], L. Filippin[1], V. Forte[1], E. Mazzucotelli[2], D. Guerra[2], E. Angelini[1]
[1] *Centro di Ricerca Viticoltura ed Enologia;* [2] *Centro di Ricerca Genomica e Bioinformatica*

La diversa suscettibilità ai giallumi osservata sia in condizioni di campo che di laboratorio suggerisce la presenza in diverse varietà di *Vitis vinifera* di specifici tratti genetici associati a suscettibilità/resistenza alla malattia. L'interazione pianta-fitoplasma, in varietà più o meno suscettibili ai giallumi, è stata finora studiata a livello trascrittomico e proteomico su piante che si erano naturalmente infettate in vigneto. Però, per poter comprendere i meccanismi di difesa messi in atto dalle varietà che mostrano una parziale resistenza è molto importante esaminare la reazione della pianta nelle prime fasi dell'infezione.
In questo studio sono stati confrontati i cambiamenti trascrizionali che avvengono nel corso dell'interazione tritrofica "vite – fitoplasma della flavescenza dorata (FD) - vettore *Scaphoideus titanus* (St)" in due varietà di *V. vinifera* (Chardonnay, molto suscettibile, e Tocai friulano, parzialmente resistente), nelle prime fasi dell'infezione, evitando così gli effetti secondari legati alla comparsa dei sintomi della malattia. A questo scopo, piantine micropropagate delle due varietà sono state infettate sperimentalmente con il fitoplasma FD usando insetti vettori allevati in condizioni controllate, e infettati sperimentalmente dopo che avevano acquisito il fitoplasma da foglie di viti infette. Il sequenziamento dell'RNA totale (RNASeq) e la comparazione dei profili trascrittomici ottenuti dalle tre tesi (piante sane, piante sane con vettore sano e piante con vettore infettivo) ha permesso l'identificazione dei geni di vite differenzialmente espressi nelle due varietà in modo costitutivo e in risposta a infestazioni di St e a infezioni di FD, con lo scopo di ricercare meccanismi di difesa passivi o attivi messi in atto dalla varietà parzialmente resistente.
Un totale di 6.233 geni differenzialmente espressi è stato individuato nel confronto tra piante sane di Chardonnay e di Tocai friulano. Quest'ultima varietà ha mostrato un livello di espressione più elevato, rispetto a Chardonnay, di numerosi geni coinvolti in meccanismi di difesa e con possibili funzioni di attrazione o repulsione nei confronti di insetti. Si tratta in particolare di geni associati a meccanismi di trasduzione del segnale, di geni coinvolti nella produzione di metaboliti secondari (fenilpropanoidi, terpenoidi) e di proteine di difesa. Queste osservazioni suggeriscono l'esistenza di strategie di difesa passive messe in atto da parte della varietà parzialmente resistente nei confronti di St o del fitoplasma della FD.
Nelle prime fasi dell'infestazione da parte dell'insetto sano, il numero di geni differenzialmente espressi è molto più elevato in Chardonnay rispetto a Tocai friulano. In particolare, in Chardonnay viene attivata una significativa risposta di difesa che comprende soprattutto la sovraespressione di vari geni coinvolti nelle vie di percezione/trasduzione del segnale e nel metabolismo della parete cellulare.
Nei primi stadi di infezione di FD nella varietà parzialmente resistente sono stati osservati ampi cambiamenti trascrittomici, derivanti dall'interazione pianta-patogeno-insetto, che portano alla rapida produzione di una difesa attiva, basata principalmente sul rimodellamento della parete cellulare. Al contrario, nel genotipo suscettibile è stata rilevata un'attivazione più ritardata delle strategie di difesa, consistenti soprattutto nella sintesi di fitoalessine. La risposta di difesa che veniva rapidamente attivata da Chardonnay in seguito all'infestazione dell'insetto sano sembra quindi essere soppressa dalla presenza del fitoplasma all'interno dell'insetto.

Validazione di protocolli per la diagnosi dei fitoplasmi agenti di flavescenza dorata della vite: risultati dal progetto nazionale 'ASPROPI'

L. Ferretti[1], L. Vizzaccaro[1], G. Bianchi[2], G. Mason[3], D. Rizzo[4], M. Calvi[5], A. Bertaccini[6], E. Angelini[7], P. Casati[8]

[1]CREA – Centro di Ricerca Difesa e Certificazione; [2]ERSA – Servizio Fitosanitario Regione Friuli Venezia Giulia; [3]Settore Fitosanitario e servizi tecnico-scientifici Regione Piemonte; [4]Servizio Fitosanitario Regione Toscana - Laboratorio di diagnostica fitopatologica e di biologia molecolare; [5]ERSAF – Servizio Fitosanitario Regione Lombardia, Laboratorio Fitopatologico c/o Fondazione Minoprio; [6]DipSA - Patologia vegetale, Alma Mater Studiorum*, Università di Bologna; [7]CREA – Centro di Ricerca Viticoltura ed Enologia; [8]DiSAA - Produzione, Territorio, Agroenergia, Università di Milano*

La validazione dei protocolli di diagnosi secondo standard europei (ISO/IEC standard 16140:2003 e 17025:2005; EPPO standard PM7/76-4 e PM7/98-2), rappresenta un aspetto di fondamentale importanza nell'ambito della diagnosi fitopatologica. L'uso di protocolli validati è, infatti, alla base di un'efficiente applicazione delle misure fitosanitarie, garantendo una maggiore affidabilità dei risultati diagnostici ottenuti e la loro confrontabilità, quando prodotti in laboratori diversi ed in diverse condizioni operative. Negli ultimi anni, diversi progetti a livello europeo (Euphresco-FRUITPHYTOINTERLAB, -GRAFDEPI, -GRAFDEPI2) e nazionale (ARON-ARNADIA) hanno riguardato la validazione di protocolli per la diagnosi di patogeni vegetali. Il Progetto Finalizzato ASPROPI, recentemente finanziato dal MiPAAF, ha costituito la naturale prosecuzione dell'attività già svolta nell'ambito del progetto ARON-ARNADIA, avente come obiettivo quello di fornire linee guida per il rilevamento e l'identificazione di patogeni delle piante (funghi, batteri, fitoplasmi, virus e viroidi) ai laboratori preposti alla diagnosi degli organismi di qualità e/o quarantena, presenti sul territorio italiano. Con riferimento ai fitoplasmi, il progetto ha riguardato la validazione di protocolli per la diagnosi dei fitoplasmi agenti di flavescenza dorata (FD) della vite. La scelta delle metodologie diagnostiche da validare e la definizione dei parametri di validazione è scaturita dal lavoro congiunto di un gruppo di lavoro di esperti costituito da varie istituzioni scientifiche di comprovata esperienza nello studio di tale patogeno. Complessivamente sono stati validati 3 protocolli molecolari, includenti: i) due protocolli TaqMan® real time PCR (qPCR) per la diagnosi multipla di FD, legno nero (LN) ed un controllo endogeno di cui, uno con kit commerciale sviluppato da IPADLAB (metodo 1) ed uno secondo la procedura descritta in Angelini *et al*. (2007) (metodo 2) e ii) un protocollo basato su tecnica LAMP con kit commerciale sviluppato da IPADLAB (metodo 3). Per ciascun protocollo, la validazione è stata effettuata attraverso la definizione dei seguenti parametri: sensibilità analitica (limite di rilevabilità), specificità analitica, sensibilità e specificità diagnostica, accuratezza, ripetibilità e riproducibilità. Per l'ottenimento del valore della riproducibilità, ogni protocollo è stato sottoposto ad un "ring test" a cui hanno preso parte 15 laboratori afferenti ai servizi fitosanitari regionali (11) e ad Enti/Istituzioni di ricerca (4). Le prove effettuate con campioni di riferimento "target" e "non-target" hanno evidenziato una maggiore sensibilità analitica dei due metodi qPCR rispetto al metodo LAMP. La valutazione della specificità analitica ha evidenziato per tutti i protocolli una reazione generica nei confronti di fitoplasmi del gruppo 16SrV ed in nessun caso specifica verso i soli fitoplasmi agenti di FD. Complessivamente, i parametri di "performance" del metodo 1 sono risultati superiori rispetto a quelli degli altri metodi valutati, con valori di sensibilità e specificità diagnostica, accuratezza, ripetibilità e riproducibilità sempre superiori al 90%. I metodi 2 e 3, invece, hanno evidenziato, rispettivamente, bassi valori di specificità diagnostica (73,3%) e sensibilità diagnostica (75%).

Ruolo degli incolti nell'epidemiologia della flavescenza dorata in Piemonte

M. Rossi[1], M. Pegoraro[1], M. Ripamonti[1], A. Giraudo [1,2], D. Bosco[1,2], C. Marzachì[1],
[1]*Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante, CNR, Strada delle Cacce 73, 10135 Torino;*
[2]*Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari, Università degli Studi di Torino, Largo Braccini 2, 10095 Grugliasco (TO)*

La flavescenza dorata della vite (FD) è una delle principali malattie che colpiscono i vigneti europei. Agente causale della malattia è un fitoplasma (FDp) appartenente al gruppo ribosomiale 16Sr-V trasmesso dalla cicalina *Scaphoideus titanus*. Numerosi interventi volti al contenimento di FD sono stati attuati sia sull'insetto vettore (trattamenti insetticidi) sia sul materiale vegetale (estirpo delle piante malate, uso di materiale di propagazione sano), tuttavia, in Piemonte, la malattia si presenta ancora a livello epidemico. Generalmente, i vigneti piemontesi sono caratterizzati da ridotta estensione e presenza di ampie zone di incolto circostanti i filari. Tali incolti possono ospitare specie serbatoi della malattia, quali viti selvatiche e clematidi, determinando una fonte continua di infezione primaria del vigneto. Al fine di determinare il ruolo delle infezioni primarie nell'epidemiologia di FD sul nostro territorio, sono stati selezionati sette vigneti nelle principali località vitivinicole piemontesi. In ciascun sito sono stati raccolti campioni di vite coltivata con sintomi della malattia, viti selvatiche o inselvatichite, clematidi e *S. titanus* delle popolazioni residenti all'interno ed all'esterno del vigneto. Gli isolati positivi a FDp sono stati caratterizzati geneticamente sulla base delle sequenze dei tre geni non ribosomiali *dnaK*, *malG* e *vmpA*. La comparazione dei profili genetici dei ceppi di FD negli isolati analizzati ha evidenziato l'importanza delle viti selvatiche e abbandonate nel processo epidemico della malattia. Il genere *Clematis*, invece, sembra essere totalmente escluso dal ciclo infettivo di FD sul nostro territorio. La caratterizzazione genetica fine dei ceppi di FDp presenti nel vigneto e negli insetti catturati in esso dimostra come le infezioni secondarie siano comunque una fonte importante di propagazione della malattia nonostante gli interventi di contenimento attuati sul vettore e sulle viti sintomatiche. Emerge, inoltre, un'estrema variabilità genetica di FDp associata ai vettori e determinata probabilmente dalla capacità di spostamento dell'insetto. Analizzando i dati genetici nella loro totalità emerge come il ceppo FD-C, endemico in Piemonte, sia ormai molto meno diffuso del ceppo di origine francese FD-D. Solo il 10% degli insetti analizzati era infetto dal ceppo FD-C contro il 30% delle viti, suggerendo che questo ceppo sia acquisito con bassa efficienza dal vettore.

Rapporti tra vite e *Orientus ishidae*, nuovo vettore di fitoplasmi agenti di flavescenza dorata

F. Lessio, L. Picciau, E. Gonella, F. Tota, A. Alma
Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari, Università degli Studi di Torino,Largo Braccini 2, 10095 Grugliasco (TO)

La conoscenza delle interrelazioni tra piante e insetti vettori è importante per comprendere l'epidemiologia delle fitoplasmosi. *Orientus ishidae* (Matsumura) è stato recentemente riconosciuto come vettore di fitoplasmi associati a flavescenza dorata (FD): il presente studio è quindi focalizzato sulle relazioni tra *O. ishidae* e *Vitis* spp.
Tralci di vite sono stati raccolti in inverno sia da vigneti che da portainnesti di vite americana inselvatichita, mantenuti in cella frigorifera (T=4°C) e successivamente posti in gabbie di rete escludi-insetto in una serra (T=21-27°C) in primavera, assieme a piante di fava. La dinamica di schiusa di *O. ishidae* è stata osservata settimanalmente, e le ninfe sono state lasciate sulle fave fino al raggiungimento dello stadio adulto. Sono stati effettuati campionamenti di ninfe da maggio ad agosto su piante di *Vitis* spp. (sia *Vitis vinifera* L. sia portainnesti inselvatichiti), e su altre latifoglie arboree, nelle stesse località di raccolta dei tralci, mediante osservazione visiva delle foglie. L'attività di volo di *O. ishidae* è stata studiata con trappole cromotattiche gialle in vigneto e su altre piante ospiti (es. salice e nocciolo).
Prove di trasmissione sono state effettuate con ninfe raccolte su piante ospiti. L'acquisizione è stata svolta sia su fave in laboratorio, sia su viti infette in vigneto, usando FD3 (16SrV-C) come fonte d'inoculo. La latenza è stata svolta su piante di nocciolo in vaso, mentre l'inoculazione è avvenuta su piante sane di fava o di vite micropropagata. Il DNA è stato estratto dalle piante inoculate e dagli insetti, e l'identificazione dei fitoplasmi agenti di FD è avvenuta mediante PCR.
Ninfe di *O. ishidae* sono state ottenute a partire da tralci sia di *V. vinifera* sia di portainnesti americani. La quantità massima ottenuta è stata di 15 ninfe/kg legno di vite americana. La schiusa è iniziata 20 giorni dopo il posizionamento in serra ed è terminata dopo 30 giorni. Lo sviluppo post-embrionale ha richiesto da 27 a 32 giorni (media: 28,3; N=30). Solo due giovani di *O. ishidae* sono stati trovati su foglie di vite europea e americana (≈5000 foglie osservate), mentre numeri elevati sono stati rinvenuti su nocciolo, salice, robinia, carpino e rosa canina, dalla metà di maggio alla metà di luglio. Gli adulti sono stati catturati sulle trappole dall'inizio di luglio alla metà di agosto, con un picco alla fine di luglio, con catture maggiori ai margini dei vigneti e su piante ospiti specifiche di *O. ishidae*.
L'acquisizione di fitoplasmi 16SrV-C da parte di *O. ishidae* è avvenuta sia dalla vite sia dalla fava infetta. L'inoculazione è avvenuta solo su vite micropropagata, con un tasso del 15%. Al momento, il rapporto tra *O. ishidae* e *Vitis* spp. sembra alquanto occasionale. Questa specie ricerca il legno della vite per ovideporre, ma dopo la schiusa le ninfe non sembrano sostare sulle foglie e probabilmente si spostano su altre piante. Questo comportamento appare più probabile in ambienti boschivi, dove il legno utilizzato per l'ovideposizione è più vicino ad altre potenziali piante ospiti. Gli adulti frequentano occasionalmente i vigneti ma tendono a rimanere confinati ai margini. Nonostante l'acquisizione di fitoplasmi agenti di FD dalla vite sia possibile, questa non sembra la principale fonte d'inoculo. D'altra parte, la recente scoperta di piante di salice e nocciolo infettate dallo stesso ceppo ritrovato anche in *O. ishidae* prefigura un nuovo scenario nel processo di trasmissione da parte di questo nuovo vettore.

Simbionti del genere *Asaia* produttori di biofilm che interferiscono con la trasmissione di fitoplasmi da parte di cicaline in laboratorio

E. Gonella[1], E. Crotti[2], M. Mandrioli[3], D. Daffonchio[4], A. Alma[1]
[1]Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari, Università degli Studi di Torino, Largo Braccini 2, 10095 Grugliasco (TO); [2]Dipartimento di Scienze per gli Alimenti, la Nutrizione e l'Ambiente (DeFENS), Università di Milano, via Celoria 2, 20133 Milano; [3]Dipartimento di Scienze della Vita, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, via Campi 213/D, 41125 Modena; [4]Biological and Environmental Sciences and Engineering Division (BESE), King Abdullah University of Science and Technology (KAUST), Thuwal 23955-6900, Kingdom of Saudi Arabia

Un processo chiave nella diffusione di malattie associate alla presenza di fitoplasmi è l'interazione tra questi patogeni e i loro insetti vettori. Questa interazione può essere influenzata dalla presenza nel vettore di simbionti microbici capaci di interferire con la capacità dell'insetto di trasmettere il fitoplasma tramite diversi meccanismi che possono intervenire singolarmente o in combinazione, come la competizione per la colonizzazione del corpo dell'ospite, l'attivazione della sua risposta immunitaria, o l'espressione di fattori ad attività anti-patogeno. I batteri acetici del genere *Asaia* sono simbionti del vettore del fitoplasma agente della flavescenza dorata (FD) della vite, *Scaphoideus titanus* Ball. Questi batteri sono considerati candidati agenti di controllo in diversi modelli vettore-patogeno di interesse medico, e presentano i requisiti essenziali anche per un impiego contro FD. È stato valutato il ruolo di diversi ceppi di *Asaia* nel limitare la trasmissione dei fitoplasmi utilizzando il modello sperimentale vettore – pianta ospite costituito da *Euscelidius variegatus* (Kirschbaum) e *Vicia faba* L. Saggi di PCR *Asaia*-specifica condotti su singoli adulti di *E. variegatus* hanno evidenziato la presenza di un ceppo non coltivabile del batterio acetico; inoltre tre isolati provenienti da zanzare e caratterizzati da diversi profili fenotipici si sono rivelati in grado di colonizzare stabilmente il corpo della cicalina in seguito a somministrazione orale. Tali isolati, di cui due forti produttori di biofilm nell'interfaccia aria – liquido e uno non produttore di pellicole, sono stati forniti a ninfe di *E. variegatus* succesivamente impiegate per prove di trasmissione del fitoplasma FD (16SrV-C) in dieta artificiale e a fava, parallelamente a un testimone nutrito in assenza di *Asaia*. Le cicaline e i rispettivi substrati di inoculo sono stati infine sottoposti a diagnosi molecolare mediante real-time PCR quantitativa, o ibridazione *in situ* in fluorescenza, al fine di localizzare simbionte e patogeno nei tessuti dell'insetto. Uno dei due ceppi produttori di biofilm (*Asaia* SF15.14) è risultato ridurre significativamente la trasmissione del fitoplasma. Probabilmente, il meccanismo di inibizione operato da questo ceppo è legato alla capacità di limitare la colonizzazione dell'intestino della cicalina da parte del patogeno. D'altro canto, gli esemplari di *E. variegatus* in cui il fitoplasma è stato in grado di insediarsi con successo nel tratto intestinale hanno trasmesso efficientemente il patogeno al substrato di alimentazione, indicando che, superata la barriera intestinale, non sono presenti ulteriori ostacoli al processo di trasmissione.
Sebbene il meccanismo alla base dell'attività di interferenza espressa da *Asaia* SF15.14 in *E. variegatus* rimanga da chiarire, come pure l'efficacia di una possibile riduzione della trasmissione del fitoplasma alla vite da parte di *S. titanus*, questo lavoro può fornire un importante strumento di base per la creazione di programmi di lotta sostenibile a FD basati sull'impiego di *Asaia* come agente di controllo.

Relazioni filogenetiche fra specie di Deltocephalinae conosciuti e potenziali vettori di fitoplasmi

V. Trivellone[1], E. Angelini[1], D.A. Dmitriev[2], C.H. Dietrich[2]
[1]C.R.E.A. – VE, Centro di Ricerca per la Viticoltura ed Enologia, 31015- Conegliano (TV); [2]Center for Biodiversity, Illinois Natural History Survey, Champaign, IL 61820 USA

I fitoplasmi, batteri privi di parete cellulare appartenenti alla classe *Mollicutes* e caratterizzati da un genoma molto piccolo (variabile tra 530 – 2.220 kb), sono patogeni di diverse specie di piante e ne colonizzano il floema. I fitoplasmi sono trasmessi in natura da insetti vettori appartenenti all'Ordine degli Hemiptera, Subordini Cicadomorpha e Fulgoromorpha, nonché alla Famiglia Psillidae nel Subordine Sternorrhyncha. Nei Cicadomorpha, la Superfamiglia Membracoidea contiene il maggior numero di specie di vettori conosciuti. Tuttavia, nonostante l'importanza economica di queste specie vettrici, c'è una sorprendente mancanza di conoscenze concernenti la loro filogenesi, tassonomia, ciclo vitale e biologia. Diversi autori hanno suggerito l'utilizzo delle analisi filogenetiche per fare predizioni circa le specie vettrici di patogeni. Infatti, certi tratti comportamentali conservati filogeneticamente, e la conseguente prevedibilità della loro espressione, potrebbero chiarire l'evoluzione della capacità vettrice. È tuttavia da notare che per gli Auchenorrhinchi le relazioni filogenetiche tra taxa inferiori sono ancora largamente inesplorate.

Questo studio è una revisione sullo stato dell'arte delle ricerche condotte finora sui vettori conosciuti e potenziali di fitoplasmi. La presente indagine si concentra sulla Sottofamiglia Deltocephalinae e mette in luce le relazioni filogenetiche tra le tribù che contengono specie conosciute per essere vettori e potenziali vettori di fitoplasmi appartenenti al sottogruppo 16SrV.

Il presente studio s'inserisce nel contesto di due progetti paralleli (USA – Europa), che trovano sinergia in una collaborazione internazionale intrapresa allo scopo di investigare i tratti (genetici, ecologici morfologici) associati con la capacità vettrice. I due progetti hanno tre obiettivi comuni: completare un database relazionale che comprende tutte le segnalazioni di associazioni tra fitoplasmi, Auchenorrhyncha e piante; screening genomico per l'identificazione dei tratti associati alla capacità vettrice; infine, utilizzando dati genetici e morfologici, la ricostruzione dettagliata delle filogenesi dei gruppi principali di Auchenorrhycha conosciuti come vettori di fitoplasmi.

Progetti Pilota in Piemonte per la gestione della lotta a flavescenza dorata della vite

P. Gotta[1], C. Morone[1], I. Albertin[2], A. Del Vecchio[2]

[1]Settore Fitosanitario e servizi tecnico-scientifici – Regione Piemonte; [2]Collaboratori del Settore Fitosanitario e servizi tecnico-scientifici

L'emergenza flavescenza dorata (FD) della vite continua ad essere oggetto di intensa operatività da parte del Settore Fitosanitario; si è mirato non solo ad attuare le "Misure per la lotta obbligatoria contro la Flavescenza Dorata della vite" previste dal D.M. n. 32442 del 31/05/2000, ma anche al consolidamento del lavoro svolto in tanti anni di attività sul territorio, base indispensabile per affrontare le problematiche non ancora risolte.
Le linee di gestione dell'emergenza sono state costanti negli ultimi anni ed articolate secondo i seguenti punti: -interventi di vigilanza fitosanitaria su incolti con vite selvatica, vigneti abbandonati e sulla filiera vivaistica; -progetti pilota e informazione; -ricerca e sperimentazione.
A partire dal 2006 sono stati attivati in modo crescente diversi Progetti Pilota sul territorio, anche traendo spunto da numerosi confronti con le esperienze francesi, finalizzati alla corretta applicazione delle strategie di lotta.
I Progetti Pilota hanno lo scopo di fronteggiare l'emergenza mediante un lavoro collettivo che consiste in:

- informazione sulla lotta contro l'insetto vettore ed FD;
- monitoraggio delle forme giovanili di scafoideo per stabilire il momento idoneo in cui eseguire il primo trattamento insetticida;
- monitoraggio degli adulti di scafoideo attraverso l'uso di trappole cromotattiche per stabilire le date per i trattamenti insetticidi sugli adulti e per valutare l'efficacia dei trattamenti;
- valutazione dell'incidenza di FD in vigneto per verificare i risultati della lotta;
- attività di formazione in campo, con i tecnici e le aziende agricole, per il riconoscimento dei sintomi di FD e la loro distinzione da quelli di altri organismi nocivi (anche con il supporto di analisi svolte dal Settore Fitosanitario nei casi ambigui)
- discussione annuale dei risultati dei monitoraggi effettuati;
- coordinamento tra i portatori di interesse (tecnici delle associazioni agricole e liberi professionisti, cantine sociali, Comuni)
- segnalazione di situazioni di particolare rischio (vigneti abbandonati, vite selvatica negli incolti).

Per ciascun Progetto Pilota è stato individuato un Comune o un Consorzio di Tutela capofila ed è operante un coordinamento tra referenti comunali, aziende agricole, Organizzazioni Professionali Agricole, Consorzi di Tutela, Cantine Sociali, l'Associazione Vignaioli Piemontesi e il Settore Fitosanitario.
I Progetti Pilota sono supportati dai Comuni in cui sono attivati, Camere di Commercio, Fondazioni bancarie, Consorzi di Tutela, mentre il ruolo del Settore Fitosanitario è di supporto tecnico e di aiuto al coordinamento.
I Progetti Pilota offrono la possibilità di lavorare assieme sul territorio: nella lotta a FD, il coordinamento e la compartecipazione tra diversi enti e soggetti è fondamentale per valorizzare le risorse professionali locali sia delle aziende agricole sia dei tecnici. Nel programma di comunicazione dei Progetti Pilota è posta una particolare attenzione alla tutela delle api e degli impollinatori, in particolare relativamente alla scelta delle date dei trattamenti e alla loro modalità di esecuzione.

Aspetti epidemiologici e qualitativi di viti cv Barbera e Chardonnay risanate da flavescenza dorata

L. Galetto[1], S. Palmano[1], M. Ripamonti[1], C. Roggia[2], D. Bosco[1, 3], C. Marzachì[1].
[1] *Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante, CNR, Strada delle Cacce 73, 10135 Torino;* [2]*Enocontrol S.C.A.R.L, Corso Enotria 2/C, 12051 Alba (CN);* [3] *Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari, Universita degli Studi di Torino, Largo Braccini 2, 10095 Grugliasco (TO)*

Il risanamento da flavescenza dorata (FD) della vite è un fenomeno diffuso in alcune cultivars di vite e potrebbe rappresentare una risorsa naturale sfruttabile per la gestione della malattia. La possibilità di applicare il risanamento da FD potrebbe essere infatti, un elemento integrativo a complemento degli indispensabili trattamenti insetticidi e del taglio dei tralci sintomatici. Al fine di valutare tale ipotesi, sono stati indagati sia aspetti epidemiologici sia qualitativi/produttivi di mosto e vino. Il risanamento è stato studiato in due cultivar di *Vitis vinifera* L., una a bacca rossa (Barbera) e una a bacca a bianca (Chardonnay), in vigneti produttivi siti a Cocconato d'Asti, in condizioni di elevata pressione di infezione (incidenza di FD nel 2014 pari al 22 e 25%, rispettivamente in Barbera e Chardonnay). Il monitoraggio della presenza di FD nel vigneto di Barbera, avvenuto già a partire dal 2008, ha permesso di elaborare una mappatura dettagliata dell'andamento della malattia e del tasso di risanamento, pari nel 2015 al 13%. Il vigneto di Chardonnay è stato monitorato a partire dal 2014, permettendo la mappatura del risanamento con un tasso pari al 3%.
Nella stagione 2015, sono stati identificati gruppi di piante sane (che non avevano mai manifestato sintomi nei precedenti anni di osservazione e negative alla diagnosi molecolare di FD e legno nero della vite, LN) e risanate (asintomatiche nel 2015, ma infette l'anno precedente). Lo stato sanitario dei diversi gruppi di piante è stato confermato mediante analisi molecolare per la ricerca dei principali fitoplasmi (FD e LN) e dei sei principali virus della vite. Curve di maturazione e prove di microvinificazione seguite da analisi enologiche e sensoriali sono state effettuate sulle uve di piante sane e risanate delle 2 cultivars per valutare le differenze di performance in campo e di qualità del vino.
Per gli aspetti epidemiologici, ninfe sane del vettore *S. titanus* sono state isolate in campo su tralci di viti risanate e, per controllo positivo, su tralci di viti infette; dopo una fase di latenza in condizioni controllate, gli insetti sono stati analizzati con tecniche molecolari per determinare la presenza del patogeno. Dai risultati ottenuti si evince che dal punto di vista epidemiologico le piante risanate di entrambe le cultivars sostanzialmente non rappresentano una fonte di inoculo per il vettore. In Chardonnay il tasso di risanamento è tuttavia risultato scarso, tale da far risultare la strategia del risanamento un'opzione non consigliabile per questa varietà, perlomeno in condizioni di elevata pressione di infezione quali quelle del vigneto produttivo in studio. Inoltre, se per il Barbera non si sono registrate variazioni significative, nel caso dello Chardonnay invece, il vino ottenuto da piante risanate ha raggiunto un grado alcolico inferiore rispetto a quello ottenuto da piante sane, poiché le uve di partenza erano meno mature e con grado zuccherino inferiore rispetto a quelle delle corrispondenti piante sane. Lo stesso vino con una probabilità di errore del 10% stato anche il vino meno favorito all'assaggio. Nel complesso tale lavoro ha permesso di verificare che, una volta risanate dalla malattia, le viti non rappresentano una sorgente di inoculo per il vettore e che mantengono una performance qualitativa sostanzialmente in linea con le corrispondenti piante sane.

Proteine effettrici di fitoplasma – come "apple proliferation phytoplasma" manipola la sua pianta ospite

K. Janik[1], A. Mithöfer[2], M. Raffeiner[1], H. Stellmach[3], B. Hause[3], K. Schlink[1]
[1]Centro di Sperimentazione Laimburg, Laimburg 6, 39040Auer/Ora (BZ); [2]Department of Bioorganic Chemistry, Max Planck Institute for Chemical Ecology, Beutenberg Campus, Hans-Knoell-Str. 8, Jena 07745, Germany; [3]Department for Cell and Metabolic Biology, Leibniz Institute of Plant Biochemistry, Weinberg 3, Halle 06120, Germany

Per sviluppare un'infezione, i batteri utilizzano la pianta ospite a proprio vantaggio. Per poterlo fare, i batteri secernono le cosiddette proteine effettrici che alterano il metabolismo o la risposta immunitaria della pianta ospite. Il patogeno '*Candidatus* Phytoplasma mali' é l'agente degli scopazzi del melo ("apple proliferation"), una malattia di importanza crescente in zone di coltivazione melicola in Europa. Nonostante la sua importanza economica, poco si conosce dei meccanismi molecolari di manifestazione della malattia nelle piante di melo. In questo studio sono stati identificati due fattori di trascrizione TCP di *Malus x domestica* come partner di interazione dell'effettore ATP_00189 de '*Ca*. P. mali' SAP11-like. Analisi dei fitormoni hanno rivelato un effetto dell'infezione di '*Ca*. P. mali' che influenza i livelli di jasmonato, acido salicilico e acido abscissico, dimostrando che '*Ca*. P. mali' condiziona i livelli ormonali nei meli; ciò è in linea con le funzioni dell'effettore ipotizzate in base alla sua interazione con i fattori di trascrizione TCP. Questa risulta essere la prima caratterizzazione dei target molecolari di un effettore di '*Ca*. P. mali' e pone le basi di una migliore comprensione dello sviluppo dei sintomi e della evoluzione della malattia. Così come gli omologhi SAP11 sono stati trovati in diverse specie di fitoplasma che infettano un ampio spettro di piante differenti, proteine simili a SAP11 sembrano giocare un ruolo fondamentale nell'infezione fitoplasmatica. Il fitoplasma mostra un ciclo di vita unico che vede una fase riproduttiva in un insetto che si nutre nel floema e una seguente trasmissione alla pianta. All'interno del floema della pianta i batteri si moltiplicano e possono essere ritrasmessi all'insetto per completare il loro ciclo di vita infettante e attivare la loro disseminazione ad altre piante ospiti. Considerevoli progressi sono stati fatti nello svelare le basi molecolari dell'infezione fitoplasmatica utilizzando il ceppo di '*Ca.* P. asteris' "aster yellow-witches' broom" (AY-WB), principalmente identificando e caratterizzando gli effettori batterici che giocano un ruolo nella manifestazione della malattia e nello sviluppo sintomatico in *Arabidopsis thaliana*. Nonostante il genoma sia stato totalmente sequenziato, fino ad oggi nessuna proteina effettrice funzionale di '*Ca*. P. mali' è stata descritta. I meccanismi molecolari che sottendono la manifestazione della malattia e lo sviluppo dei sintomi nella pianta ospite *Malus x domestica*, quindi, rimangono non chiari. Uno studio effettuato con '*Ca*. P. mali' ha identificato diversi geni espressi in *Malus x domestica* durante l'infezione; tra questi, un gene che codifica la proteina ATP_00189 (GenBank: CAP18376.1), una proteina che è omologa all'effettore SAP11 di AY-WB. ATP 00189 contiene l'N-terminale "sequence-variable mosaic (SVM) protein signal sequence" (Pfam entry: PF12113) e condivide il 41% di identità con SAP11. In questo studio sono state valutate le seguenti ipotesi: (i) se l'omologo di SAP11 ATP_00189 di '*Ca*. P. mali' è espresso in primavera e autunno in piante di melo naturalmente infette; (ii) se esistono in Alto Adige varianti delle sequenze di questa potenziale proteina effettrice; (iii) quali sono le proteine target di ATP 00189; e (iv) se le piante di melo infette mostrano regolazione ormonale differenziata in primavera e autunno.

Degradazione di clorofilla in foglie di melo e albicocco infette da fitoplasmi

C. Mittelberger[1], H. Yalcinkaya[2], C. Pichler[1], J. Gasser[2], G. Scherzer[2], T. Erhart[2], S. Schumacher[1], B. Holzner[1], K. Janik[1], P. Robatscher[1], T. Müller[2], B. Kräutler[2], M. Oberhuber[1]
[1]Centro di Sperimentazione Laimburg, Laimburg 6, 39040 Auer/Ora (BZ); [2]Institute of Organic Chemistry and Center of Molecular Biosciences, Universtiy of Innsbruck, Innrain 80/82, 6020 Innsbruck, Austria

'*Candidatus* Phytoplasma mali', agente principale degli scopazzi del melo e '*Candidatus* Phytoplasma prunorum', agente principale del giallume europeo delle drupacee, provocano severi danni alle coltivazioni di melo e albicocco in Italia.
Le due malattie hanno in comune il sintomo dell'ingiallimento precoce delle foglie. Normalmente l'ingiallimento in autunno è un segno naturale della senescenza e segue un percorso conosciuto e altamente regolato della degradazione di clorofilla. Per quanto riguarda la clorosi esistono invece delle indicazioni in letteratura che suggeriscono sia provocata dallo squilibrio della concentrazione di carboidrati nelle foglie. Siccome è noto che i cloroplasti sono gli organuli in cui la pianta produce le specie reattive dell'ossigeno per difendersi dai patogeni, è plausibile che le clorosi nelle piante infette siano influenzate attivamente dalla presenza di fitoplasmi. Lo studio qui presentato ha lo scopo di paragonare il percorso naturale di degradazione della clorofilla con quello associato alla presenza di fitoplasmi.
Per questo scopo sono stati campionati set di foglie, da meli sani e infetti sintomatici e da albicocchi sani, infetti non sintomatici e infetti sintomatici, ogni due settimane durante il periodo vegetativo 2013. Per ogni campione è stato determinato il contenuto totale di clorofilla con uno spettrofotometro UV/Vis. I prodotti di degradazione della clorofilla sono stati identificati e qualificati con metodi HPLC-DAD e LC-MS.
Soprattutto nelle foglie di albicocco è stato rilevato, già dall'inizio delle misurazioni di contenuto di clorofilla, una grande differenza tra foglie di alberi sani *versus* infetti. Nelle foglie sane il contenuto è rimasto stabile durante i mesi estivi ed è diminuito velocemente durante la senescenza naturale in autunno. Le foglie infette e sintomatiche invece avevano un contenuto ridotto di clorofilla e la sua degradazione è iniziata prima. Foglie infette ma non sintomatiche avevano all'inizio delle misurazioni lo stesso contenuto di clorofilla delle foglie sane. Anche in questo caso la degradazione della clorofilla è iniziata già durante l'estate, come mostrano i risultati della spettroscopia UV/Vis.
Sia nel melo sia nell'albicocco i cataboliti risultano essere solo una piccola parte della clorofilla totale, come riportato anche in letteratura. Però, in entrambe le specie sono stati trovati gli stessi tipi di cataboliti di clorofilla presenti in altre piante appartenenti alla famiglia delle Rosaceae. La diversità dei prodotti di degradazione della clorofilla non è stata influenzata dallo stato d'infezione anche se nelle foglie infette e sintomatiche non è stato ritrovato un catabolita. La quantità invece è stata diversa: nel melo sono stati ritrovati, indipendentemente dallo stato di infezione, solo 15-17% dei prodotti di degradazione rispetto alla quantità iniziale di clorofilla. Le foglie sintomatiche di albicocco invece contenevano significativamente meno cataboliti in quantità rispetto a foglie sane o infette non sintomatiche.
Le analisi dei prodotti di degradazione della clorofilla evidenziano per la prima volta che il percorso biochimico di degradazione della clorofilla associato alla presenza di fitoplasmi procede nello stesso modo di quello naturale durante la senescenza autunnale, sebbene vi siano delle differenze nella quantità di cataboliti formati e nel percorso temporale.

Questo progetto è stato realizzato grazie al supporto economico del programma Interreg IV Italia-Austria (ERDF; Progetto "Biophytirol" 5345 CUP: B25E11000300007), la Fondazione Austriaca di Scienza (FWF) e la Provincia Autonoma di Bolzano-Alto Adige.

Ruolo dell'effettore SAP11 nella mediazione del rapporto tra fitoplasmi e insetti vettori

G. Moro[1], P. Pecher[2], S. Capdevielle[1], A. Kliot[1], V. Prota[3], S. Hogenhout[1]
[1]John Innes Centre, UK; [2]Leibniz Institute of Plant Biochemistry, Germany; [3]Università degli Studi di Sassari

In condizioni naturali la diffusione dei fitoplasmi è prevalentemente affidata all'azione di insetti vettori che acquisiscono il patogeno nutrendosi su piante infette e lo trasmettono successivamente a piante sane mediante la loro attività trofica. Studiando questo processo per ,'*Candidatus* Phytoplasma asteris' ceppo "aster yellows-witches' broom" (AYWB), trasmesso da *Macrosteles quadrilineatus,* si evidenzia come non si tratti di un evento casuale dipendente solo dalla attività dell'insetto, ma di un evento regolato dal fitoplasma in modo diretto con azione sul metabolismo dell'ospite. Studi precedenti hanno dimostrato infatti che *M. quadrilineatus* produce generazioni più numerose quando si alimenta su piante di *Arabidopsis thaliana* infettate con AYWB anzichè su piante sane e la conseguenza diretta è quella di aumentare la probabilità di diffusione del parassita grazie alla presenza di un maggior numero di vettori infetti. Questa interazione è spiegata in buona parte dall'attività dell'effettore proteico SAP11, secreto dal fitoplasma nella pianta ospite durante il processo infettivo e responsabile della destabilizzazione dei fattori di trascrizione TCP, elementi che regolano svariati processi fondamentali per lo sviluppo della pianta. Infatti, su piante transgeniche di *Arabidopsis* sovraesprimenti SAP11, l'insetto fa registrare maggiori deposizioni di uova e produzione di ninfe rispetto al controllo non transgenico, riproponendo lo stesso fenomeno indotto dal fitoplasma. Sulla base di questi risultati si è quindi deciso di studiare i meccanismi che regolano l'interazione mediata da SAP11, tra fitoplasmi e insetti vettori, nella specifica combinazione AYWB - *A. thaliana* - *M. quadrilineatus.* Le piante, dell'età di 5 settimane e allevate in ambiente controllato, sono state esposte all'insetto per 48 ore al fine di consentire sia l'attività trofica che quella di oviposizione. I campioni prelevati sono stati quindi saggiati con la tecnica RNA-seq grazie alla quale è stato possibile misurare l'espressione di tutti i geni attivati dall'attività dell'insetto e individuare pertanto le vie metaboliche alterate dall'effettore. I risultati ottenuti hanno evidenziato che le piante transgeniche presentano una marcata sottoespressione di svariati geni coinvolti nelle risposte di difesa della pianta agli stress di natura sia biotica che abiotica. La percezione di segnali esterni (LRR, LRK, DUF) e la successiva trasduzione (MAP kinasi), fondamentali per il riconoscimento di agenti di stress, sono tra gli elementi maggiormente alterati. Marcato è inoltre l'effetto, sia nella sintesi che nelle reazioni da essi indotte, sui principali ormoni vegetali quali acido jasmonico, acido abscissico, acido salicilico ed etilene, responsabili dell'attivazione delle risposte di difesa. Infine, un elevato numero di proteine PR, attivate in presenza di stress biotici, e così anche le risposte a stress abiotici quali idrico, termico e meccanico, si presentano chiaramente soppresse. Pertanto, nel caso di studio in questione, si dimostra che la funzione di SAP11 sia quella di interagire con il metabolismo dell'ospite al fine di alterare i principali componenti delle risposte di difesa della pianta contro stress biotici e abiotici. Questo chiarisce inoltre alcuni dei passaggi fondamentali dell'interazione fitoplasma-ospite e spiega le modalità attraverso le quali il parassita determina un effetto positivo sulla "performance" riproduttiva del proprio insetto vettore.

Interazione pianta-fitoplasmi: limitazione del flusso floematico

L. Pagliari[1], S. Buoso[1], S. Santi[1], A.C.U. Furch[2], M. Martini[1], A. Loschi[1], M. Reichelt[3], A. Mithöfer[4], A.J.E. van Bel[5], R. Musetti[1]

[1] Department of Agricultural, Food, Environmental and Animal Sciences, University of Udine, via delle Scienze, 206, 33100 Udine; [2] Institute of General Botany and Plant Physiology, Friedrich-Schiller-University of Jena, Dornburgerstrasse, 159 D-07743 Jena, Germany; [3] Department of Biochemistry, Max Planck Institute for Chemical Ecology, Hans-Knöll-Straße 8, D-07745 Jena, Germany; [4] Department of Bioorganic Chemistry, Max Planck Institute for Chemical Ecology, Hans-Knöll-Straße, 8 D-07745 Jena, Germany; [5] Department of Phytopathology and Applied Zoology, Justus Liebig University, Heinrich-Buff-Ring 26–32, D-35392 Giessen, Germany

Le osservazioni al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) delle modificazioni ultrastrutturali che si manifestano in piante infette da fitoplasmi hanno spesso portato ad associare i giallumi fogliari a una possibile limitazione del flusso floematico, data dall'occlusione dei pori delle placche cribrose e finalizzata al contenimento della diffusione del patogeno. I coaguli di proteina floematica visualizzati a livello dei pori della placca cribrosa sono stati indicati come possibili fautori di questo processo. Tuttavia, la sola osservazione delle modificazioni ultrastrutturali non ha permesso di ottenere prove funzionali per validare questa ipotesi.

Utilizzando piante di *Arabidopsis thaliana*, mutanti per i geni coinvolti nella sintesi dei filamenti della proteina floematica (*AtSEOR1* -At3g01680-, *AtSEOR2* -At3g01670- e *AtPP2-A1* -At4g19840-), si è indagato se, in seguito all'infezione, si verifichi una riduzione del flusso floematico e se essa dipenda dai filamenti di proteina floematica e influisca sul decorso dell'infezione.

Le osservazioni al TEM hanno rafforzato l'ipotesi della presenza di diversi siti di interazione tra fitoplasma e cellula ospite, mediata da strutture di adesione a livello di membrana plasmatica e membrana del reticolo endoplasmatico. La moltiplicazione e la diffusione del patogeno sono state documentate dalla sua presenza nel lumen e all'interno dei pori della placca cribrosa, suggerendo il passaggio da una cellula all'altra. Nelle piante infette, i pori della placca cribrosa sono risultati spesso occlusi da coaguli di proteina floematica.

Il tracciante floema-specifico carbossifluorescina diacetato (CFDA) è stato utilizzato per indagare il flusso floematico. Le osservazioni al microscopio confocale hanno evidenziato come il flusso floematico venga ridotto in seguito all'infezione. L'uso di differenti linee mutanti ha permesso di desumere che questo fenomeno sia causato dall'ostruzione dei pori della placca cribrosa ad opera dei filamenti di proteina floematica nella loro forma "wild-type".

La concentrazione dei fitoplasmi nelle diverse linee mutanti, determinata mediante real-time PCR, ha evidenziato l'assenza di una correlazione tra limitazione del flusso floematico e moltiplicazione degli agenti patogeni, indicando come questa strategia non sia efficacie per combattere la diffusione dei fitoplasmi. Questa conclusione è compatibile con il fatto che la diffusione dei fitoplasmi non sembra avvenire solo mediante trasporto passivo nel flusso floematico. I bassi titoli di DNA fitoplasmatico riscontrati nelle piante *Atseor1ko* e *Atseor1ko/Atseor2kd* e il coinvolgimento putativo della proteina AtSEOR2 nella segnalazione immunitaria delle piante hanno suggerito una connessione tra la proteina floematica e il sistema di immunità vegetale. Analisi su fitormoni quali acido abscissico, salicilico e jasmonico insieme ad alcuni derivati, non hanno però permesso di individuare differenze tra le varie linee di piante mutanti utilizzate.

Colture primarie di immunociti di insetti vettori: nuova opportunità per lo studio delle interazioni insetto-fitoplasma

R. Tedeschi[1], M. Monti[1]; E. Gonella[1], G. Melchiori[2], A. Alma[1], M. Mandrioli[2]

[1]Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari, Università degli Studi di Torino, Largo Braccini 2, 10095 Grugliasco (TO); [2]Dipartimento di Scienze della Vita, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, via Campi 213/D, 41125 Modena

Nel corpo degli insetti coesistono numerosi microrganismi che si relazionano in modo diverso con il sistema immunitario dell'ospite a seconda che si tratti di organismi entomopatogeni, mutualisti, commensali o saprofiti. In particolare, dove vi è stata una stretta coevoluzione che ha portato a una forte riduzione del genoma, alcuni microrganismi sono in grado di sfuggire alle risposte difensive dell'ospite. È il caso per esempio di alcuni fitopatogeni veicolati dagli insetti, per i quali è già stata dimostrata la capacità di elicitarne o sopprimerne le risposte immunitarie.

In questo contesto è stato messo a punto un protocollo di allestimento e mantenimento di colture primarie di immunociti a partire da due specie di psille vettrici di fitoplasmi, *Cacopsylla pyri* (L.) e *C. melanoneura* (Förster) e da *Euscelidius variegatus* (Kirshbaum), cicalina modello sia come ospite di simbionti primari che come vettore di fitoplasmi.

Individuato il mezzo di coltura più idoneo è stato possibile mantenere le cellule vitali per più di 2 mesi ed osservare eventi di mitosi dopo circa 2 settimane dall'allestimento delle colture. Test di adesione e fagocitosi hanno dimostrato la capacità delle cellule di aderire su vetrino e di fagocitare microsfere fluorescenti confermando la loro piena funzionalità nonostante il mantenimento *in vitro*. L'osservazione al microscopio ottico ha evidenziato l'esistenza di due tipi cellulari ascrivibili a plasmatociti e granulociti nel caso di *C. pyri* e *C. melanoneura* e a proemociti e granulociti in *E. variegatus*.

Appurata la presenza in *E. variegatus* di geni codificanti il peptide antimicrobico defensina, ma non cecropina, prove di ibridazione *in situ* hanno confermato la trascrizione del gene per defensina a livello degli immunociti coltivati, mentre prove di "challenge" sulle colture di immunociti hanno dimostrato un'induzione del gene per la defensina solo dopo incubazione con *Staphylococcus aureus*, ma non con *Escherichia coli* e *Asaia* sp.

La possibilità di coltivare *in vitro* gli immunociti di insetti vettori e di analizzarne le proprietà, quali la capacità di sintetizzare alcuni peptidi antimicrobici piuttosto che altri apre nuove opportunità per lo studio delle interazioni insetto-fitoplasma ed in particolare per verificare la possibilità da parte dei fitoplasmi di indurre o modulare le risposte immunitarie dell'ospite. Queste complesse interazioni, che permettono la moltiplicazione e colonizzazione del corpo dell'insetto da parte del fitopatogeno sono alla base della capacità e dell'efficienza di alcuni insetti piuttosto che di altri di trasmettere i fitoplasmi e potrebbero essere sfruttate per lo sviluppo di nuove strategie di difesa delle colture.

Applicazioni di "plasma activated water" (PAW) a viti infette da fitoplasmi

Y. Zambon[1], R. Laurita[2], N. Contaldo[1], M. Gherardi[2], V. Colombo[2] A. Bertaccini[1]
[1]*DipSA, Patologia Vegetale,* Alma Mater Studiorum *Università degli Studi di Bologna;* [2]*D.I.N.,* Alma Mater Studiorum, *Università degli Studi di Bologna*

I giallumi della vite rappresentano una delle principali malattie associate alla presenza di fitoplasmi essendo responsabili di gravi danni alla produzione in tutte le aree di coltivazione. Attualmente il controllo delle fitoplasmosi avviene esclusivamente attraverso l'utilizzo di materiale di propagazione sano, termoterapia e lotta ai vettori ma spesso si traduce in un contenimento poco efficiente di queste malattie. La necessità di ricercare nuove strategie di controllo, possibilmente ecosostenibili, ha portato a valutare strategie innovative di difesa, come l'utilizzo di plasmi atmosferici di non equilibrio, in grado di modificare la composizione chimica di un liquido; nel caso dell'acqua, tale cambiamento si traduce nella produzione di nitriti, nitrati e perossidi di idrogeno e in una diminuzione del pH. Tali caratteristiche vengono ottenute trattando acqua con una scarica a barriera dielettrica per 10 minuti, utilizzando un voltaggio di picco pari a 19kV ed una frequenza di impulsi di 1kHz. Il liquido così ottenuto, denominato PAW ("plasma activated water"), ha un buon potenziale per la decontaminazione batterica, per la degradazione di composti organici ed è inoltre dimostrato che influenza la crescita delle piante. Per verificare il possibile utilizzo di PAW nel controllo di malattie associate a fitoplasmi, viti sintomatiche risultate positive all'infezione sono state trattate tramite endoterapia con PAW. In particolare, 40 piante cvs Glera e Chardonnay, precedentemente saggiate con analisi molecolari e risultate positive alla presenza di fitoplasmi e 20 piante risultate negative, sono state trattate per 2 anni (2015/2016) ed in 3 periodi diversi della stagione vegetativa (aprile, giugno e luglio) con 15-20 ml di PAW o acqua distillata sterile (SDW; usata come controllo). Il trattamento è stato effettuato iniettando il liquido direttamente nei fasci vascolari, grazie all'utilizzo di siringhe appositamente adattate. Al termine dei due anni si è riscontrata una riduzione dei sintomi in un numero rilevante di piante cv Glera, ed un miglioramento dello stato fisiologico e sanitario di alcune delle piante che apparivano più stentate all'inizio della prova. Le piante trattate con SDW non hanno invece mostrato alcuna riduzione dei sintomi. Analisi molecolari "nested"-PCR/RFLP hanno evidenziato una riduzione del 40% di campioni positivi a fitoplasmi nelle piante trattate PAW, a differenza di una riduzione del 15% riscontrata nelle piante controllo SDW. Questi risultati sono alquanto promettenti in un'ottica di difesa ecosostenibile da malattie associate a fitoplasmi e, allo scopo di studiare nel dettaglio i reali effetti di PAW su piante infette e non, sono in corso specifici esperimenti di espressione genica.

Risposte olfattive di *Hyalesthes obsoletus* a piante trattate con induttori di resistenza

P. Riolo, R.L. Minuz, V. Mancini, S. Ruschioni, G. Romanazzi, N. Isidoro
Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali, Università Politecnica delle Marche, Via Brecce Bianche, 60100 Ancona

Hyalesthes obsoletus Signoret (Hemiptera: Cixiidae) è il vettore principale di '*Candidatus* Phytoplasma solani', agente del legno nero (LN) della vite, fitoplasmosi di notevole importanza economica ed epidemiologica in Italia e nell'intero bacino del Mediterraneo. Questo cixiide è una specie polifaga, che vive principalmente su piante erbacee, sia spontanee sia coltivate, spesso ospitanti anche '*Ca.* P. solani'. Il ciclo biologico di *H. obsoletus*, la sua relazione con le piante spontanee, e la sua alimentazione occasionale su vite rendono difficile il suo controllo. Recentemente è stata valutata l'attività di alcuni elicitori sintetici nell'indurre il fenomeno del "recovery" (remissione dei sintomi di malattia) su viti affette da LN, e risultati incoraggianti sono stati forniti dall'applicazione di una formulazione commerciale contenente acibezolar-S-methyl (BTH) e di due differenti formulazioni contenenti glutatione e oligosaccarine (GO1 and GO2). Nel presente studio sono state condotte delle osservazioni comportamentali per indagare le risposte olfattive di *H. obsoletus* alle sostanze volatili emesse da foglie di vite trattate con queste tre formulazioni commerciali (BTH, GO1 e GO2). Ciascuna formulazione, diluita in acqua deionizzata, è stata applicata in 3 tempi differenti (0, 2 e 7 giorni prima dell'esecuzione dei biosaggi) su piante di vite (n=4) in un vigneto commerciale cv Chardonnay sito a Osimo (AN), regione Marche. Per ciascuna tesi (n=9) sono stati saggiati individualmente 32 individui (per un totale di 288). Utilizzando un olfattometro a due vie, ogni tesi è stata saggiata in rapporto al controllo, rappresentato da piante trattate solo con acqua deionizzata (n=12). Lo studio ha evidenziato come le piante di vite trattate con BTH una settimana prima dell'esecuzione dei biosaggi, sono state significativamente repellenti per gli adulti di *H. obsoletus*. Al contrario, i cixiidi sono stati significativamente attratti dai volatili emessi dalle piante di vite trattate, lo stesso giorno di esecuzione dei biosaggi, con la formulazione GO2. Inoltre nessuna risposta comportamentale è stata osservata nei confronti delle piante trattate con la formulazione GO1. La conoscenza di tali risposte comportamentali costituisce un punto cruciale per la messa a punto di strategie a basso impatto ambientale per il controllo degli adulti di *H. obsoletus*.

Strategie di interferenza mediata da RNA per indurre il silenziamento genico nell'insetto vettore di fitoplasmi *Euscelidius variegatus*

S. Abbà[1], L. Galetto[1], M. Vallino[1], M. Turina[1], M. Pesando[1], M. Rossi[1], M. Pegoraro[1], D. Bosco[1,2], C. Marzachì[1]

[1]*Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante, CNR, Strada delle Cacce 73, 10135 Torino;*
[2]*Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari, Università degli Studi di Torino, Largo Braccini 2, 10095 Grugliasco (TO)*

Euscelidius variegatus è il vettore naturale del fitoplasma associato al giallume del crisantemo ("Chrysanthemum yellows", CY) e, in condizioni di laboratorio, risulta essere anche un efficiente vettore del fitoplasma della flavescenza dorata (FD) della vite. I fitoplasmi sono batteri patogeni delle piante trasmessi da insetti floemomizi appartenenti all'ordine degli Hemiptera. Questi batteri sono responsabili di numerose fitopatie che ogni anno hanno un impatto drammatico sull'economia agricola a livello mondiale.
Lo scopo del lavoro è di individuare e analizzare i geni di *E. variegatus* potenzialmente coinvolti nell'interazione con i fitoplasmi, e, più specificamente, di quelli coinvolti nel processo di acquisizione e trasmissione di questi agenti fitopatogeni. In particolare, si sta studiando la capacità di RNA a doppio filamento (dsRNA), generati a partire dai geni actina e ATP sintasi β, di indurre effetti di silenziamento genico. I dsRNA vengono somministrati a diverse concentrazioni tramite iniezione nell'addome dell'insetto e il loro effetto di silenziamento viene monitorato nell'arco di sette giorni, confrontandolo con gli effetti causati dalla somministrazione di un controllo negativo costituito da dsRNA derivanti dalla GFP. È noto dalla letteratura che actina e ATP sintasi β sono coinvolti nell'interazione con i fitoplasmi, per cui un'efficiente perturbazione della loro espressione potrebbe causare una modifica nel ciclo epidemiologico di questi batteri. Si sta inoltre esplorando la possibilità di usare un virus individuato in *E. variegatus* come strumento per il silenziamento di questi due geni (silenziamento genico indotto da virus o VIGS). Nel corso di un progetto di sequenziamento massivo del trascrittoma di *E. variegatus* è stato, infatti, individuato un trascritto che mostra un elevato grado di similarità con alcuni virus appartenenti al gruppo dei *Picornavirus*. Attualmente è in corso la costruzione di un clone infettivo di questo virus, denominato *Euscelidius variegatus* virus 1 (EVV-1). L'utilizzo del VIGS rappresenterebbe uno strumento innovativo da usare direttamente come agente di biocontrollo nei confronti dell'insetto vettore e potrebbe affiancare, se non sostituire, i trattamenti insetticidi che, almeno per ora, sono l'unico mezzo di controllo nei confronti delle fitoplasmosi. In tal modo si potrebbe compiere un passo decisivo verso un'agricoltura più sostenibile per l'ambiente e per la salute umana.

Batteri endofiti potenziali agenti di biocontrollo nei confronti di fitoplasmi agenti di malattie negli alberi da frutto

W. Jarausch[1], M. Fritz[1], R. Arigossi[2], A. Passera[2], P. Casati[2], P.A. Bianco[2]
[1]AlPlanta, RLP AgroScience, Neustadt/W., Germania; [2]Università degli studi di Milano

Studi recenti hanno evidenziato come gli endofiti batterici possano giocare un ruolo importante nel risanamento dalle malattie associate alla presenza di fitoplasmi nelle piante perenni. Infatti, le comunità batteriche endofite descritte in piante sintomatiche, sane, e risanate sono differenti. Tuttavia, ad oggi non sono disponibili saggi su larga scala per valutare direttamente l'attività d'inibizione di questi batteri nei confronti dei fitoplasmi delle piante arboree. Nel presente lavoro viene descritto un comprovato sistema basato sull'utilizzo di piante di melo micropropagate *in vitro* al fine di valutare il potenziale di biocontrollo di alcuni ceppi batterici endofiti. In particolare sono stati saggiati ceppi batterici precedentemente isolati, con procedure standard, da piante di albicocco e pesco risanate da "European Stone Fruit Yellows" (ESFY) presenti nel frutteto sperimentale a Neustadt/W. (Germania). I ceppi in esame sono stati identificati mediante analisi di sequenza del gene 16S rRNA, e caratterizzati attraverso saggi microbiologici *in vitro* volti ad identificare tratti legati alle attività di "plant growth promotion" (PGP) quali: capacità di solubilizzare il fosfato, di fissare l'azoto, di produrre auxine, di produrre siderofori, di produrre catalasi. Inoltre saggi per verificare l'attività di biocontrollo sono stati svolti in competizione con *Botrytis cinerea*. Successivamente la capacità degli endofiti selezionati di controllare la moltiplicazione di '*Candidatus* Phytoplasma mali' è stata saggiata mediante inoculazione dei batteri endofiti in piante di melo micropropagate (*M.* x *domestica* cv. Golden Delicious) infette da scopazzo del melo (AP). Inoltre piante sane inoculate unicamente con ceppi batterici sono state utilizzate per verificare la loro capacità di colonizzazione e il loro effetto sull'ospite. Il successo della colonizzazione da parte degli endofiti è stato controllato tramite identificazione molecolare dei batteri di interesse con saggi PCR specifici. Il titolo di fitoplasma, nelle piante batterizzate e non, è stato misurato tramite PCR real-time quantitativa. L'effetto degli endofiti sullo sviluppo delle piante è stato analizzato misurando i seguenti parametri di crescita: altezza del germoglio, dimensione delle foglie e numero di germogli ascellari. Al termine dello studio è stato possibile identificare quattro gruppi di endofiti: 1) endofiti che non sono in grado di colonizzare le piante di melo *in vitro*, 2) endofiti che colonizzano le piante ma si dimostrano essere fitotossici *in vitro*, 3) endofiti che colonizzano prontamente le piante, ma che non mostrano alcun effetto sulla crescita dell'ospite o sul titolo di fitoplasma e 4) endofiti che colonizzano le piante, non ne ostacolano la crescita, e riducono significativamente il titolo di fitoplasma nell'ospite. Quest'ultimo effetto, inibitorio verso i fitoplasmi, non è immediato e aumenta col passare del tempo.

Le viti risanate da flavescenza dorata sono suscettibili a reinfezioni: prove biologiche e molecolari

M. Pegoraro[1], M. Rossi[1], N. Mori[2], L. Galetto[1], C. Pagliarani[1], P. Boccacci[1], G. Gambino[1], E. De Paoli[3], C. Marzachì[1], D. Bosco[1,4]

[1]Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante, CNR, Strada delle Cacce 73, 10135 Torino; [2]DAFNAE, Università degli Studi di Padova, Viale dell'Università, 16, 35020 Legnaro (PD); [3]DISA, Università di Udine, via delle Scienze 206, 33100 Udine; [4]Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari, Università degli Studi di Torino, Largo Braccini 2, 10095 Grugliasco (TO)

Il fenomeno del risanamento delle piante arboree a seguito di infezione da fitoplasmi ha suscitato molto interesse nel recente passato, sia per i meccanismi biologici implicati nella reazione della pianta sia per le possibili implicazioni pratiche nella gestione delle fitoplasmosi in frutteto e vigneto. In particolare, in albicocco è stata dimostrata una notevole tolleranza alle reinfezioni da un fitoplasma, ESFY, nelle piante ottenute da gemme di piante risanate. L'obiettivo di questo lavoro era la verifica della suscettibilità all'infezione di materiale propagativo risanato da FD mediante trasmissione in condizioni controllate del patogeno con il vettore e l'analisi dei livelli di metilazione delle citosine (C) a livello dell'intero genoma di piante sane e risanate da FD.

Barbatelle di cv Barbera e Glera, derivate da gemme di piante risanate e da gemme di piante sane impiegate come controllo, sono state inoculate in condizioni controllate con adulti di *Scaphoideus titanus* infettati su fava. A seguito delle prove di trasmissione, nell'anno seguente il 95% e 45% delle barbatelle di cv Barbera e Glera sono risultate infette rispettivamente. Nessuna differenza di suscettibilità è stata osservata tra le barbatelle derivate da piante risanate e sane di controllo. Al contrario, la suscettibilità della cv Barbera è risultata significativamente maggiore di quella della cv Glera (P=0,001). Campioni di DNA estratti da piante di Barbera sane e risanate da FD sono stati sottoposti a sequenziamento Illumina mediante il protocollo "Whole Genome Bisulfite Sequencing" (WGBS), allo scopo di determinare i livelli di metilazione delle citosine e individuare regioni differenzialmente metilate (DMRs) nelle due condizioni. Le variazioni di metilazione riscontrate tra i campioni sani e risanati sono risultate modeste e l'analisi dei geni potenzialmente associati alle DMRs più significative non ha evidenziato al momento nessuna associazione funzionale tra i livelli di metilazione riscontrati ed eventuali forme di resistenza della pianta risanata.

I risultati suggeriscono che in vite probabilmente non esiste una "memoria" dell'infezione, mentre è evidente la differenza di suscettibilità varietale. I differenti risultati ottenuti su vite e albicocco possono essere spiegati con: i) le diverse associazioni fitoplasma-pianta ospite ii) l'assenza di fitoplasmi nella vite risanata (mentre in albicocco il risanamento è solo sintomatico e i fitoplasmi persistono). Le viti risanate, seppure senza fitoplasmi e produttive, sono quindi suscettibili a reinfezioni.

Trasmissione di fitoplasmi attraverso il seme

E. Satta, S. Paltrinieri, N. Contaldo, A. Bertaccini
Dipartimento di Scienze Agrarie, Patologia Vegetale, Alma Mater Studiorum- *Università di Bologna, Bologna*

La trasmissione dei fitoplasmi attraverso il seme è una questione dibattuta e controversa a causa della ridotta conoscenza sulle connessioni tra pianta-madre ed embrione a livello floematico. I fitoplasmi sono stati rinvenuti in diverse parti della pianta compresi gli organi riproduttivi, l'embrione ed i frutti e la produzione di semi in piante infette risulta ridotta. Recenti studi hanno evidenziato che le infezioni tardive, in particolare nelle colture erbacee, possono consentire una normale produzione di semi. Inoltre, anche in presenza di anomalie in fiori e frutti, i semi prodotti possono essere vitali e con buona capacità di germinazione. Nella sperimentazione si sono utilizzati semi di *Sesamum indicum, Brassica napus, Solanum lycopersicum* e *Zea mays* prodotti da piante-madri infette da fitoplasmi. Le piantine ottenute sono state saggiate a 40 e a 90 giorni dalla germinazione ed il 90% dei campioni di *S. indicum* è risultato positivo per fitoplasmi dei gruppi ribosomici 16SrI, 16SrII e 16SrXII-A sia a 40 che a 90 giorni. L'85% dei campioni di *B. napus* è risultato positivo per i fitoplasmi appartenenti a gruppi ribosomici 16SrI e 16SrXII-A a 40 e 90 giorni. Il 20% dei campioni di *S. lycopersicum* è risultato positivo per fitoplasmi dei gruppi ribosomici 16SrI e 16SrXII-A a 40 giorni dalla germinazione mentre solo il 10% è risultato positivo a 90 giorni dalla germinazione. Da queste piante di pomodoro sono state ottenute bacche i cui semi hanno dato origine a piante di seconda generazione risultate a loro volta positive (12%) a fitoplasmi appartenenti ai gruppi ribosomici 16SrI e 16SrXII-A, indicando la presenza di fitoplasmi anche nella seconda generazione di piante. Il 20% dei campioni di *Z. mays* è risultato positivo a fitoplasmi 16SrI e 16SrXII-A a 40 giorni dalla germinazione e il 10% è risultato ancora positivo a 90 giorni. Da alcuni di questi campioni di mais è stato eseguito l'isolamento dalle nervature, in substrato CB: da alcune piante (mais 3E, 4.5, 4E, 1.1, 1.2 e 1D), positive a 90 giorni, è stato possibile ottenere colonie di diverse dimensioni e forma, alcune delle quali sono risultate positive alla presenza di fitoplasmi 16SrI ("aster yellows"). Dai campioni di mais 3E, 4.5 e 4E si sono ottenute colonie anche da brodi mantenuti per 7 mesi a 25°C dopo l'isolamento iniziale. Dal campione di mais 3E si sono ottenute alcune colonie di piccole dimensioni poi sottoposte a passaggi di purificazione da substrato liquido a solido; anche queste colonie sono risulte positive ad "aster yellows". Si sono ottenute colonie da almeno 3 passaggi successivi da substrato liquido a solido eseguiti ogni 5 giorni. I risultati indicano la vitalità del fitoplasma "aster yellows", isolato da piantine di mais ottenute da seme infetto e mantenute in ambiente privo di insetti e confermano la trasmissione di fitoplasmi vitali attraverso il seme. Si conferma quindi l'importanza epidemiologica di questa ulteriore modalità di trasmissione dei fitoplasmi.

"Multilocus sequence typing" di ceppi di fitoplasmi 16SrV-C da *Spartium junceum*

M. Rossi[1], S. Rizza[2], C. Marzachì[1], M. Tessitori[1,2]
[1]*Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante, CNR, Strada delle Cacce 73, 10135 Torino;*
[2]*Dipartimento di Agricoltura, Alimentazione e Ambiente – Sezione Patologia Vegetale, Università di Catania, Via S. Sofia 100, 95123 Catania*

Mentre il legno nero (LN) è presente da decenni in Sicilia ad oggi non sono segnalati casi di flavescenza dorata su vite (FD) né la presenza del vettore principale dei fitoplasmi associati alla malattia, *Scaphoideus titanus*. Sulla base dell'analisi filogenetica del gene 16S rRNA è stata di recente accertata la presenza di fitoplasmi 16SrV-C, da soli o in associazione con 16SrX-D, su *Spartium junceum* mostranti la sindrome degli scopazzi della ginestra ("spartium witches' broom", SWB). La tipizzazione genetica degli isolati 16SrV-C-spartium è stata effettuata tramite analisi MLST dei geni non ribosomici *secY*, *map*, *dnaK*, *malG* e *vmpA*. Le seguenti regioni sono state amplificate da campioni di ginestra positivi al fitoplasma: il gene *secY* tramite i primers FD9r/FD9f2L seguita da nested-PCR con FD9r2L/FD9f3L; il gene *map* con i primers FD9f5/MAPr1 e FD9f6/MAPr2 per la nested-PCR. Il gene housekeeping *dnaK* e i geni codificanti proteine di membrana malG e vmpA sono stati amplificati rispettivamente con i primers DnaKF/R, MaG F/R e VmpAF/R. L'analisi filogenetica dei geni *secY* e *map* dimostra l'origine monofiletica degli isolati in studio con i ceppi di FD di riferimento; in particolare, le sequenze analizzate appartengono a un cluster omogeneo insieme all'isolato di riferimento 16SrV-C-SpaWB229. Un solo genotipo di *dnaK e malG* accomuna tutti gli isolati analizzati. Una maggiore variabilità è stata osservata per il gene *vmpA,* che ha permesso di identificare 13 diversi genotipi che si separano in due cluster differenti. In base ai risultati acquisiti è possibile ottenere informazioni filogenetiche degli isolati 16SrV-C- spartium solo in base ai geni *secY* e *map*, mentre *vmpA* permette di evidenziare due possibili origini/ceppi coinvolti nell'epidemia di scopazzi della ginestra in Sicilia. Studi ulteriori permetteranno di ottenere risultati maggiormente conclusivi sull'evoluzione di tali ceppi e sulla valutazione del possibile salto di ospite da ginestra a vite.

"Spot RT-qPCR": impiego di estratto grezzo e dell'RNA come templato per migliorare la diagnosi dei fitoplasmi

C. Ratti[1], M. Turina[2]
[1]*Dipartimento di Scienze Agrarie (DipSA) Patologia Vegetale,* Alma Mater Studiorum*,Università di Bologna, Viale G. Fanin, 40, 40127, Bologna;* [2]*Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante, CNR, Strada delle Cacce 73, 10135 Torino*

La necessità di verificare l'assenza, dal materiale di propagazione vegetale certificato, di diversi fitoplasmi ha stimolato, fin dagli anni novanta del secolo scorso, studi finalizzati a ottimizzare tecniche diagnostiche molecolari sempre più sensibili, generiche o specifiche. La maggior parte di questi protocolli diagnostici, oggi largamente utilizzati nei programmi di certificazione fitosanitaria, hanno, nella purificazione degli acidi nucleici totali e nell'utilizzo del DNA genomico del patogeno come bersaglio dell'amplificazione, il loro minimo comune denominatore. Le tecniche di amplificazione di questi protocolli, come di quelli validati nell'ambito del progetto ARON-ARNADIA, prevedono l'impiego di reazioni nested-PCR o qPCR utilizzando primers e sonde specifiche o generiche per i diversi fitoplasmi oggetto di diagnosi. Risulta invece recente il tentativo di validare un approccio diagnostico che, evitando la purificazione degli acidi nucleici e sfruttando l'amplificazione delle abbondanti molecole di RNA prodotte durante il processo infettivo dai fitoplasmi, permette di ridurre i tempi e i costi necessari per analisi massali. Elevati numeri di analisi sono infatti richieste dai programmi di certificazione, monitoraggio o contenimento dei fitoplasmi classificati come patogeni di quarantena o di qualità. Un ulteriore vantaggio deriva dalla possibilità di utilizzare lo stesso estratto per analisi di virus a genoma a RNA. Gli studi condotti presso i nostri laboratori sono stati mirati a dimostrare l'efficacia di questo approccio verificando sia l'apporto quantitativo dell'RNA alla diagnosi sia l'efficacia dell'impiego dell'estratto grezzo dei tessuti vegetali nelle reazioni di amplificazione. Gli esperimenti sono stati condotti su campioni vegetali infetti, mediante tecniche qPCR, RT-qPCR, ddPCR e ddRT-PCR impiegando sonde TaqMan specifiche per '*Candidatus* Phytoplasma mali' (AP), '*Ca.* P. pyri' (PD), '*Ca.* P. prunorum' (ESFY), flavescenza dorata (FD) e '*Ca.* P. solani' (LN). Le metodologie messe a punto prevedono reazioni di qPCR o ddPCR abbinate a retrotrascrizione in un unico tubo e l'impiego di estratti grezzi del campione pre-trattati con metodologia "spot" su membrana di nylon. Tali protocolli sono stati confrontati con i classici protocolli di diagnosi su centinaia di campioni di campo di vite, drupacee e pomacee. La quantificazione assoluta e relativa degli acidi nucleici (DNA, RNA e totali) dei diversi fitoplasmi oggetto di studio effettuata su una selezione di campioni infetti ha evidenziato, nei tessuti dell'ospite, un contenuto mediamente 10 volte superiore dell'RNA del patogeno rispetto al DNA dello stesso. Il confronto tra le analisi effettuate mediante estrazione totale degli acidi nucleici e l'impiego dell'estratto grezzo ("spot") ha evidenziato l'accuratezza del metodo "spot" confermando la capacità del protocollo di rilevare la presenza del patogeno nei campioni sicuramente infetti (sensibilità specifica) e di non rilevare la presenza del fitoplasma nei campioni non infetti dal patogeno in esame (specificità). Lo stesso confronto ha evidenziato la minore sensibilità analitica, di circa un fattore di diluizione pari a 10, del protocollo "spot". Tale differenza viene però compensata dalla contemporanea diagnosi dell'RNA e del DNA del fitoplasma. In conclusione l'impiego di estratto grezzo e l'introduzione del passaggio di retrotrascrizione prima della reazione di amplificazione permette di ridurre i tempi e i costi di analisi garantendo accuratezza e sensibilità della diagnosi.

Caratterizzazione molecolare di '*Candidatus* Phytoplasma solani' in vigneti marchigiani

S. Murolo, V. Mancini, J. Concas, G. Romanazzi
Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali, Università Politecnica delle Marche, Via Brecce Bianche, 60100 Ancona

Il genoma di '*Candidatus* Phytoplasma solani' (sottogruppo 16SrXII-A), agente di legno nero (LN) della vite, è caratterizzato da differenti livelli di variabilità genetica in relazione ai geni considerati. I geni più variabili sono quelli che codificano le proteine di membrana, le quali sono esposte direttamente alle interazioni tra ospite e vettore. In questo studio, l'approccio utilizzato è stato quello dell'epidemiologia molecolare. Nello specifico sono stati combinati i dati provenienti dalla genotipizzazione tramite l'analisi di sequenza di diversi geni ("multilocus sequence analysis") con i dati di epidemiologia tradizionale.
Dai campioni di piccioli fogliari raccolti in un vigneto commerciale della cv Chardonnay è stato estratto il DNA, seguendo un protocollo CTAB, e successivamente amplificato tramite nested-PCR con primer specifici per i geni *tuf*, *vmp*1, *stamp* e *secY*. Gli ampliconi ottenuti con i primer per i geni *tuf* e *vpm*1 sono stati sottoposti a PCR-RFLP per una preliminare caratterizzazione molecolare, sulla base della quale, i campioni rappresentativi sono stati purificati e sequenziati. Usando il software Mega v. 5.1 sono stati ricostruiti i rapporti filogenetici per le sequenze nucleotidiche dei geni *vmp*1, *stamp* e *secY* dei ceppi di '*Ca*. P. solani', che sono state confrontate con quelle provenienti da altre regioni italiane e dai paesi dell'Europa mediterranea, disponibili in GenBank. Inoltre, per ciascuno dei geni analizzati è stato stimato il rapporto tra il tasso di sostituzioni non sinonime (dN) e sinonime (dS) in un allineamento di sequenze che codificano aminoacidi (dN/dS). Tale dato ha consentito di verificare quali dei geni di '*Ca*. P. solani' sono sottoposti a pressione di selezione.
La caratterizzazione molecolare per il gene *tuf*, ha consentito di verificare la presenza prevalente di '*Ca*. P. solani' *tuf*-b e quella occasionale, nello stesso vigneto, di *tuf*-a. Anche la caratterizzazione molecolare del gene *vmp*1 ha consentito di identificare 8 differenti genotipi all'interno dello stesso vigneto. I genotipi *vmp*1 dominanti sono risultati V14 e V12, mentre sporadicamente sono stati rilevati i genotipi V3, V4, V9, V11, V15 e V18.
La pressione di selezione nei geni *vmp*1, *stamp* e *secY* è stata valutata nei ceppi di '*Ca*. P. solani' in relazione al rapporto dN/dS. Per il gene *secY*, il rapporto complessivo dN/dS è risultato 1.02 (P = 0.841), suggerendo una bassa pressione di selezione. Il rapporto complessivo tra le mutazioni non sinonime e sinonime è risultato >1,0 per i geni *vmp*1 (2,28; P = 0,001) e *stamp* (3,99; P = 0,019). I valori elevati del rapporto dN/dS (>1) indicano un numero elevato di mutazioni non silenti (dN), quindi entrambi i geni sono sottoposti ad una elevata pressione di selezione, ed indirettamente dimostrano quanto intense siano le interazioni di '*Ca*. P. solani' con ospiti e vettori.
Sulla base dell'esperienza condotta in questo vigneto-pilota, possiamo affermare che l'epidemiologia molecolare potrebbe essere utilizzata in contesti più ampi per individuare e tracciare le fonti di inoculo, identificare nuovi vettori ed ospiti, studiare la dinamica della malattia a livello locale, nazionale e su scala più ampia, pianificare strategie di controllo innovative ed efficaci.

Caratterizzazione biologico-molecolare di isolati di fitoplasmi

N. Contaldo, G. D'Amico, Y. Zambon, A. Bertaccini
DipSA, Patologia Vegetale, Alma Mater Studiorum *Università degli Studi di Bologna*

I fitoplasmi sono procarioti privi di parete cellulare, appartenenti alla classe dei *Mollicutes* e filogeneticamente correlati a batteri Gram-positivi. La difficoltà nel coltivarli in substrato artificiale ha portato nel tempo a sviluppare tecniche sempre più complesse e accurate di analisi molecolare per la loro identificazione e classificazione, basate sul gene ribosomico 16S, e confermate dall'impiego di numerosi altri geni conservati a livello di '*Candidatus*' genere. Negli ultimi anni tuttavia sono state messe a punto tecniche che permettono, grazie al supporto di substrati artificiali complessi, l'isolamento e la crescita di vari fitoplasmi da materiale vegetale infetto, sia mantenuto in micropropagazione (*Catharanthus roseus*, vinca) che raccolto in campo (vite). In questo lavoro si sono perfezionate alcune condizioni di crescita e si sono studiate alcune caratteristiche biologiche di isolati di fitoplasmi volte alla loro caratterizzazione biologica ed al loro differenziamento all'interno del gruppo di *Mollicutes*. In particolare sono stati sperimentati diversi substrati liquidi e solidi per la crescita ed il mantenimento di ceppi di fitoplasmi, precedentemente isolati da viti sintomatiche infette su substrati CB. I vari substrati differivano per diverse combinazioni di antibiotici; differenti fonti di carbonio e concentrazione di NaCl. La valutazione della loro "performance" è stata effettuata mediante osservazione visiva del grado di torbidità del substrato dovuto alla presenza di microorganismi contaminanti e/o simbionti presenti nel tessuto di isolamento (substrati liquidi) e dalla presenza di colonie con morfologia simile a quella dei fitoplasmi (substrati agarizzati). Per confermare i risultati ottenuti dall'osservazione visiva ed al microscopio ottico, le colonie con morfologia caratteristica sono state sottoposte ad estrazione di acidi nucleici mediante kit commerciali (DNeasy Plant Mini Kit, Quiagen, USA) e ad analisi molecolare PCR "nested" seguita da RFLP e/o da sequenziamento, che hanno confermato l'identità dei fitoplasmi in coltura. Sono inoltre stati effettuati saggi di tipo biochimico per valutare in particolare la capacità di questi microorganismi in coltura di fermentare il glucosio e presentare attività dovuta alla presenza di arginina deidrolasi. I risultati ottenuti hanno permesso di differenziare i fitoplasmi in coltura da colture di controllo di *Acholeplasma laidlawii* ceppo ACC # 1039, gentilmente fornito da dr. M. Kube (Thünen-Istituto di Genetica Forestale, Großhansdorf, Germania).

Poster

Importanza della fascia oraria di campionamento e dell'altezza della chioma per la determinazione della densità di popolazione dei vettori degli scopazzi del melo

D. Barthel, C. Kerschbamer, B. Panassiti, K. Janik
Centro di Sperimentazione Laimburg, Laimburg 6, 39040 Ora (BZ)

Gli scopazzi del melo sono una delle malattie più temute nella melicoltura commerciale e sono associati alla presenza di '*Candidatus* Phytoplasma mali'. In Alto Adige questo fitoplasma viene trasmesso da *Cacopsylla picta* e *Cacopsylla melanoneura*. Da alcuni anni è stata notata una discrepanza tra la frequenza della malattia e la presenza delle psille: è possibile che i dati relativi alle catture non riflettano la reale densità di popolazione dei vettori in campo. Gli obiettivi della sperimentazione sono stati: 1) determinare la densità di popolazione dei vettori in orari diversi della giornata ("sampling time") e a diverse altezze della chioma ("canopy height"); 2) quantificare le ninfe tramite campioni di lavaggio ("wash-down") e 3) usare la quantificazione delle ninfe per predire la densità di popolazione delle generazioni emigranti dei vettori. Negli anni 2015 e 2016 in un meleto della cv Golden Delicious è stata rilevata la densità di popolazione tramite frappage, confrontando quattro tesi: presto-basso, presto-alto, tardi-basso e tardi-alto. Inoltre, nel 2016 è stata rilevata anche la densità di popolazione delle ninfe tramite il metodo "wash-down" con due tesi a confronto: basso *vs* alto. Il meleto è stato trattato due volte all'anno con il principio attivo azadiractina contro gli afidi. Per *C. melanoneura* non sono state osservate differenze significative fra le quattro tesi di frappage: la fascia oraria di campionamento e l'altezza della chioma non influiscono sulla quantità rilevata. Invece le catture di *C. picta* sono risultate troppo basse per un'analisi statistica. Inoltre questo studio non riporta una differenza significativa tra i numeri delle ninfe di *C. melanoneura* rilevato con il metodo "wash-down" in entrambe le parti della chioma. Il risultato conferma che *C. melanoneura* non era presente a nessuna altezza specifica della chioma. Per di più sulla parte inferiore della chioma è stata trovata una relazione significativa positiva ($p<0,01$) tra i numeri delle ninfe e degli adulti della generazione emigrante. Sulla base dei numeri delle ninfe rilevate è stato possibile predire soltanto il 23% del numero di adulti mediante regressione lineare ($r^2=0,23$). Ciò suggerisce, che ulteriori fattori sconosciuti e non considerati in questo lavoro avrebbero potuto influire sull'accuratezza della predizione. Per la parte superiore della chioma non è stata trovata correlazione ($r^2=0,07$, $p>0,05$). I numeri delle ninfe di *C. picta* sono risultati insufficienti per effettuare un'analisi statistica. Riassumendo, è stato esaminato l'effetto della fascia oraria di campionamento e dell'altezza della chioma sulle catture di *C. melanoneura* e *C. picta*. Le analisi comparate sono state effettuate soltanto per *C. melanoneura*, perché i bassi numeri di catture non ne permettevano l'analisi. I risultati dimostrano che l'altezza della chioma e la fascia oraria di campionamento non hanno effetto sul rilievo della densità di popolazione dei vettori. Per stimare la densità di popolazione delle ninfe, un campionamento tramite metodo "wash-down" è stato effettuato a due altezze della chioma dell'albero (basso vs alto). Sulla base dei numeri delle ninfe rilevate è stato effettuato un tentativo per predire la densità della generazione emigrante mediante regressione lineare. Per *C. melanoneura* tuttavia, a entrambe le altezze della chioma non è stato possibile ottenere una previsione affidabile (basso: $r^2=0,23$, $p<0,01$; alto: $r^2=0,07$, $p>0,05$). I numeri delle ninfe di *C. picta* invece sono risultati insufficienti per effettuare un'analisi statistica.

Questo lavoro è stato realizzato nell'ambito del progetto APPLClust ed è stato cofinanziato dalla Provincia Autonoma di Bolzano-Alto Adige e dal Consorzio Mela Alto Adige.

La proteina variabile di membrana VmpA del fitoplasma flavescenza dorata interagisce con le cellule dell'insetto vettore *Euscelidius variegatus*

N. Arricau-Bouvery[1], S. Duret[1], M.P. Dubrana[1], B. Batailler[1], D. Desqué[1], L. Béven[1], J.L. Danet[1], M. Monticone[2], D. Bosco[2,3], S. Malembic-Maher[1], X. Foissac[1]

[1]UMR Biologie du Fruit et Pathologie 1332, INRA, Université de Bordeaux, 33883, Villenave d'Ornon, France; [2]Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari, Università degli Studi di Torino, Largo Braccini 2, 10095 Grugliasco (TO); [3]Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante, CNR, Strada delle Cacce 73, 10135 Torino

I fitoplasmi sono patogeni delle piante sprovvisti di parete trasmessi da insetti Emitteri. La loro trasmissione secondo la modalità persistente propagativa implica il superamento delle cellule dell'epitelio mesointestinale e delle ghiandole salivari. L'adesione dei fitoplasmi alle cellule è requisito necessario per il successivo processo di internalizzazione-invasione. Il fitoplasma flavescenza dorata (FDp) possiede diverse "variable membrane proteins" (Vmps) esposte alla superficie cellulare e putativamente coinvolte nell'interazione con le cellule dell'insetto. Poichè non sono disponibili mutanti di fitoplasmi per lo studio del ruolo di queste proteine candidate all'interazione con le cellule del vettore, sono state usate cellule di *Spiroplasma citri* difettive per le adesine ScARPs, *S. citri* G/6 che esprimono le proteine VmpA in membrana. Inoltre, "beads" fluorescenti di lattice ricoperte di VmpA sono state impiegate per studiare l'interazione tra VmpA e le cellule dell'insetto vettore sperimentale *Euscelidius variegatus* in saggi di adesione *ex vivo* e di ingestione *in vivo*. I risultati mostrano che VmpA interagisce specificamente con cellule dell'insetto in coltura e permette alle "beads" rivestite di VmpA di essere trattenute nel mesointestino di *E. variegatus*. In quest'ultimo caso, le "beads" fluorescenti rivestite con VmpA erano localizzate all'interno della membrana perimicrovillare del mesointestino di *E. variegatus*. In conclusione, i risultati indicano che VmpA agisce come adesina e può svolgere un ruolo essenziale nella colonizzazione dell'insetto da parte di FDp.

Fitoplasma della fillodia della cicoria (ChiP) e *Spiroplasma citri* in Friuli Venezia Giulia (Nord-est Italia): un aggiornamento

M. Martini, F. Ferrini, P. Saitonuang, R. Musetti, D. Prataviera, N. Loi, P. Ermacora
Università degli studi di Udine, DI4A, Via delle Scienze 206, 33100 Udine

Recentemente, con il sequenziamento parziale del genoma è stata dimostrata la presenza di un'infezione mista del fitoplasma della fillodia della cicoria ("chicory phyllody", ChiP) (16SrIX-C) e di *Spiroplasma citri* l'agente causale dello "stubborn" degli agrumi ("citrus stubborn"), nell'ospite sperimentale *Catharanthus roseus* (vinca), in cui entrambi i patogeni erano stati trasmessi per mezzo dell'insetto *Neoaliturus fenestratus* catturato in un'area del Friuli Venezia Giulia con presenza di cicoria con sintomi di virescenza e fillodia.

È stata valutata con metodi molecolari la diffusione in campo di entrambi i patogeni sia in pianta (cicoria e altre erbacee per lo più sintomatiche) che in insetto, mediante monitoraggi estensivi nel periodo 2011-2013. Sono stati utilizzati metodi di multiplex-PCR diretta o nested (sui geni *rp* e *secY*) e/o real-time PCR (sul gene *secY*) per la diagnosi del fitoplasma ChiP, e un metodo di PCR diretta o nested (sul gene della spiralina) per *S. citri*. Inoltre, sono state effettuate osservazioni al TEM per studiare le relazioni intercorrenti tra fitoplasma ChiP (16SrIX-C), *S. citri* e pianta, nell'ospite sperimentale *C. roseus*.

Dal monitoraggio in campo è emerso che l'87% delle piante di cicoria erano infette, il 40% da entrambi i patogeni (infezione mista), il 67% dal fitoplasma ChiP e il 60% da *S. citri*. Il fitoplasma ChiP è stato individuato anche in altre piante erbacee, mediante PCR diretta in *Picris echioides* ed *Erigeron annuus* appartenenti alla famiglia delle Asteraceae e mediante nested-PCR in *Rumex*, *Convolvulus*, *Epilobium* e *Trifolium*. *S. citri* è stato rilevato, mediante nested-PCR, in infezione mista in tutte le specie e i generi sopra elencati. La specie *Taraxacum officinale* ospitava il solo *S. citri*. Sarà importante chiarire il ruolo epidemiologico di tali piante erbacee.

I due patogeni sono stati rilevati anche in piante di lattuga e di cicoria esposte sperimentalmente a *N. fenestratus* raccolto in campo e posto ad acquisire su piante di cicoria sintomatiche. Dal monitoraggio sugli insetti è emerso che in individui adulti di *N. fenestratus* è stato possibile rilevare la presenza dei due patogeni nel periodo che va da giugno a ottobre; in particolare la percentuale di individui infetti e la concentrazione dei patogeni sono apparse più alte nei mesi di luglio-agosto. Nello stesso periodo è stato possibile rilevare negli insetti analizzati anche infezione mista. Inoltre, si è potuto stabilire che altre cicaline floemomize possono fungere da potenziali vettori per il fitoplasma ChiP: in particolare specie del genere *Psammotettix* per *S. citri* e la specie *Anaceratagallia ribauti*. Dal momento che la presenza di infezione mista dei due patogeni è apparsa alquanto frequente sia in campioni di pianta che di insetto, in futuro verrà valutata la possibilità di usare metodi di multiplex-PCR per la diagnosi simultanea di entrambi i patogeni nei loro ospiti.

Infine, per quanto riguarda l'interazione tra i due patogeni, nei tubi cribrosi di uno stesso *C. roseus* è stata osservata una netta segregazione tra i due: infatti cellule ospitanti il fitoplasma non contenevano lo spiroplasma e viceversa. Sia spiroplasmi che fitoplasmi si presentavano ben conservati e con la morfologia tipica, ed entrambi mostravano specifiche strutture di adesione alla membrana plasmatica della cellula ospite.

Orientus ishidae nei vigneti del Veneto orientale

V. Forte, N. Bertazzon, L. Filippin, L. Dalla Cia, E. Angelini
CREA VE, Centro di Ricerca Viticoltura ed Enologia

Gli scambi commerciali consentono il trasporto di materiali di diverso genere da una parte all'altra del pianeta, ma permettono anche involontarie importazioni di patogeni e dei loro vettori. In ambito agrario, il trasferimento di piante tra i diversi continenti ha più volte condotto all'espansione parallela anche di insetti, che hanno facilmente colonizzato i nuovi ambienti, rivelandosi talvolta più dannosi rispetto al paese di origine. Esempio eclatante è la cicalina *Scaphoideus titanus* Ball (Hemiptera Cicadellidae Deltocephalinae), arrivata in Europa negli anni '50, divenuta la causa della diffusione della flavescenza dorata (FD), malattia da quarantena, e tenuta sotto controllo attraverso interventi di lotta obbligatoria ancora oggi.
Tra gli emitteri importati di recente e ritrovati anche in vigneto, *Orientus ishidae* (Matsumura) è stato dapprima rinvenuto infetto da FD e in seguito ne è stata dimostrata la capacità di trasmettere il fitoplasma in condizioni controllate. Questa cicalina polifaga è diffusa in diversi Paesi europei e in centro-nord Italia, dove è stata segnalata su diverse piante spontanee. Studi recenti ne hanno convalidato la sporadica diffusione in vigneto, dove potrebbe trasmettere il fitoplasma di FD alla vite, ma solo in maniera casuale; perciò non si ritiene che essa possa essere considerata un vettore efficiente della malattia.
Già nel 2013 in Veneto *O. ishidae* era stato segnalato su *Ailantus altissima*, e nel presente lavoro ne viene riportata la presenza in vigneto, grazie al monitoraggio con trappole gialle. Infatti *O. ishidae* è stato catturato in Veneto, in provincia di Treviso e Verona, e in Friuli Venezia Giulia, in provincia di Pordenone e Udine. Alcune trappole installate in Croazia hanno permesso il suo rinvenimento anche nella regione istriana. I primi ritrovamenti risalgono al 2004 e fino ad oggi sono stati catturati in totale 2.672 esemplari. Catture maggiori si sono verificate con trappole posizionate su filari di bordo di vigneti confinanti con siepi di piante spontanee, come noccioli, salici, frassini, olmi, robinie, a conferma della sua polifagia (in una sola località nel 2013 sono stati raccolti 637 individui da luglio a settembre). Catture importanti si sono evidenziate in vigneti a conduzione biologica (118 individui in un vigneto nel 2006), dove i trattamenti probabilmente ne permettono una permanenza maggiore. Alcuni esemplari, inoltre, sono stati catturati da trappole poste in vicinanza di un vivaio (109 ai bordi di un barbatellaio nel 2007).
Nel 2016 sono state installate 15 trappole in un vigneto e nella siepe di bordo, secondo tre transetti: 5 trappole sono state collocate sulla siepe di specie spontanee, 5 nelle viti più esterne del vigneto e 5 nelle viti più interne (circa 40 m all'interno). Le trappole sono rimaste in campo da fine giugno a metà settembre e sono state cambiate ogni 15 giorni. L'insetto è stato catturato in tutto il periodo di monitoraggio, mostrando una maggiore presenza tra la fine di luglio e la fine di agosto, senza però evidenziare un vero picco di volo. La maggior parte delle catture è stata rilevata sulla siepe (52 esemplari) rispetto al vigneto (8 esemplari), senza, però, mostrare un gradiente. Tale aspetto va sicuramente approfondito in futuro.
Ulteriori indagini potrebbero sicuramente rendere più chiara la biologia della cicalina, che, pur non rivestendo probabilmente un ruolo di primo piano nella diffusione di FD, risulta molto diffusa anche all'interno dei vigneti.

Fitoplasmi della vite in Trentino: evoluzione, monitoraggi, analisi molecolari

A. Gelmetti, F. Ghidoni, C. Cainelli, F. Pedrazzoli, M. Bottura
Centro Trasferimento Tecnologico, Fondazione E. Mach, S. Michele a/A (TN)

In provincia di Trento le prime segnalazioni di piante con sintomi di giallumi risalgono alla metà degli anni ottanta; i controlli effettuati negli anni successivi evidenziarono la presenza della fitoplasmosi del legno nero. I primi casi di flavescenza dorata si verificarono invece nel 2001, nella parte meridionale della provincia (Altogarda e Vallagarina). Le due malattie sono state finora caratterizzate da andamenti molto diversi. Legno nero, dopo il picco epidemico avvenuto negli anni intorno al 2007, non si è più manifestato in maniera grave e attualmente la sua diffusione, seppur interessando tutte le zone viticole, è caratterizzata da un'incidenza generalmente molto bassa. Flavescenza dorata invece, dopo circa dieci anni in cui è rimasta relegata in poche e limitate zone focolaio presenti nel Sud della provincia, ha dimostrato la sua reale pericolosità e la sua velocità di diffusione solo negli ultimi cinque anni: dopo lo scoppio epidemico avvenuto nel 2011 nella bassa Valle del Chiese, che ha interessato principalmente vigneti non professionali coltivati per l'autoconsumo, nel 2012, c'è stato un importante aumento di nuovi casi e una recrudescenza in alcune zone focolaio, con i primi vigneti professionali estirpati perché seriamente colpiti. Il numero di comuni in cui è stata identificata la malattia è aumentato in maniera esponenziale negli anni seguenti e ha determinato l'ampliamento dell'areale di diffusione della malattia verso la parte settentrionale della provincia. Attualmente in quasi tutti i principali comuni vitati della provincia sono stati identificati casi di FD; il monitoraggio sulla presenza delle piante sintomatiche, avvenuto a campione nelle diverse zone, ha evidenziato che l'incidenza di questa pericolosa fitoplasmosi nei vigneti professionali è generalmente molto bassa.
Con l'arrivo della flavescenza dorata in Trentino le analisi molecolari su campioni di foglie di piante sintomatiche (e più recentemente di insetti vettori) hanno assunto un ruolo fondamentale nella gestione a livello provinciale delle fitoplasmosi. L'identificazione del fitoplasma tramite analisi PCR ha coinvolto in 16 anni più di 4.000 campioni raccolti sul territorio viticolo dai tecnici del CTT. Le tecniche molecolari utilizzate nei laboratori di S. Michele all'Adige si sono modernizzate nel corso degli anni: per le prime indagini del 2001 si utilizzavano diversi protocolli di nested PCR che nel tempo si sono standardizzati, per poi passare nel 2012 ad una real time-PCR multiplex che permette di identificare contemporaneamente i due fitoplasmi con sensibilità e specificità superiori, in tempi di lavoro minori. Le analisi sui campioni di foglie (che hanno coinvolto negli anni più di 50 varietà) hanno confermato che Chardonnay è la cultivar più sensibile ai fitoplasmi. L'indagine sulla positività a FD dell'insetto vettore *Scaphoideus titanus* ha evidenziato risultati interessanti nell'analisi PCR di insetti catturati con il "frappage", mentre ha presentato delle criticità su individui prelevati da trappole cromotropiche.

Prevalenza di fitoplasmi riferibili a flavescenza dorata in cicaline vettori in Piemonte

E. Gonella, F. Lessio, F. Tota, A. Alma
Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari, Università degli Studi di Torino, Largo Braccini 2, 10095 Grugliasco (TO)

La flavescenza dorata (FD) è una delle principali malattie della vite in Europa, associata alla presenza di fitoplasmi del gruppo 16SrV appartenenti a tre gruppi, FD1 e FD3 nel sottogruppo 16SrV-C e FD2 nel sottogruppo 16SrV-D. Il principale vettore di FD è il cicadellide neartico *Scaphoideus titanus* Ball, monofago su vite; tuttavia altri vettori occasionali, recentemente riconosciuti, sono le cicaline polifaghe *Dictyophara europaea* L. e *Orientus ishidae* (Matsumura). Dato che attualmente la lotta a FD è basata principalmente sulla gestione dei vettori, la conoscenza del loro stato di infezione nelle aree affette dalla malattia è utile per indirizzare le misure di controllo. Lo scopo di questo lavoro è stato di verificare la presenza di ceppi FD1, FD2 e FD3 in individui di *S. titanus*, *D. europaea* e *O. ishidae* raccolti in areali viticoli piemontesi, al fine di fornire un quadro aggiornato dei livelli di infezione nei vettori in una delle aree più duramente colpite da FD in Italia.

I campionamenti dei vettori sono stati condotti, in modo non continuativo, tra il 2010 e il 2016 in vigneti e aree incolte con vite in presenza di infezione da FD. Gli esemplari raccolti sono stati sottoposti a diagnosi molecolare tramite PCR diretta e nested sulle regioni 16S-23S rRNA e secY. Gli ampliconi della regione 16S-23S rRNA sono stati impiegati per analisi RFLP, al fine di identificare il sottogruppo, mentre quelli ottenuti dall'amplificazione del gene *secY* sono stati sottoposti a sequenziamento, per l'individuazione del ceppo tramite analisi filogenetica.

Un totale di 170 adulti sono stati campionati, di cui 67 *S. titanus*, 68 *O. ishidae* e 35 *D. europaea*. Complessivamente il 39% degli esemplari sono risultati infetti da uno o più fitoplasmi FD, precisamente fitoplasmi del sottogruppo 16SrV-D, 31%; del sottogruppo 16SrV-C, 14%; 6% con infezioni miste. Considerando le singole specie di vettori, il sottogruppo 16SrV-D è risultato il più abbondante in *S. titanus* e in *O. ishidae*, mentre la maggior parte degli esemplari infetti di *D. europaea* ospitava fitoplasmi del sottogruppo 16SrV-C.

L'analisi di sequenza della regione secY ha indicato la presenza di tutti i tre ceppi di FD. In generale, il più abbondante è risultato essere FD2, con un tasso di infezione del 21%, seguito da FD3, 8% e FD1, 5%. In *S. titanus* FD2 è risultato il ceppo più frequente, mentre FD1 era più abbondante in *O. ishidae* e FD3 in *D. europaea*.

In conclusione, i risultati ottenuti hanno dimostrato la presenza di ceppi FD1, FD2 e FD3 in popolazioni di vettori in Piemonte; inoltre il ceppo FD2 sembra essere il più diffuso, soprattutto prendendo in considerazione il vettore più importante, vale a dire *S. titanus*.

Ricerca di fitoplasmi riferibili a flavescenza dorata e potenziali vettori nella Germania sud-occidentale

B. Jarausch, S. Biancu, M. Maixner
Julius Kühn-Institute, Institute for Plant Protection in Fruit Crops and Viticulture, Siebeldingen, Germania

La flavescenza dorata (FD) è una malattia da quarantena, diffusa dall'Europa meridionale alla Borgogna e in diverse parti dell'Austria e della Svizzera, che causa gravi danni alla vite. FD è associata a fitoplasmi appartenenti ai sottogruppi 16SrV-C e -D ("flavescence dorée phytoplasma", FDp). Il principale vettore dei fitoplasmi della flavescenza dorata è la cicalina *Scaphoideus titanus* Ball che trasmette efficacemente il fitoplasma da vite a vite. Fino ad ora né viti infette da FD né *S. titanus* infetti sono stati segnalati in Germania. Comunque, il fitoplasma agente di "Palatinate grapevine yellows" (PGY) (16SrV-C) è diffuso su ontano e può essere trasmesso dalla cicalina *Oncopsis alni* Schrank da olmo a vite, ma non da *S. titanus*. Inoltre, fitoplasmi associati a FD sono stati identificati in ontano.

Siccome *O. alni* è strettamente associata all'ontano, una inoculazione frequente a vite è improbabile. Però il rischio di una trasmissione ad opera di altri vettori più polifagi, come *Orientus ishidae* (Matsumura), è ancora incerto. Nell'ambito di un progetto europeo interregionale (INVAPROTECT) è stata avviata un'indagine per studiare la diffusione di fitoplasmi associati ad FD nella Germania sud-occidentale (Palatinato) e individuare altri potenziali vettori di fitoplasmi dei sottogruppi 16SrV-C e -D. Poiché nel 2016 *S. titanus* è stato segnalato per la prima volta nella regione dell'Alsazia, è stata intrapresa un'indagine coordinata sulla comparsa di FD e del vettore *S. titanus* in entrambe le regioni. Sono stati effettuati campionamenti di insetti su ontano e in vigneti adiacenti. In autunno sono stati fatti monitoraggi per i sintomi di giallume della vite in vigneti adiacenti ad ontani. Campioni delle specie di cicaline più abbondanti e di viti sintomatiche sono stati saggiati in PCR per la presenza di fitoplasmi del gruppo 16SrV utilizzando i primer fAY/rEY.

Nel 2016, 11 vigneti sono stati trovati infetti da PGY nel Palatinato. Su ontano, le cicaline più abbondanti, oltre ai tiflocibini, sono state *O. alni*, *O. ishidae, Allygus* spp., *Macropsis* spp., *Aphrophora alni* (Fallén) and *Lamprotettix nitidulus* (F.). Il potenziale vettore del fitoplasma della flavescenza *O. ishidae* è una specie invasiva e sembra essere già diffuso nella Germania meridionale. Tra le specie saggiate, circa il 65% di *O. ishidae* e *Allygus* spp. è risultato positivo a fitoplasmi del gruppo dei giallumi dell'olmo, mentre *L. nitidulus* (50%), *Macropsis* spp. (20%) e *O. alni* (14%) sono risultati meno infetti. Sino ad ora, nessun adulto né giovane di *S. titanus* è stato trovato nella Germania sud-occidentale.

Specie di *Cacopsylla* (Hemiptera, Psyllidae) presenti nei meleti in Alto Adige

S. Fischnaller*, M. Messner*, M. Parth, K. Janik
Centro di Sperimetazione Laimburg, Laimburg 6- Vadena, 39040 Ora (BZ)

**contributo equo*

La prevenzione per contenere la diffusione di una malattia associata a fitoplasmi, si basa soprattutto su misure di lotta indiretta. Per gli scopazzi del melo (AP), che dal 2005 hanno un impatto devastante sulla melicoltura dell'Alto Adige, tali misure comportano, fra l'altro, una lotta fitosanitaria contro i due vettori confermati *Cacopsylla picta* e *C. melanoneura* (Hemiptera, Psyllidae). Il monitoraggio degli insetti vettori rappresenta la base per lo sviluppo di una strategia di lotta efficace e ragionevole. Un'analisi delle specie di *Cacopsylla* presenti nel meleto fornisce informazioni importanti, sia per la comprensione della composizione e diffusione di specie oltre a *C. picta* e *C. melanoneura* in un certo ambiente, sia per poter individuare, se necessario, altre specie possibilmente coinvolte nella diffusione della malattia. Dal 2014 al 2016, nell'ambito di un'intensa indagine di pieno campo, sono stati monitorati da 44 a 50 impianti nelle zone più colpite dell'Alto Adige (Burggraviato e Val Venosta). Finora le tecniche di cattura per gli insetti vettori di AP si limitano a metodi generali. Durante la stagione vegetativa, usando il metodo del frappage e le trappole cromotropiche, sono stati catturati più di 7.400 individui adulti appartenenti al genere *Cacopsylla.* È stata accertata la presenza di 19 specie nell'area sorvegliata, cioè nell'agrosistema meleto dell'Alto Adige. L'andamento di popolazione è stato variabile nelle diverse annate, tuttavia le specie definite dominanti (indice Di >3,1%) sono *C. mali*, C. *pulchra* e *C. melanoneura*. La specie con maggior numero di catture è *C. mali* (>60%), tuttavia la sua presenza è stata limitata soprattutto ad un meleto abbandonato, e pertanto mostra di fatto una frequenza molto più bassa rispetto alle altre specie. L'elevata presenza di *C. pulchra*, sia come individui svernanti sia di nuova generazione, indica che la specie potrebbe completare il suo ciclo biologico anche su melo. *C. melanoneura* era presente in più del 50% dei meleti monitorati. Sia la sua abbondanza sia la sua frequenza sono aumentate considerevole nel 2016. Per altre specie ci sono notevoli variazioni sia di densità sia di frequenze tra gli anni. La popolazione di *C. picta* è diminuita gradualmente negli ultimi anni, probabilmente grazie ad una gestione fitosanitaria efficace. Inoltre, i metodi di monitoraggio usati mostrano un'efficacia diversa per specie e stadio di sviluppo. Per esempio, 83% delle catture di *C. melanoneura* e *C. picta* sono stati effettuati usando le battiture, mentre il numero di catture di *C. pulchra* sulle trappole supera il 70%.

Trasmissione transovarica di '*Candidatus* Phytoplasma mali' nel suo vettore *Cacopsylla picta*

C. Mittelberger[1], L. Obkircher[1], S. Öttl[1], T. Oppedisano[2], F. Pedrazzoli[2], B. Panassiti[1], C. Kerschbamer[1], G. Anfora[2], K. Janik[1]
[1]*Centro di Sperimentazione Laimburg, Laimburg 6, 39040 Auer/Ora (BZ),* [2]*Fondazione Edmund Mach, Via Edmund Mach 1, 38010 San Michele all'Adige (TN)*

Cacopsylla picta (*C. picta*) è molto importante per la trasmissione del batterio '*Candidatus* Phytoplasma mali' ('*Ca.* P. mali'), agente degli scopazzi del melo. L'insetto è in grado di acquisire fitoplasmi dal floema di meli infetti e di trasmetterlo ad alberi sani. In Trentino-Alto Adige *C. picta* e *Cacopsylla melanoneura* sono gli insetti vettori principali di '*Ca.* P. mali', anche se è stato dimostrato che *C. picta* è più efficiente nella trasmissione.
Una possibile ragione per l'efficienza elevata potrebbe essere la presenza di trasmissione transovarica, già dimostrata per altri fitoplasmi in diversi insetti vettori, come ad esempio nel caso di *Cacopsylla pruni*, l'insetto vettore di '*Candidatus* Phytoplasma prunorum'. Questo tipo di trasmissione, by-passando la pianta, permette una diffusione più rapida del fitoplasma. Tramite questo studio si è tentato di chiarire se le femmine di *C. picta* siano in grado di trasmettere i fitoplasmi direttamente alle uova.
Adulti remigranti di *C. picta* sono stati catturati in Valsugana e allevati su piccoli meli sotto rete. Questi insetti svernanti sono stati prelevati ed analizzati dopo la deposizione delle uova. Campioni di uova, neanidi e ninfe di ogni età e adulti neosfarfallati sono stati raccolti dalle piante ed analizzati usando un metodo SYBR Green qPCR.
I risultati evidenziano che la psilla *C. picta* è in grado di trasmettere il batterio direttamente ai suoi discendenti. Dodici femmine infette su 17 sono state in grado di trasmettere '*Ca.* P. mali' ai discendenti. Nei campioni di uova sono stati trovati fitoplasmi solo nel 30,2% dei casi, mentre, negli adulti neosfarfallati sono stati trovati nel 99,1% dei campioni. Questa discrepanza è probabilmente dovuta ad un limite tecnico nella rilevazione delle quantità di fitoplasmi nei campioni di uova. La concentrazione del batterio è aumentata in modo esponenziale dal secondo stadio di sviluppo fino agli adulti neosfarfallati, indicando che il fitoplasma si riproduce attivamente nelle neanidi e ninfe di *C. picta*.
Le femmine svernanti che non sono state in grado di trasmettere il fitoplasma avevano una concentrazione di '*Ca.* P. mali' ridotta di quasi 3.000 volte rispetto a quelle che hanno trasmesso il fitoplasma, indicando che l'abilità di trasmissione dipende dalla quantità di batterio presente nell'insetto durante la deposizione delle uova. Indipendentemente dallo stato di infezione le femmine svernanti hanno deposto circa 200 uova indicando che il tasso di deposizione non è influenzato dallo stato di infezione.
Lo studio ha dimostrato per la prima volta che l'insetto vettore *C. picta* è in grado di trasmettere '*Ca.* P. mali' per via transovarica alla generazione successiva. Questi risultati sono importanti non solo per la comprensione del ciclo della malattia, ma anche per la gestione del frutteto e sottolineano l'importanza di controllare sia la generazione svernante che quella neosfarfallata per ridurre il rischio di nuove infezioni.

Questo lavoro è stato realizzato nell'ambito dei progetti APPL2.0, APPLClust e SCOPAZZI-FEM ed è stato cofinanziato dalla Provincia Autonoma di Bolzano-Alto Adige, dal Consorzio Mela Alto Adige e dall'Associazione Consorziale Produttori Ortofrutticoli Trentini.

Analisi dell'espressione genica in viti cv Barbera e Nebbiolo risanate da flavescenza dorata

D. Pacifico, M. Legovich, L. Galetto, C. Marzachì, S. Palmano
Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante, CNR, Strada delle Cacce 73, 10135 Torino

Diversi fitoplasmi sono associati a malattie della vite coltivata (*Vitis vinifera* subs. *sativa*) note come giallumi della vite (GYs). Tra i GYs, la flavescenza dorata (FD) è la minaccia principale per l'industria vitivinicola europea ed italiana in particolare, già gravemente colpita in passato da esplosioni epidemiche della malattia. A causa della natura epidemica di FD, l'agente ad essa associato "Flavescence dorée phytoplasma" (FDp) è tuttora inserito nella lista europea dei patogeni da quarantena e il controllo della malattia è basato prevalentemente su trattamenti insetticidi obbligatori contro l'insetto vettore *Scaphoideus titanus*. Le viti sintomatiche possono manifestare negli anni successivi all'infezione una spontanea e stabile remissione dei sintomi, associata ad un recupero della produzione, un fenomeno noto in letteratura come "recovery" (risanamento spontaneo). I meccanismi di regolazione del "recovery" da FD non sono tuttora chiari, e rappresentano un aspetto ancora inesplorato dell'interazione vite-fitoplasma. Nel presente lavoro, le basi biologiche del "recovery" sono state studiate in due cultivar italiane, Barbera e Nebbiolo, caratterizzate da un diverso grado di suscettibilità all'infezione e da una differente capacità di recupero post-infezione. Foglie di viti sane e "recovered" (risanate da almeno due anni) sono state raccolte in due punti temporali nell'arco della stagione vegetativa (luglio e agosto), in un vigneto produttivo situato in Piemonte. Il vigneto è stato monitorato per diversi anni per stimare l'incidenza di FD e il corrispondente tasso di "recovery" delle due cultivar, fornendo una mappa dettagliata dello stato sanitario delle piante in studio. Per evidenziare i "pathway" cellulari maggiormente coinvolti nel risanamento spontaneo da FD di Barbera e Nebbiolo, sono stati selezionati 18 geni di vite coinvolti nei meccanismi di regolazione ormonale, della risposta ossidativa e dei processi di difesa, sulla base della letteratura disponibile e di studi preliminari. La variazione relativa nel livello di mRNA dei geni selezionati è stata misurata mediante RT-PCR quantitativa e correlata alla data di campionamento e allo stato sanitario mediante opportune analisi statistiche. In generale, nonostante l'influenza preponderante dell'epoca di campionamento sulla variazione dell'espressione genica, si possono evidenziare alcuni geni correlati alla produzione di perossido di idrogeno e di acido jasmonico in grado di discriminare tra campioni sani e campioni "recovered" di entrambe le cultivar, confermando un probabile ruolo dei metabolismi che coinvolgono queste molecole nel "recovery" di vite da FD.

Individuazione di fitoplasmi del giallume dell'astro in *Lachenalia* e *Gazania*

S. Paltrinieri, N. Contaldo, A. Bertaccini, M.G. Bellardi
Dipartimento di Scienze Agrarie, Patologia Vegetale, Alma Mater Studiorum - *Università di Bologna, Bologna*

La produzione di piante ornamentali riveste un ruolo di grande importanza economica nel panorama agricolo italiano e, di conseguenza, anche l'aspetto fitosanitario delle piante risulta fondamentale, sia per contenere le perdite in vivaio causate dalle avversità e sia dal punto di vista epidemiologico per evitare la diffusione di materiale vegetale infetto. *Gazania* spp. (Asteraceae) e *Lachenalia* spp. (Hyacinthaceae) sono specie molto apprezzate per i grandi fiori colorati, come pianta in vaso, per la realizzazione di bordure, ma anche per la produzione di fiori recisi la prima, ed a scopo ornamentale per i colorati fiori tubolari o campanulati la seconda.
Nel biennio 2016-2017 sono stati osservati in gazania sintomi che consistevano nel parziale arrotolamento ed arrossamento marginale della lamina fogliare, mentre in lachenalia erano presenti vistose malformazioni fiorali, apici verdi ed ingrossamento dello stelo. Le foglie di quest'ultima erano inoltre caratterizzate da striature necrotiche ed anulature clorotiche e necrotiche. Sono quindi state eseguite analisi molecolari su piante in vaso di *Gazania* spp. e *Lachenalia aloides*, la prima proveniente da un'azienda floro-vivaistica del Veneto, la seconda dalla Piana di Albenga (Savona).
I campioni, costituiti prevalentemente da tessuto vascolare prelevato dalle parti sintomatiche e da corrispondenti campioni prelevati da piante asintomatiche, sono stati sottoposti ad estrazione degli acidi nucleici utilizzando un protocollo che prevede l'uso di cloroformio/fenolo e successivamente sottoposti ad amplificazione del gene ribosomico 16S. Il DNA estratto è stato diluito 1: 100 ed amplificato in PCR diretta con i "primers" R16F2n/R2 a cui sono seguite, dopo diluizione 1: 30, le amplificazioni in PCR "nested" con le coppie di "primers" R16(I)F1/R1 e U5/U3 interne alla prima. Tutti i campioni prelevati dalle piante sintomatiche di gazania e lachenalia sono risultati positivi in entrambe le amplificazioni "nested" e l'analisi del polimorfismo della lunghezza dei frammenti di restrizione effettuata con le endonucleasi *Tru1*I e *Hha*I ha evidenziato la presenza di fitoplasmi del giallume dell'astro, correlati a '*Candidatus* Phytoplasma asteris', sottogruppo 16SrI-B. Nelle colture ornamentali il fitoplasma del giallume dell'astro (16SrI-B) è uno di quelli più frequentemente segnalati ma non era mai stato individuato in piante appartenenti ai generi *Lachenalia* e *Gazania*. Mentre per lachenalia questa rappresenta la prima segnalazione della presenza di fitoplasmi, in gazania sono stati di recente segnalati in Arabia Saudita fitoplasmi del gruppo 16SrII associati a sintomi simili a quelli individuati nelle colture del Veneto.

L'impatto della lotta chimica ai vettori degli scopazzi del melo sulla densità di popolazione degli acari fitoseidi e *Panonychus ulmi* nei frutteti dell'Alto Adige

M. Parth, S. Fischnaller, M. Messner, A. Gruber, K. Janik
Centro di Sperimentazione Laimburg, Laimburg 6, 39040 Auer/Ora (BZ)

Nel recente passato in alcune aree dell'Alto Adige si è manifestata un'alta incidenza degli scopazzi del melo. Per contrastare i danni collegati a questa fitoplasmosi e prevenire le nuove infestazioni sono state attuate specifiche misure di lotta agli insetti vettori. La strategia di lotta consigliata dagli organi di consulenza nelle zone più colpite, Burgraviato e Val Venosta, prevede dal 2014, oltre all'estirpo, l'utilizzo di fitofarmaci contro le psille C*acopsylla melanoneura* e C. *picta*. Per combattere *C. picta* è stato consigliato un trattamento con insetticidi a base del principio attivo Tau-fluvalinate durante la fioritura oltre a trattamenti aggiuntivi in pre- e postfioritura. È noto che il Tau-fluvalinate, che appartiene alla classe dei ciano-piretroidi, a causa dell'efficacia acaricida e di una scarsa selettività, può avere effetti collaterali sugli acari predatori (fitoseidi). L'obiettivo dell'indagine era di valutare se la strategia di lotta che viene applicata, specialmente l'uso del Tau-fluvalinate, danneggi i fitoseidi e di conseguenza favorisca lo sviluppo di infestazioni di *Panonychus ulmi.* Per rispondere al quesito della ricerca è stato condotto un monitoraggio triennale della densità di popolazione dei fitoseidi e di *P. ulmi* in 35 meleti (2014-2016). La selezione comprendeva sia impianti in cui è stato impiegato il Tau-fluvalinate che impianti dove si è rinunciato all'utilizzo di questa sostanza. In ognuno dei singoli siti sono stati eseguiti tre campionamenti all'anno, nei mesi di giugno, luglio e agosto. Sono stati prelevati 100 campioni di foglie da altrettante piante per sito e data. Inoltre, per monitorare la densità delle uova svernanti di *P. ulmi*, sono stati prelevati campioni di rami durante l'inverno (5 m/impianto).
In totale è stato registrato un costante aumento della densità dei fitoseidi dal 2014 al 2016, mentre l'abbondanza di *P. ulmi* non è aumentata significativamente durante il monitoraggio ed è rimasta generalmente sotto la soglia d'intervento. L'analisi dell'insieme dei nove campionamenti estivi, non evidenzia una correlazione significativa tra la densità di popolazione dei fitoseidi e dell'uso o meno di Tau-fluvalinate. Si può costatare che nei siti oggetto di studio non si è notato un incremento delle infestazioni di *P. ulmi* come atteso e la densità di popolazione dei fitoseidi non è calata, anzi è aumentata di anno in anno. La presente indagine non ha evidenziato nessun indizio o prova di un impatto negativo del Tau-fluvalinate sulla densità degli acari fitoseidi a medio termine.

Questo lavoro è stato realizzato nell'ambito del progetto APPLClust ed è stato cofinanziato dalla Provincia Autonoma di Bolzano-Alto Adige e dal Consorzio Mela Alto Adige.

Studio della suscettibilità a flavescenza dorata di viti Piemontesi

M. Pegoraro[1], D. Santini[1], M. Pesando[1], L. Galetto[1], D. Bosco[1,2], I. Gribaudo[1], C. Marzachì[1]
[1]*Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante, CNR, Strada delle Cacce 73, 10135 Torino;*
[2]*Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari, Università degli Studi di Torino, Largo Braccini 2, 10095 Grugliasco (TO)*

In Piemonte, la flavescenza dorata ("Flavescence dorée", FD) è la principale fitoplasmosi della vite, ed è responsabile di ingenti danni alla viticoltura regionale, in particolare nelle provincie di Asti, Cuneo e Alessandria.
Il progetto MEDVI (Indagine sui Meccanismi di Difesa da FD della Vite) è incentrato sullo studio della resistenza di diverse cultivar di vite a FD, in condizioni controllate come fase iniziale, e successivamente in vigneto. Per questo progetto sono state selezionate dieci principali cultivar di viti piemontesi: Brachetto, Timorasso, Cortese, Moscato, Barbera, Arneis, Erbaluce, Dolcetto, Freisa e Nebbiolo. Tralci di ciascuna cultivar sono stati fatti germogliare in acqua e i germogli sono stati micropropagati *in vitro*. Circa dieci piante per ogni cultivar sono state poi messe a radicare in compresse di torba e trasferite in vaso.
In parallelo si sono ottenuti giovani del vettore *Scaphoideus titanus* a partire dalle uova deposte nei tralci di viti raccolti in diversi vigneti. Ninfe dalla terza alla quinta età sono state poste ad acquisire FD su fave infette e mantenute su fava sana fino al completamento della fase di latenza. Le viti micropropagate, allo stadio di 5-6 foglie, sono state inoculate per una settimana con quattro *S. titanus* infetti, isolati tramite cilindri di plexiglass in condizioni controllate. L'infettività dei vettori è stata saggiata mediante saggio diagnostico molecolare. Le viti inoculate sono state analizzate per la presenza del fitoplasma a cinque e a otto settimane dall'inoculazione (wpi), con lo stesso sistema usato per gli insetti. La diagnosi molecolare è stata anche effettuata sulle radici delle piante alla data di 8 wpi. Alla stessa data si è anche quantificata la carica di fitoplasma in ciascuna pianta infetta e separatamente per le parti aeree e radicali. La quantificazione del fitoplasma relativamente al DNA della pianta è stata effettuata in Real-Time PCR, mediante primer specifici per il fitoplasma e la vite. A cinque wpi, il numero di piante infette variava tra 17% (Dolcetto) e 40% (Nebbiolo), ma nessuna delle piante appartenenti alle cultivar Cortese, Moscato e Brachetto era infetta. A otto wpi, le piante infette erano comprese tra 12% (Moscato) e 100% (Barbera). La popolazione di FD era inferiore al limite minimo di quantificazione in tutti i campioni infetti appartenenti alla cultivar Moscato, mentre era compresa tra 100 (Freisa) e 4.600 (Timorasso) cellule di fitoplasma per ng di DNA di vite nella parte aerea e tra 0,01 (Brachetto) e 15.600 (Dolcetto) cellule di FD/ng DNA di vite nelle radici.
I risultati preliminari hanno confermato i) la minore suscettibilità di alcune cultivar di vite a FD in seguito ad inoculazione in condizioni controllate, ii) la capacità del fitoplasma di sistemizzare nella vite infetta, raggiungendo anche popolazioni elevate nelle radici. L'esperimento sarà ripetuto per confermare i risultati ottenuti e per ottenere informazioni definitive sul ruolo delle diverse cultivar piemontesi nel quadro epidemiologico della FD in Piemonte.

Ruolo delle aree non coltivate per il contenimento di cicaline vettori di fitoplasmi nell'agroecosistema vigneto

F.M. Bocca, L. Picciau, A. Alma
Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari, Università degli Studi di Torino, Largo Braccini 2, 10095 Grugliasco (TO)

L'agroecosistema vigneto è un ecosistema antropizzato in cui la monocoltura della vite è inframmezzata ad habitat naturali quali incolti, aree boscate con vite inselvatichita, bordure e corridoi ecologici in cui la biodiversità vegetale e animale è preservata. Negli ultimi anni è stato evidenziato un notevole incremento nell'uso di insetticidi per la lotta contro le specie che arrecano danni alla vite, in particolare con la lotta obbligatoria per il contenimento della flavescenza dorata (FD) e in alcune regioni anche con gli interventi nei confronti del vettore del legno nero. FD, associata alla presenza di fitoplasmi del gruppo 16SrV, è trasmessa principalmente da *Scaphoideus titanus* Ball, una cicalina di origine neartica, recentemente è stato dimostrato anche il coinvolgimento di *Orientus ishidae* (Matsumura), specie di origine asiatica. Purtroppo, è noto che nelle aree non coltivate che lambiscono i vigneti ove sono presenti vite inselvatichita e numerose altre latifoglie arboree e arbustive, si riscontrino le maggiori densità di popolazione di queste due specie, rappresentando pertanto zone da cui hanno origine i flussi di reinfestazione verso i vigneti. In tali ambienti non è consentito l'utilizzo di insetticidi che andrebbero a causare pesanti ripercussioni negative sulle biocenosi presenti. L'assenza di mezzi efficaci per contrastarne la diffusione, pone l'attenzione sulla necessità di considerare tali ambienti non soltanto come un problema ma anche come una possibile risorsa. Infatti, possono rappresentare un habitat idoneo per la sopravvivenza di entomofagi indigeni in grado di limitare la diffusione dei due vettori esotici, introdotti nel nostro areale in periodi diversi, ripristinando in tal modo un equilibrio naturale. Pertanto, la lotta ai vettori non può prescindere dal considerare queste zone non gestite parte integrante dell'agroecosistema vigneto.

L'obiettivo di questo lavoro è studiare la funzione e il collegamento delle aree a compensazione ecologica con le aree vitate nell'agroecosistema, approfondendo le conoscenze sui biotopi e sulle biocenosi in esse presenti per favorire gli entomofagi (predatori e parassitoidi) in grado di contenere la diffusione dei deltocefalini vettori.

Sono condotte ricerche in campo faunistico e floristico-vegetazionale in tre aree viticole piemontesi: Canavese, Monferrato e Langhe Astigiane e Cuneese. I campionamenti entomologici sono effettuati nelle aree a bosco limitrofe ai vigneti per mezzo di trappole Malaise e nidi pedotrofici artificiali e raccolta diretta di giovani e adulti di *S. titanus* e *O. ishidae*. Inoltre, al fine di indagare sulla presenza di parassitoidi oofagi, nel periodo invernale sono stati raccolti tralci di vite inselvatichita. Dai tralci è stato rimosso il ritidoma mediante bisturi, al fine di selezionarne le porzioni con le uova e successivamente sono stati posti a incubare a temperatura di 22°C in provette falcon chiuse con cotone inumidito. Inoltre, sono stati realizzati 60 isolatori costituiti da manicotti di rete, in ciascuno dei quali sono stati posti dei tralci sterili e 15 adulti della stessa specie, collocati nelle aree non coltivate limitrofe ai vigneti. La rete ha una maglia di 1,4 x 1,4 mm, al fine di non consentire l'ingresso di altre cicaline estranee all'indagine, ma grandi abbastanza per permettere l'accesso ai parassitoidi che possono deporre nelle uova sentinella.

In funzione dei possibili risultati positivi, la gestione delle aree non coltivate come "area rifugio" preserverebbe e favorirebbe la popolazione di limitatori naturali riducendo i flussi di reinfestazione delle cicaline vettori nei vigneti, ottimizzando l'azione della lotta insetticida obbligatoria.

Variabilità genetica di '*Candidatus* Phytoplasma solani' in viti sintomatiche e asintomatiche

F. Quaglino[1], N. Mori[2], M. Faccincani[3], P. Casati[1], T. Marzorati[1], S. Filisetti[3], A. Passera[1], P.A. Bianco[1]
[1]*Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali - Territorio, Produzione, Agroenergia, Università degli Studi di Milano, via Celoria 2, 20133 Milano;* [2]*Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente, Università degli Studi di Padova, Agripolis - viale dell'università, 16 - Legnaro (PD);* [3]*Consorzio per la tutela del Franciacorta - via G. Verdi 53, 25030 Erbusco (BS)*

Questo lavoro ha avuto l'obiettivo di descrivere la variabilità genetica di '*Candidatus* Phytoplasma solani' in viti sintomatiche e asintomatiche al fine di ottenere informazioni preliminari sulla possibile diversa virulenza di ceppi geneticamente distinti.
Le attività sperimentali hanno previsto analisi di laboratorio condotte su campioni fogliari raccolti da 90 piante di vite (30 sintomatiche e 60 asintomatiche) nel Settembre 2015 in un vigneto di Chardonnay nel comune di Erbusco, in Franciacorta (BS). In particolare, sulla base dei rilievi sintomatologici effettuati negli anni precedenti a questo lavoro, le viti asintomatiche sono state suddivise in "viti sempre asintomatiche" (30 piante) e "viti risanate" (30 piante in cui è stato osservato il fenomeno del "recovery", remissione spontanea dei sintomi). Le attività di laboratorio hanno previsto: (i) estrazione degli acidi nucleici totali, (ii) identificazione di *Ca*. P. solani' attraverso analisi di real-time PCR, (iii) caratterizzazione molecolare dei fitoplasmi identificati attraverso l'amplificazione e l'analisi di restrizione enzimatica, condotta con l'enzima *Rsa*I, del gene *vmp1*.
Le analisi in real-time PCR hanno permesso di rilevare la presenza di '*Ca*. P. solani' in tutte le piante di vite sintomatiche, nel 10% (3/30) delle piante sempre asintomatiche e nel 30% (9/30) delle piante risanate. L'analisi RFLP del gene *vmp1* ha permesso di rilevare la presenza di tre profili di restrizione distinti all'interno della popolazione di fitoplasmi in esame. In dettaglio, due profili [*vmp1*-a (V12) e -b (V3)] sono stati rilevati nei ceppi di '*Ca*. P. solani' identificati in vite sintomatica, mentre un solo profilo (*vmp1*-c), mai riportato in letteratura, è stato riscontrato nei ceppi rilevati in viti asintomatiche.
In letteratura, è ampiamente riportato che nei casi di risanamento spontaneo (non solo in vite) la scomparsa dei sintomi è accompagnata dall'assenza del fitoplasma. In questo studio, inaspettatamente, '*Ca*. P. solani' è stato rilevato nel 30% delle viti risanate in esame. Di particolare interesse è il fatto che le popolazioni di '*Ca*. P. solani', qui riscontrate in viti sintomatiche e asintomatiche, sono risultate geneticamente distinte sulla base dell'analisi del gene *vmp1*, codificante la sintesi della proteina di membrana Vmp1, potenzialmente coinvolta nell'interazione pianta-patogeno. Studi precedenti hanno dimostrato la diversa virulenza di ceppi geneticamente distinti di '*Ca*. P. mali', agente degli scopazzi del melo. Le evidenze sperimentali del presente lavoro suggeriscono che anche nel caso di '*Ca*. P. solani' sia possibile la presenza di ceppi dalla diversa virulenza. Ulteriori studi (prove di trasmissione dei diversi ceppi in ambiente controllato) dovranno essere eseguiti per avvalorare questa ipotesi.

Identificazione e caratterizzazione del gene *BI-1* (*bax inhibitor-1*) in fitoplasmi geneticamente distinti

F. Quaglino[1], P. Casati[1], M. Frattini[1], R. Tedeschi[2], A. Alma[2], P.A. Bianco[1]
[1]*Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali - Territorio, Produzione, Agroenergia, Università degli Studi di Milano, via Celoria 2, 20133 Milano*; [2]*Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari, Università degli Studi di Torino*, *Largo Paolo Braccini 2, 10095 Grugliasco (TO)*

Le informazioni derivate dal sequenziamento completo o parziale del genoma di alcuni fitoplasmi hanno creato i presupposti per realizzare studi che hanno definito la comprensione di alcuni meccanismi coinvolti nell'interazione fitoplasma-ospite (per esempio, la produzione di effettori in grado di alterare la trascrizione dei geni della pianta infetta). Studi recenti hanno riportato la diminuzione del processo di morte cellulare programmata in piante infette da '*Candidatus* Phytoplasma asteris' e l'identificazione nei genomi dei fitoplasmi finora sequenziati, di un gene omologo a *BI-1* (*bax inhibitor-1*). Tale gene è noto in letteratura come inibitore dell'attività apoptotica cellulare in organismi eucarioti e procarioti.

Nel presente lavoro, sono stati condotti studi preliminari atti all'identificazione e alla caratterizzazione del gene *BI*-1 in fitoplasmi geneticamente distinti, associati a malattie che colpiscono numerose specie vegetali coltivate. Al fine di sviluppare una reazione specifica per l'amplificazione di *BI-1*, sono state analizzate (i) le sequenze nucleotidiche di *BI-1* identificate nei genomi di fitoplasmi disponibili in GenBank, e (ii) le sequenze delle regioni fiancheggianti il gene *BI-1*. Le amplificazioni sono state condotte in nested PCR con diverse coppie di primer universali degenerati per il genere '*Ca*. Phytoplasma', utilizzando come templato il DNA estratto da piante di vinca [*Catharanthus roseus* L. (G. Don)] infette da 30 ceppi di fitoplasma appartenenti a 8 diversi gruppi tassonomici.

I prodotti PCR, amplificati da 26 piante infette da ceppi di fitoplasma distinti. Al momento, sono state ottenete le sequenze di 7 ceppi appartenenti a 4 gruppi tassonomici. Le analisi bioinformatiche delle sequenze proteiche tradotte *in silico*, condotte con i software InterProScan5 e Phobius, hanno confermato l'appartenenza delle sequenze relative a 5 ceppi fitoplasmatici su 7 alla famiglia "bax inhibitor-1", evidenziandone la tipica struttura caratterizzata dalla presenza di 7 domini transmembrana. L'allineamento delle sequenze proteiche di BI-1, ottenute in questo lavoro, con sequenze omologhe di altri organismi procarioti e eucarioti disponibili in GenBank ha evidenziato la scarsa identità di sequenza ma, d'altra parte, ha rilevato la presenza di pattern amminoacidici conservati, suggerendo il mantenimento della funzione di BI-1 in organismi appartenenti a regni diversi. La scarsa omologia di sequenza del gene *BI-1* tra fitoplasmi di gruppi tassonomici distinti ha suggerito l'analisi della variabilità genetica di tale gene all'interno di fitoplasmi dello stesso gruppo. A tal fine, sono state caratterizzate le sequenze di 58 ceppi di '*Ca*. P. solani', agente del legno nero della vite. Le analisi hanno rivelato una totale identicità di sequenza del gene *BI-1* nei ceppi analizzati.

In conclusione, questo lavoro riporta la presenza del gene *BI-1* in fitoplasmi di gruppi tassonomici diversi, suggerendo il possibile ruolo di tale gene nell'interazione con l'ospite. Inoltre, l'identicità delle sequenze di *BI-1* in ceppi di fitoplasmi infettanti lo stesso ospite evidenzia la possibile elevata conservazione della funzione di tale gene nei meccanismi di interazione ospite-specifici. Ulteriori studi dovranno essere svolti per (i) identificare e caratterizzare la posizione del gene *BI-1* nel genoma di fitoplasma distinti e (ii) valutare l'effettiva funzione di tale gene nell'interazione con gli ospiti.

Indagini sulle popolazioni di Auchenorrinchi in un vigneto con elevata incidenza di legno nero

R.L. Minuz, E. Ranieri, S. Ruschioni, S. Murolo, S. Casavecchia, G. Romanazzi, N. Isidoro, P. Riolo
Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali, Università Politecnica delle Marche, Via Brecce Bianche, 60100 Ancona

Il legno nero (LN) della vite è un giallume di crescente importanza economica ed epidemiologica, associato alla presenza di '*Candidatus* Phytoplasma solani' trasmesso principalmente da *Hyalesthes obsoletus* (Hemiptera: Cixiidae). Tuttavia, secondo diversi autori altri insetti floemomizi (Cixiidae e Cicadellidae) sono probabilmente coinvolti nella trasmissione di questo fitoplasma in quanto, in alcune aree viticole, *H. obsoletus* è assente oppure la sua densità di popolazione non è correlata all'incidenza delle piante affette da LN. In questo studio sono state condotte delle indagini preliminari sulle popolazioni di Auchenorrinchi presenti in un vigneto con un'alta incidenza di LN. Il campionamento degli insetti è stato eseguito mediante l'utilizzo di trappole cromotattiche (n=52) e di un aspiratore a motore, a cadenza bisettimanale, da maggio a ottobre 2016, in un vigneto sito nel comune di Montalto delle Marche (AP). Le trappole sono state posizionate a un'altezza di 20 cm dal suolo secondo una griglia regolare georeferenziata. Le aspirazioni sono state effettuate sulla vegetazione erbacea delle aree di bordo del vigneto. Il rilievo della vegetazione spontanea è stato eseguito, nell'intorno di ogni punto di cattura, seguendo il metodo di Braun-Blanquet. Le specie maggiormente catturate nelle trappole sono state: *Neoaliturus fenestratus* (n=8504), *Thamnotettix zelleri* (n=373), *Psammotettix alienus* (n=312), *Philaenus spumarius* (n=285), *Euscelis lineolatus* (n=117), *Laodelphax striatellus* (n=64), *Exitianus capicola* (n=55), *Dictyophara europaea* (n=47), *Agalmatium flavescens* (n=38), *Recilia coronifera* (n=35), *Cicadella viridis* (n=27), *Mocydia crocea* (n=22). Solo 3 individui di *H. obsoletus* sono stati catturati nelle trappole durante l'intero periodo di campionamento. Le specie maggiormente campionate sulle piante erbacee presenti sui bordi del vigneto sono state: *P. alienus* (n=502), *E. lineolatus* (n=367), *Anaceratagallia laevis* (n=85), *N. fenestratus* (n=71), *Doratura homophila* (n=63), *Recilia schmidtgeni* (n=59), *P. spumarius* (n=49), *L. striatellus* (n=46), *Toya propinqua* (n=46), *E. capicola* (n=44) e *Thamnotettix zelleri* (n=21). Risultati preliminari di indagini molecolari condotte su individui di *A. laevis*, *Anaceratagallia ribauti*, *Anoplotettix fuscovenosus*, *Aphrodes bicinctus*, *E. capicola*, *Euscelidius variegatus*, *E. lineolatus*, *Fieberiella florii*, *H. obsoletus*, *Hyalesthes scotti*, *Macropsis fuscula*, *M. crocea*, *N. fenestratus*, *Oncopsis alni*, *P. alienus* e *Reptalus quinquecostatus* hanno permesso di individuare '*Ca.* P. solani' in *E. lineolatus*, *M. crocea*, *N. fenestratus* e *P. alienus*. Infine, sono state analizzate le correlazioni tra l'abbondanza delle specie vegetali spontanee e quella delle specie di insetti floemomizi maggiormente presenti nell'agroecosistema oggetto di indagine.

Primer "tengu"-specifici per l'individuazione di fitoplasmi gruppo 16SrI

S. Rizza[1], C. Marzachì[2], M. Tessitori[1, 2]
[1]Dipartimento di Agricoltura, Alimentazione e Ambiente, Di3A, Sezione Patologia Vegetale, Università di Catania, Via S. Sofia 100, 95123, Catania; [2]Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante, CNR, Strada delle Cacce 73, 10135 Torino

I meccanismi molecolari che stanno alla base dell'interazione tra fitoplasmi e piante ospiti sono ancora ampiamente sconosciuti. Ad oggi sono stati caratterizzati quattro effettori di fitoplasmi, tra cui il fattore di virulenza "phytoplasma tengu-su inducer" (TENGU) individuato per la prima volta nel genoma di "onion yellows phytoplasma" (OYp). Esso è associato a differenti alterazioni morfologiche, tra cui scopazzi, nanismo, difetti nella fillotassi e produzione di fiori sterili, tramite alterazione del bilancio ormonale di acido jasmonico e auxina della pianta.

Lo scopo di questo studio è l'individuazione e la caratterizzazione del gene effettore "tengu" in fitoplasmi riscontrati in campo e appartenenti a gruppi uguali o differenti dal gruppo 16SrI ("aster yellows"). L'analisi PCR, utilizzando la coppia di primer specifici tenguf/r progettati per il sequenziamento del gene *tengu* di "wheat blue dwarf phytoplasma" (JF923816), è stata preliminarmente messa a punto su controlli positivi al gruppo 16SrI quali "European aster yellows" (EAYp), "Chrysanthemum yellows" (CYp), "American aster yellows" (AAYp), "primula yellows" (PYp), "lettuce yellows" (LYp), "gladiolus yellows" (GlYp). In parallelo sono stati saggiati ceppi di riferimento appartenenti a gruppi ribosomici differenti: "European stone fruit yellows" (ESFYp) 16SrX-B, "flavescence dorée" (FDp) 16SrV-C, "clover proliferation" (CPp) 16SrVI-A, "tomato big bud" (TBBp) 16SrII-D, "crotalaria phyllody" (CrPhp) 16SrII.

Diciotto ceppi, provenienti da campioni prelevati da piante con sintomi di scopazzi e/o fasciazioni, in precedenza analizzati per la presenza di fitoplasmi e di cui era stato accertato il gruppo di appartenenza, sono stati saggiati con i primer tenguf/r.

L'analisi ha prodotto un amplicone specifico di 299 bp in 8 ceppi da campo ed in tutti i controlli positivi appartenenti al gruppo 16SrI, mentre nessuno dei controlli sani e dei ceppi di riferimento e da campo appartenenti ad altri gruppi ribosomici ha dato ampliconi della taglia attesa mostrando la specificità di questa coppia di primer nel rilevamento e identificazione specifica di fitoplasmi appartenenti al gruppo 16SrI. Sono stati sequenziati gli ampliconi ottenuti dai ceppi "Fedia virescence phytoplasma" (ceppo IS), "*Linaria* fasciation phytoplasma" (ceppo TR) e "Rumex dwarf phytoplasma" (ceppo MR1), ed in parallelo quelli dai ceppi di riferimento AAYp, CYp, PYp, LYp e GlYp. La ricerca per similarità ha confermato l'identità del gene in tutte le otto sequenze ottenute con una identità di sequenza compresa tra il 94 e il 100% con quelle disponibili in GenBank.

L'identificazione della presenza del gene *tengu* nei fitoplasmi di specie vegetali con fasciazioni e scopazzi conferma che i meccanismi di azione di fitoplasmi appartenenti al gruppo tassonomico 16Sr1 sono conservati anche in ospiti diversi.

D'altra parte, l'assenza dell'amplicone del gene *tengu* in fitoplasmi appartenenti a gruppi tassonomici diversi dal 16SrI da piante con sintomi di scopazzi suggerisce che questo gene sia esclusivamente presente nel gruppo 16SrI e che altri geni effettori, probabilmente diretti contro gli stessi bersagli dell'ospite, siano presenti in fitoplasmi di gruppi diversi, benché non sia possibile escludere che una scarsa identità di sequenza nella regione di "annealing" dei primers sia alla base della mancata amplificazione.