



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali

Corso di Laurea in Scienze Agrarie e del Territorio

Uso di induttori di resistenza biotici e abiotici per il
controllo del Legno nero della vite

*Use of biotic and abiotic resistance inducers to manage
grapevine Bois noir*

Relatore:

Prof. Gianfranco Romanazzi

Tesi di laurea di:

Marco Gregori

Correlatore:

Prof. Sergio Murolo

Anno Accademico 2018/2019

*“Dedicato alla mia famiglia,
che sempre mi ha sostenuto”*

Indice

	RIASSUNTO.....	
	ABSTRACT.....	
1.	INTRODUZIONE.....	1
1.1.	LA COLTIVAZIONE DELLA VITE NELLE MARCHE.....	1
1.2.	PRINCIPALI MALATTIE DELLA VITE.....	3
2.	I GIALLUMI DELLA VITE.....	5
2.1.	AGENTI CUSALI.....	5
2.2.	SINTOMATOLOGIA.....	6
2.3.	LEGNO NERO.....	9
2.3.1.	Fitoplasma.....	9
2.3.2.	Vettore.....	10
2.3.3.	Controllo Legno nero.....	12
2.4.	RECOVERY E STRATEGIE DI LOTTA CONTRO LE FITOPLASMOSI DELLA VITE.....	13
3.	OBBIETTIVI DELLA RICERCA.....	15
4.	MATERIALI E METODI.....	16
4.1.	CARATTERISTICHE GENERALI DEL VIGNETO.....	16
4.2.	SCHEMA SPERIMENTALE.....	17
4.3.	DATI CLIMATICI.....	18
4.4.	RILIEVO DEI SINTOMI ASCRIVIBILI A LEGNO NERO.....	18
4.5.	VALUTAZIONE DELLE INFEZIONI DI PERONOSPORA SULLE FOGLIE.....	18
4.6.	RACCOLTA DEI CAMPIONI VEGETALI E ANALISI BIOMOLECOLARE.....	19
4.7.	ANALISI MOLECOLARE PER IL RILEVAMENTO DI “<i>CANDIDATUS</i> PHYTOPLASMA SOLANI”.....	19
5.	RISULTATI.....	23
5.1.	VALUTAZIONE DEI SINTOMI ASCRIVIBILI A LEGNO NERO	24
5.1.1.	Prova preventiva.....	26
5.1.2.	Prova curativa.....	27
5.2.	RISULTATI VALUTAZIONE DELLE INFEZIONI DI PERONOSPORA SULLE FOGLIE	28

5.3.	DIAGNOSI MOLECOLARE DI “<i>CANDIDATUS PHYTOPLASMA SOLANI</i>”.....	31
6.	DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....	33
7.	BIBLIOGRAFIA.....	37
8.	RINGRAZIAMENTI.....	50

RIASSUNTO

La vite è una delle principali colture a livello italiano ed europeo, la cui produzione può essere fortemente influenzata da infezioni di 'Candidatus Phytoplasma solani', agente del Legno nero. Attualmente non esistono formulati commerciali in grado di contenere questa avversità. Scopo della presente ricerca è stato quello di valutare l'efficacia di induttori di resistenza biotici e abiotici sia in una prova "preventiva" che in una prova "curativa". Le prove sono state condotte in un vigneto dell'azienda vitivinicola Moncaro Terre Cortesi, ubicato a Castelplanio, in provincia di Ancona. La sperimentazione ha interessato un vigneto coltivato con cv. Chardonnay, vitigno caratterizzato dall'alta sensibilità a Legno nero. Lo schema sperimentale adottato ha previsto nella "prova preventiva", 5 tesi (Kendal, F1 dose1, F1 dose 2, acqua ed il testimone non trattato), ognuna delle quali con sette ripetizioni, distribuite in campo secondo il modello sperimentale di blocco randomizzato. "La prova curativa" ha interessato circa 35 piante per ciascuno dei trattamenti, gli stessi della "prova preventiva". I trattamenti sono stati effettuati ogni due settimane da metà aprile sino a metà settembre 2018. Sono stati effettuati tre rilievi sulla vegetazione (a giugno, luglio e settembre) per valutare la percentuale di piante recovered. Inoltre, è stata valutata l'azione collaterale dei formulati applicati nei confronti di infezioni di peronospora. Dall'elaborazione dei dati risulta che i formulati hanno debolmente contribuito ad incrementare il fenomeno del recovery nel 2018. Sono comunque risultate poche le nuove piante sintomatiche comparse all'interno della prova "preventiva". Infine, non sono state riscontrate differenze significative per quanto riguarda il contenimento delle infezioni di peronospora, ad eccezione delle applicazioni del Kendal, che sembra aver ridotto l'incidenza della malattia. Le informazioni ottenute da tale prova dovranno essere ulteriormente approfondite per ottenere conferme e nuove informazioni su cui lavorare, in maniera da ottenere un mezzo sostenibile per il controllo del Legno nero della vite.

ABSTRACT

Grapevine is one of the main crops at the Italian and European level, the production of which can be strongly influenced by 'Candidatus Phytoplasma solani', that is Bois noir agent. There are currently no commercial formulations that can contain this disease. The purpose of this research was to assess the effectiveness of biotic and abiotic resistance inductors in both a "preventive" and "curative" trial. The tests were run in a vineyard of the Moncaro Terre Cortesi winery, located in Castelplanio, in the province of Ancona. The trials involved a vineyard grown with cv. Chardonnay, a cultivar characterized by high sensitivity to Bois noir. The experimental scheme adopted provided in the "preventive test", 5 treatments (Kendal, F1 dose1, F1 dose 2, water and the untreated control), each with seven replicates, distributed in the field according to an experimental model of randomized block. The "curative test" involved about 35 plants for each of the treatments, the same as the "preventive test". Applications were carried out every two weeks from mid-April until mid-September 2018. Three vegetation surveys were carried out (in June, July and September) to assess the percentage of recovered plants. In addition, the side activity of the formulations applied against peronospora infections was assessed. Data elaboration showed that formulations weakly contributed to increasing the recovery phenomenon in 2018. However, few new symptomatic plants appeared in the "preventive" test. No significant differences were found in the containment of downy mildew infections, with the exception of Kendal, which appear to have reduced the incidence of the disease. The information obtained from this test will need to be further investigated to obtain confirmations and new information to work on, in order to obtain a sustainable means for the control of the grapevine Bois noir.

1. INTRODUZIONE

1.1. LA COLTIVAZIONE DELLA VITE NELLE MARCHE

La viticoltura, che letteralmente significa “domesticazione della vite” ha una storia lunga migliaia di anni, coinvolgendo diversi popoli sia in medio-oriente che nel Bacino del Mediterraneo. Attualmente si ipotizzano per il genere *Vitis* tre grandi centri d’origine: uno in America settentrionale con qualche estensione in America centrale e meridionale; il secondo situato in Asia orientale, comprendente Nepal, Cina e Giappone, con qualche estensione nella Malesia e in Australia; ed il terzo definito Euro-Asiatico, il più importante, comprendente *Vitis vinifera*.

In Italia, la viticoltura sarebbe giunta in Sicilia con i colonizzatori egeo-micenei e si sarebbe successivamente diffusa lungo le coste meridionali; alla diffusione nel centro e nel nord della penisola, avrebbero invece contribuito in massima parte gli Etruschi (Fregoni, 2005).

L’Italia è il primo produttore al mondo di vino con circa 54 milioni di ettolitri. Però, pur essendo la vite diffusa in tutte le regioni italiane, si sta assistendo ad una progressiva contrazione della superficie vitata che è passata da 692.000 ha coltivati nel 2000 a 629.000 ha nel 2018 (ISTAT, 2018).

Per la produzione di vino si utilizzano principalmente vitigni nazionali, soprattutto autoctoni; infatti, nonostante la riduzione della superficie vitata, il crescente successo dei vini ottenuti da tali vitigni ha riguardato sia il mercato nazionale che internazionale. Anche nelle Marche, la superficie vitata ha subito una contrazione negli ultimi anni, infatti si è passati dai 21.484 ettari coltivati del 2000 ai 17.563 ha del 2018. La coltivazione della vite è distribuita per circa 85 % in collina, per metà nelle province di Ascoli Piceno e Fermo ed un quarto in quella di Ancona. Nella regione esiste un’ampia variabilità genetica, con 206 varietà censite, ma i vitigni principalmente coltivati sono Sangiovese, Montepulciano, Verdicchio e Trebbiano Toscano, che interessano più del 70 % della superficie vitata, seguiti da Pecorino, Passerina, Biancame e Maceratino (a bacca bianca), Vernaccia nera e Lacrima (a bacca nera). Accanto a questi, sono presenti altri vitigni autoctoni di un certo interesse enologico e per i quali è in atto un lavoro di valorizzazione che, a partire dalla sperimentazione, coinvolge l’intera filiera (Romanazzi *et al.*, 2006). Inoltre, la viticoltura marchigiana presenta delle superfici investite con vitigni internazionali (Chardonnay, Merlot, Sauvignon, Cabernet Sauvignon, Sirah, ecc.),

coltivati con successo e inseriti in alcuni disciplinari di produzione.

Nelle Marche hanno ottenuto il riconoscimento della Denominazione di Origine Controllata e Garantita (DOCG) cinque vini: la Vernaccia di Serrapetrona, il Conero Riserva, il Verdicchio castelli di Jesi riserva, il Verdicchio di Matelica riserva e l'Offida. Oltre alle cinque DOCG, sono definite 15 aree a denominazione di origine controllata (DOC): Bianchello del Metauro, Colli Maceratesi, Colli Pesaresi, Esino, Falerio dei Colli Ascolani o Falerio, I Terreni di San Severino, Lacrima di Morro o Lacrima di Morro d'Alba, Offida, Rosso Conero, Rosso Piceno, Serrapetrona, Verdicchio dei Castelli di Jesi e Verdicchio di Matelica (Fig. 1), alle quali si sono recentemente aggiunte Pergola e San Ginesio.

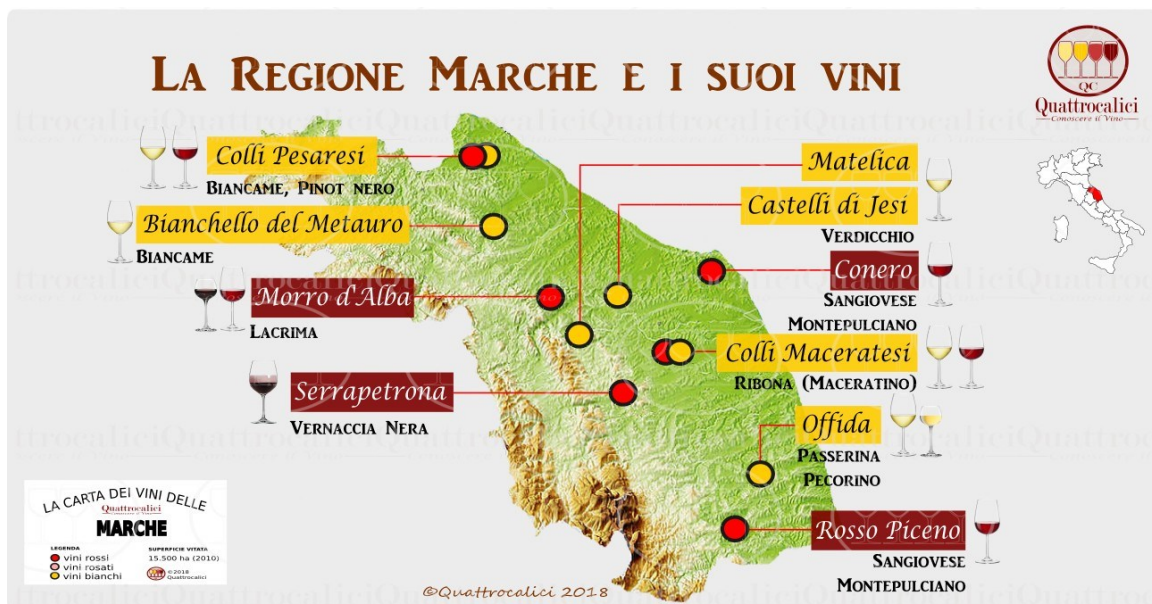


Fig. 1 – Aree di produzione dei principali vini delle Marche (Quattroclici, 2018).

I vigneti delle Marche sono generalmente disposti in filari secondo la sistemazione a rittochino, ovvero si estendono lungo le linee di massima pendenza, spesso caratterizzati da inerbimento lungo l'interfila che agevola sia le operazioni di trattamento dei vigneti che quella successiva di raccolta. La forma di allevamento preponderante è la controspalliera, spesso in passato in forma di "capovolto bilaterale", caratterizzata da potatura lunga e tralcio rinnovato. Negli ultimi anni, però, si è registrata una inversione di tendenza: i nuovi impianti sono indirizzati verso forme semplificate, che consentono una maggiore meccanizzazione, permettendo di ridurre i costi di gestione e produzione e allo stesso tempo garantire una coltivazione più sostenibile senza trascurare l'ottenimento

di prodotti di migliore qualità. A sostegno della volontà di puntare su una viticoltura sostenibile al 2017 la superficie vitata biologica e in conversione nelle Marche era di 5325 ha.

1.2. PRINCIPALI MALATTIE DELLA VITE

La vite, come altre specie, è soggetta a diverse malattie, determinate da diversi agenti patogeni (funghi, batteri, virus, viroidi e fitoplasmi) (Tab. 1). La manifestazione e la gravità di tali malattie in genere varia in funzione del vitigno, dell'andamento climatico e dell'ambiente di coltivazione.

Tab. 1 - Principali avversità della vite.

Fitoplasmosi	Agente/i causale/i
Legno nero	" <i>Candidatus Phytoplasma solani</i> "
Flavescenza dorata	Fitoplasmi sottogruppi 16SrV-C e 16SrV-C
Malattie fungine	Agente/i causale/i
Peronospora	<i>Plasmopara viticola</i>
Oidio	<i>Erysiphe necator</i>
Muffa grigia	<i>Botrytis cinerea</i>
Mal dell'esca	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i> <i>Fomitipora mediterranea</i> <i>Phaeoacremonium ultimum</i>
Escoriosi	<i>Phomopsis viticola</i>
Verticillosi	<i>Verticillium dahliae</i>
Eutipiosi	<i>Eutypa lata</i>
Marciume acido	Lieviti e batteri vari
Marciume nero	<i>Guignardia bidwelli</i>
Marciume radicale fibroso	<i>Armillaria mellea</i>
Marciume radicale lanoso	<i>Rosellina necatrix</i>
Batteriosi	Agente causale
Malattia di Pierce	<i>Xylella fastidiosa</i>

Anche le ampelopatie causate dai virus sono numerose, alcune delle quali molto gravi e, in genere, dannose per le produzioni viticole sia per la ridotta quantità delle uve prodotte sia per la scarsa qualità dei vini da esse ottenuti. Inoltre, la presenza di alcuni virus nel materiale di propagazione riduce drasticamente la percentuale di attecchimento degli innesti ed è probabilmente all'origine dei fenomeni di disaffinità di innesto (Martelli, 2017).

Tra le diverse malattie che attaccano la vite, negli ultimi decenni un ruolo sempre più importante è ricoperto dalle fitoplasmosi o giallumi della vite, in particolare Flavescenza dorata e Legno nero per il rilevante impatto sulla produzione sia da un punto di vista quantitativo sia qualitativo (Belli et al., 2011).

2. I GIALLUMI DELLA VITE

2.1. AGENTI CAUSALI

I fitoplasmi sono responsabili dei giallumi della vite. Questi agenti di malattia sono organismi unicellulari fitopatogeni, privi di parete cellulare e con un diametro variabile tra 0,1 e 1,2 micrometri. Appartengono alla classe *Mollicutes*, organismi con cui condividono, oltre al pleomorfismo, anche un genoma di piccole dimensioni (600-1200 Kb), portato da un singolo cromosoma con un basso contenuto in G-C (20-30%) (Muto e Osawa, 1987; Sears *et al.*, 1989; Marcone *et al.*, 1999).

All'interno delle cellule floematiche dell'ospite (Fig. 2), i fitoplasmi, essendo privi di parete cellulare e avendo una membrana cellulare molto sottile, possono acquisire svariate forme e dimensioni.

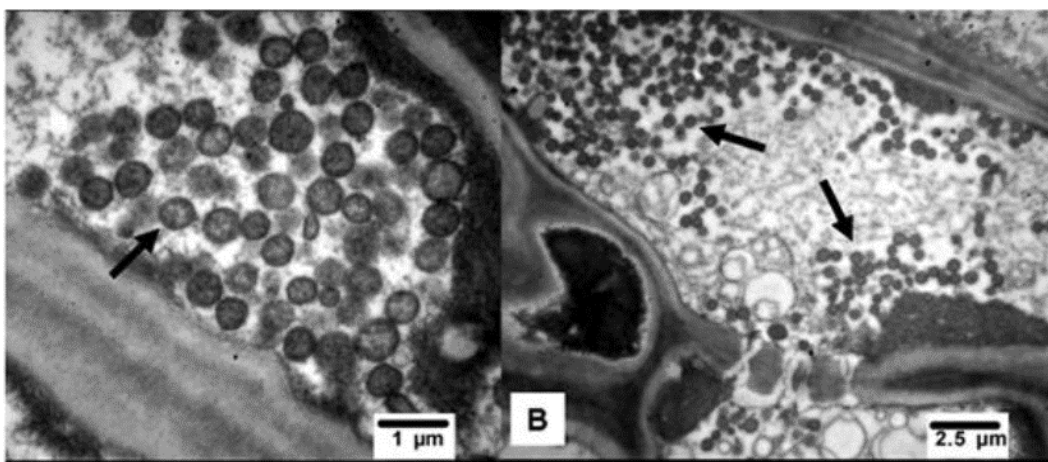


Fig. 2 – Sezione trasversale di vasi floematici in cui proliferano i fitoplasmi.

I fitoplasmi sono patogeni obbligati e in quanto tali non possono essere coltivati *in vitro*. L'impossibilità di coltivare su substrati artificiali tali patogeni ne rende difficoltoso l'individuazione delle caratteristiche biologiche e soprattutto i processi patogenetici alla base dell'isorgenza della malattia. Attualmente, un ruolo fondamentale nella costruzione degli inquadramenti filogenetici e tassonomici è rivestito dall'analisi comparativa di sequenze genomiche particolarmente conservate durante l'evoluzione come ad esempio quella codificante l'RNA ribosomico 16S (Lee *et al.*, 1993; Namba *et al.*, 1993; Schneider *et al.*, 1995). L'analisi del polimorfismo di lunghezza dei segmenti

di restrizione (restriction fragments length polymorphism, RFLP), condotta sul gene codificante la frazione 16S dell'RNA ribosomico (16SrRNA) ha consentito di costruire una suddivisione dei fitoplasmi conosciuti in 15 gruppi ribosomici (gruppi 16Sr) ed al loro interno un numero complessivo di circa 40 sottogruppi (Lee *et al.*, 1998; Montano *et al.*, 2001).

Per una differenziazione più fine dei fitoplasmi, sono utilizzati ulteriori marcatori genetici come strumenti complementari quali i geni della proteina ribosomiale (rp), *secY*, *tuf*, le sequenze delle regioni spaziatriche intergenetiche 16S-23S rRNA e geni codificanti proteine di membrana (*vmp1*, *stamp*) (Cimerman *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 1994; 2004a; 2004b; 2006; Martini *et al.*, 2002; 2007; Murolo *et al.*, 2010a; Schneider *et al.*, 1997; Smart *et al.*, 1996). Di recente, mediante una restrizione virtuale, i gruppi sono diventati 25 (Wei *et al.*, 2007). In base a tale tecnica due nuovi sottogruppi (16 SrXII-A20 e 16SrXII-A21) del gruppo XII sono stati trovati nelle Marche (Quaglino *et al.*, 2009).

Vista la mancanza di differenziazioni fenotipiche per questi patogeni non si può fare una classificazione basata su genere e specie ma si adotta la terminologia “*Candidatus*” status. Affinchè si possa introdurre un nuovo *Candidatus* Phytoplasma, questo deve avere una omologia inferiore al 97,5% sul gene 16Sr rispetto a fitoplasmi già descritti (IRPCM, 2004). Tale limite è stato fissato in quanto al di sotto di esso è altamente improbabile che gli organismi comparati condividano più del 60-70% di omologia a livello genomico e si tratta quindi di organismi correlati solo a livello di specie (Stackebrandt e Goebel, 1994). Però, si è osservato che fitoplasmi con un'omologia nucleotidica sul gene 16S che supera o eguaglia la soglia sopra indicata possano avere delle caratteristiche molto differenti a livello biologico (vettori), e gamma di ospiti vegetali e sintomatologia indotta.

2.2. SINTOMATOLOGIA

Su vite sono stati segnalati fitoplasmi responsabili dei giallumi della vite, appartenenti al gruppo ribosomico 16SrI, 16SrIII, 16SrV, 16SrX, 16SrXII in diverse parti del mondo (Tab. 2). I fitoplasmi più comunemente ritrovati in Italia sono quelli responsabili della “Flavescenza dorata” (FD) e “Legno nero” (LN), che manifestano una convergenza del quadro sintomatico e solo l'applicazione di tecniche bio-molecolare possono rilevarne e definirne l'agente patogeno.

Tab. 2 – Fitoplasmi identificati su vite nel modo

Gruppo ribosomico	“<i>Candidatus specie</i>” (nome)	Distribuzione geografica
16SrI-A	“ <i>Candidatus Phytoplasma asteris</i> ” (big bud del pomodoro)	Usa (Virginia), Canada
16SrI-B	“ <i>Ca. P. asteris</i> ” (giallume dell’astro)	Italia, Cile, Sud Africa
16SrI-C	“ <i>Ca. P. asteris</i> ” (fillodia del trifoglio)	Italia, Cile
16SrII-A	“ <i>Ca. P. asteris</i> ” (ingrossamento dei germogli del pomodoro)	Australia
16SrII-B	“ <i>Ca. P. aurantifolia</i> ” (scopazzo della lima acida)	Sud Africa
16SrIII	“ <i>Ca. P. pruni</i> ” (malattia X delle drupacee)	Italia, Israele
16SrIII-I	“ <i>Ca. P. pruni</i> ” (malattia X delle drupacee)	Usa (Virginia)
16SrV-A	“ <i>Ca. P. ulmi</i> ” (giallume dell’olmo)	Italia
16SrV-C	Flavescenza dorata (FD-C)	Italia, Francia, Austria, Svizzera, Serbia, Slovenia, Croazia, Ungheria, Romania
16SrV-D	Flavescenza dorata (FD-D)	Italia, Francia, Spagna, Portogallo, Austria, Slovenia, Croazia
16SrX-B	“ <i>Ca. P. prunorum</i> ” (giallume europeo delle drupacee)	Ungheria, Serbia
16SrXII-A	“ <i>Ca. P. solani</i> ” (legno nero)	Ue, Israele, Ucraina, Serbia, Bosnia & Erzegovina, Cile, Turchia, Canada, Sud Africa, Iran, Cina, Libano, Giordania
16SrXII-B	“ <i>Ca. P. australiense</i> ” (giallume della vite australiana)	Australia, Nuova Zelanda

I sintomi possono comparire molto precocemente, subito dopo la ripresa vegetativa, causando un germogliamento ridotto ed irregolare, caratterizzato dalla presenza di molte gemme cieche sui capi a frutto lasciati dopo la potatura, evidente anche se i tralci sono ben formati (Morone *et al.*, 2000). Le foglie attaccate precocemente si presentano di dimensioni minori rispetto a quelle normali; mostrano arrotondamento dei bordi, aspetto luccicante e hanno diversi punti di rottura tanto che al tatto risultano essere scricchiolanti e molto fragili. L'apice dei germogli tende a necrotizzare e si atrofizza, comportando l'arresto della crescita; nei casi più gravi dissecca e cade in corrispondenza dei sottostanti nodi. Le infiorescenze attaccate imbruniscono rapidamente e gradualmente cadono a terra insieme alla parte apicale del germoglio. L'effetto di tali sintomi provoca un grave deperimento della pianta che aumenta con il progredire della stagione estiva. Questi sintomi si manifestano chiaramente già a distanza di 20-40 giorni dall'inizio del germogliamento della vite. L'intensità del danno varia in funzione della suscettibilità varietale e può coinvolgere tutti i germogli, oppure limitarsi ad alcuni tratti del cordone permanente.

A partire dall'inizio dell'estate, si manifestano i sintomi che classicamente sono riconducibili ai giallumi della vite: le foglie presentano alterazioni cromatiche evidenti (Fig. 3), necrosi nervali e consistenza coriacea, e gli acini si disidratano sui grappoli oppure, con il passare del tempo, disseccano e cadono. Verso settembre-ottobre, con l'avanzare della stagione vegetativa, la manifestazione dei sintomi si acuisce e diventa inconfondibile. La crescente presenza di sintomi riscontrabili sulla vegetazione corrisponde a profonde modificazioni dei principali processi fisiologici della pianta, come fotosintesi, traspirazione e metabolismo degli zuccheri (Bertamini *et al.*, 2002; Endeshaw *et al.*, 2012). Le modificazioni a carico dei processi fisiologici della pianta determina, specialmente nei tralci maggiormente colpiti, una lignificazione non regolare. Si osserva quindi un processo di agostamento incompleto, con parziale lignificazione di internodi e nodi. Tale condizione diventa facilmente osservabile dopo la caduta delle foglie. La mancata o incompleta lignificazione dei tralci li sottopone ad alti rischi di danneggiamento durante il periodo invernale, compromettendo in tal modo la ripresa vegetativa dei tralci colpiti.



Fig. 3 – Foglie di vite accartocciate, che assumono una conformazione a triangolo.

2.3. LEGNO NERO

2.3.1. Fitoplasma

Il legno nero (LN) della vite è associato al fitoplasma del gruppo dello stolbur (16SrXII-A), recentemente classificato come ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’ (Quaglino *et al.*, 2013), presente in tutta Europa e in Asia Minore (Ember *et al.*, 2018; Pierro *et al.*, 2019). In Italia sono numerose le ricerche che hanno confermato la presenza di fitoplasmi associati al Legno nero in tutte le regioni italiane (Albanese *et al.*, 1996, 1997, 2006; Alma e Conti, 2002; Belli *et al.*, 1997; Belli *et al.*, 2010; Bertaccini *et al.*, 1999; Bisognin *et al.*, 2002; Conti, 2001; Credi *et al.*, 2001; D’Ascenzo *et al.*, 2005; Di Terlizzi *et al.*, 1993; Frausin, 2000; Granata, 1982; Marcone *et al.*, 1997, 2000; Marzachi *et al.*, 2001; Morone *et al.*, 2000; Romanazzi *et al.*, 2007a; Sfalanga *et al.*, 1999, 2001; Silletti *et al.*, 2008; Murolo e Romanazzi, 2015).

Studi condotti in Germania hanno permesso di differenziare, sulla base del gene *tuf* tre ceppi di fitoplasmi, indicati come *tuf-a*, *-b*, *-c*, appartenenti al gruppo dello stolbur, rintracciati in vite ed in campioni di *Hyalesthes obsoletus* (Signoret), vettore della malattia (Maixneir, 1994; Sforza *et al.*, 1998) e di correlarli a fitoplasmi individuati in tre

tipi di piante erbacee, ospiti del vettore, quali *Convolvulus arvensis*, *Urtica dioica* e *Calystegia sepium* (Langer *et al.*, 2003) (Fig. 4).



Fig. 4 – Foto di *Urtica dioica* (sinistra) e *Convolvulus arvensis* (destra).

Tutti i tipi di *tuf*, in particolare *tuf-a* e *tuf-b*, sono presenti in Italia, ma con diversa prevalenza regionale (Pasquini *et al.*, 2007; Romanazzi e Murolo, 2008a; Silletti *et al.*, 2008; Murolo e Romanazzi, 2015). Altri geni come quelli delle proteine ribosomiali, *SecY*, *Stamp*, *vmp1*, meno conservati, vengono utilizzati accanto al gene *tuf* per un'ulteriore caratterizzazione degli isolati Stolbur (Fabre *et al.*, 2011; Pacifico *et al.*, 2009). Lo studio della variabilità dei geni *SecY*, *Stamp* e *vmp1*, non solo è utilizzato a fini diagnostici, ma consente anche la differenziazione dei ceppi (Murolo *et al.*, 2010, 2014). Inoltre, le proteine di membrana svolgono un ruolo centrale nei meccanismi molecolari delle interazioni ospite-fitoplasmici e specificità vettore e quindi sono soggetti ad una selezione positiva, che in genere porta ad una elevata variabilità genica (Maixner, 2011).

2.3.2. Vettore

Hyalesthes obsoletus è un insetto Omottero auchenorrhinco appartenente alla famiglia dei Cixiidi, diffuso in tutta Europa e in tutto il bacino del Mediterraneo. I Cixiidi sono una famiglia complessa dal punto di vista sistematico, non sempre semplici da identificare. Hanno il capo piuttosto piccolo, non prolungato in avanti, con occhi globosi, ali membranose, trasparenti, spesso con macchie nero-brune lungo le venature e zampe con tibie posteriori prive di sperone mobile (Alma, 2008). In Italia è stato trovato per la prima volta nel secolo scorso (Ferrari, 1985) ed è stato segnalato su più di 50 specie

vegetali anche se vive preferenzialmente su ortica, convolvolo, lavanda e sulla vite sopravvive solo alcuni giorni (Pavan, 1989; Sforza *et al.*, 1998). *H. obsoletus* è una specie monovoltina, quindi compie un solo ciclo durante l'anno: sverna principalmente come ninfa di terzo stadio mentre le ninfe di quarto e quinto stadio si trovano a fine aprile-primi di maggio. Le forme giovanili, di colore bianco candido, sono facilmente riconoscibili perché ricoperte di secrezioni cerose. Durante il periodo autunnale gli stadi giovanili vivono nel sottosuolo a livello delle radici delle piante ospiti (soprattutto ortica) e sono presenti sul colletto o nei primi centimetri di terreno, mentre durante l'inverno sono presenti a maggiore profondità, a seconda della temperatura, in terreni inerbiti o poco lavorati e ricchi di scheletro. Gli adulti compaiono ad inizio giugno e rimangono attivi fino alla seconda decade di settembre e si possono ritrovare sul cotico erboso, sulle capezzagne o sui bordi del vigneto soprattutto su piante di ortica e convolvolo. La deposizione delle uova inizia verso la metà di luglio e prosegue fino a metà settembre.

Anche indagini svolte nelle Marche hanno evidenziato la presenza di “Ca. P. solani” in *H. obsoletus* ed altri potenziali vettori (Riolo *et al.*, 2006). Molte altre specie di insetti achenorinchi sono stati trovati infetti da tale patogeno, come *Reptalus panzeri* (Löw) (Palermo *et al.*, 2004; Botti *et al.*, 2005; Jović *et al.*, 2007), che recentemente è stato annoverato ufficialmente tra i vettori (Cvrković *et al.*, 2014), e *Reptalus quinquecostatus* (Dufour), *Hyalesthes luteipes* (Fieber) (Trivellone *et al.*, 2005), *Pentastiridius beieri* (Wagner) (Gatineau *et al.*, 2001), che rappresentano potenziali vettori, il cui ruolo nella diffusione del LN della vite non è ancora stato dimostrato.



Fig. 5 – *Hyalesthes obsoletus*: adulto, visto dorsalmente.

2.3.3. Controllo del Legno nero

La prevenzione delle infezioni rappresenta la più valida strategia di difesa contro tale ampelopatia. Essa si basa essenzialmente su misure di lotta agronomica. Sono noti alcuni interventi che possono essere messi in atto per limitare la diffusione di LN e talora anche di ridurre la gravità dei sintomi. Tali interventi sono generalmente pratiche ecosostenibili e caratterizzate da bassi costi, che però non hanno un effetto risolutore. Tra questi mostrano particolare interesse:

- 1) la spollonatura delle viti, pratica che consiste nell'eliminazione dei ricacci basali, in quanto questi costituiscono fonte di nutrimento preferenziale per i vettori ed in particolar modo per le specie che si nutrono anche su piante erbacee, come *H. obsoletus*;
- 2) la gestione dell'inerbimento naturale nel vigneto al fine di evitare la presenza di piante spontanee in grado di ospitare il vettore e fungere da serbatoio per il fitoplasma;
- 3) non sfalciare o trattare con erbicidi la vegetazione spontanea di capezzagne e fossi durante il periodo estivo per evitare che gli adulti del vettore si spostino sulla vite;
- 4) effettuare l'inerbimento artificiale che consente la semina mirata di una o più essenze, che scelte opportunamente non favoriscono la presenza nel vigneto di piante erbacee possibili ospiti di fitoplasmi e di cicaline polifaghe potenziali vettori;
- 5) il controllo della flora spontanea dei vigneti abbandonati, che possono contenere viti e piante di altre specie infette e quindi fungere da sorgenti di infezione per i vettori;
- 6) la scelta varietale, ovvero per quanto possibile e in funzione dell'ambiente di coltivazione prediligere nell'impianto di un nuovo vigneto vitigni meno sensibili all'infezione;
- 7) le barbatelle dovranno essere state controllate dal punto di vista sanitario ed essere esenti da infezioni;
- 8) la limitazione delle concimazioni azotate in vigneto, poiché si è constatato che l'eccessivo rigoglio vegetativo predispone le piante alle infezioni da LN e da altre fitoplasmosi, verosimilmente perché le rende più attrattive per gli insetti vettori, in particolare per quelli occasionali;

- 9) la capitozzatura delle viti malate: in questo caso è preferibile ricorrere ad una capitozzatura bassa, ovvero all'asportazione totale del tronco a circa 50 centimetri dal suolo, in quanto questa risulta essere più efficace rispetto alla capitozzatura alta nella quale andiamo ad eliminare una porzione di chioma molto inferiore (Reggiani e Credi, 2010).

A livello sperimentale, buoni risultati sono stati ottenuti anche con l'estirpazione controllata e lo strattonamento delle viti (Romanazzi e Murolo, 2008b). Il trattamento con acqua calda sembra essere una strategia efficiente per ridurre il rischio di eventuali infezioni all'interno del materiale di propagazione (Maixner, 2011).

2.4. RECOVERY E STRATEGIE DI LOTTA CONTRO LE FITOPLASMOSI DELLA VITE

A differenza di altri agenti di malattia che interessano la vite per i quali sono presenti sul mercato formulati, per le fitoplasmosi e in particolare per il Legno nero (LN) da anni si è alla ricerca di formulati naturali o di sintesi che possano amplificare il fenomeno del recovery (Romanazzi *et al.*, 2009c, 2013). Il recovery è definito come la remissione spontanea dei sintomi (Caudwell, 1991; Loi *et al.*, 2002; Osler *et al.*, 1993; Schmid, 1965), recuperando la produttività e riuscendo a produrre come le piante sane. Spesso si utilizzano i termini remissione e recovery come sinonimi. Tuttavia, è ragionevole fare una distinzione tra i due fenomeni. La remissione potrebbe essere definita come una temporanea scomparsa dei sintomi o un periodo di infezione latente, mentre la scomparsa permanente dei fitoplasmi da piante precedentemente infettate è definito come recovery vero e proprio (Maixner, 2011).

In vite, tale fenomeno è stato osservato, con incidenza diversa a seconda della varietà e dell'areale di indagine, su Chardonnay affetto da FD in Friuli-Venezia Giulia, Montepulciano e Sangiovese nelle Marche e Abruzzo, Primitivo e Cabernet franc in Puglia, Chardonnay, Moscato bianco, Vermentino e Vernaccia in Sardegna infetti da LN (Garau *et al.*, 2004, 2007b; Osler *et al.*, 1993; Romanazzi *et al.*, 2007b). In viti recovered generalmente i tentativi di individuare il fitoplasma nella chioma sono falliti (Carraro *et al.*, 2004; Morone *et al.* 2007; Musetti *et al.*, 2007). Recentemente Landi *et al.* (2019), ha dimostrato che nelle radici piante recovered è stato possibile verificare la presenza di 'Ca.P. solani', utilizzando però un protocollo di amplificazione basato su qPCR.

Il fenomeno naturale ha una frequenza casuale, ma può essere favorevolmente

influenzato dal trattamento con elicitatori che possono indurre o potenziare le difese della pianta. Numerose sostanze, naturali o di sintesi, sono note per la capacità di indurre resistenza (Romanazzi *et al.*, 2009c).

Due analoghi funzionali dell'acido salicilico, l'acido isonicotinico (INA) e il benzotiadiazolo (BTH o acibenzolar-S-methyl), sono noti induttori di resistenza sistemica acquisita (SAR) (Schreiber e Desveaux, 2008), in numerose combinazioni pianta patogeno. Inoltre, sono note applicazioni di chitosano su vite (Romanazzi *et al.*, 2002, 2006b), di Fosetyl-Al contro patogeni delle pomacee (Oostendorp *et al.*, 2001) e in pervinca infetta da fitoplasmi (Prati *et al.*, 2004) e di due diversi prodotti commerciali a base di glutatione e oligosaccarine (Kendal, Valagro Italia e Olivis, Agrisystem Italia, rispettivamente) utilizzati in viti infette da LN (Garau *et al.*, 2007a; Romanazzi *et al.*, 2010). In differenti condizioni pedoclimatiche, prove di campo effettuate nelle Marche hanno permesso di ottenere risultati promettenti soprattutto con formulati a base di glutatione e oligosaccarine in miscela e acibenzolar-S-methyl (Romanazzi *et al.*, 2009a; Romanazzi *et al.*, 2010; Romanazzi *et al.*, 2013).

Per la valutazione dell'induzione di resistenza è necessario indagare sull'effetto del trattamento con elicitatori o sull'esposizione a stress abiotici su alcuni processi fisiologici della pianta e monitorare l'espressione genica delle proteine coinvolte. Gli studi finora condotti relativi alle molecole responsabili dell'interazione della pianta con il fitoplasma, analogamente a quanto già ampiamente dimostrato per altri agenti fitopatogeni, in particolare funghi e batteri, evidenziano un coinvolgimento delle proteine PR (Junqueira *et al.*, 2004), di composti fenolici (Zhong e Shen, 2004) e di alcuni perossidi (Musetti *et al.*, 2004, 2005, 2007) che generalmente incrementano la loro produzione in piante infette. Altre molecole sono risultate coinvolte nei meccanismi di difesa, come proteine normalmente prodotte in risposta a stress da metalli pesanti (Carginale *et al.*, 2004; Hall *et al.*, 2002). In recenti ricerche effettuate presso l'Università Politecnica delle Marche è stato possibile verificare come una serie di geni di difesa attivi in piante sintomatiche (β -1,3-glucanasi, chitinasi classe III, fenilalanina ammonioliase e flavone 3-idrossilasi) e recovered (chitinasi classe III, fenilalanina ammonioliase, calcione sintasi) possano modificare la loro espressione in relazione alle cultivar di vite, alla suscettibilità delle cultivar rispetto al Legno nero e allo stadio fenologico (Landi e Romanazzi, 2011).

3. OBIETTIVI DELLA RICERCA

La vite nella regione Marche è una cultura particolarmente importante per l'economia della regione stessa. Un fattore limitante nella produzione di uve di elevata qualità è rappresentato dalle fitoplasmosi, in particolare per le varietà altamente suscettibili (Endeshaw *et al.*, 2012; Ember *et al.*, 2018). Il LN della vite, pur non essendo annoverata tra le malattie da quarantena, come la Flavescenza dorata, può pregiudicare la produzione sia a livello quantitativo, qualitativo e anche ridurre la carriera produttiva di un vigneto commerciale. Considerando che non esistono al momento strategie dirette, ufficialmente riconosciute per il controllo delle fitoplasmosi, sulla base di sperimentazioni pregresse e dei risultati promettenti (Romanazzi *et al.*, 2009b; Romanazzi *et al.*, 2013) sono stati selezionati una serie di formulati da applicare sia in fase preventiva che curativa su piante cv. Chardonnay per il controllo del LN della vite.

La prova sperimentale è stata strutturata nelle seguenti fasi:

- scelta del campo oggetto della sperimentazione e adozione di uno schema sperimentale basato sul criterio dei blocchi randomizzati;
- applicazione dei formulati sia in fase preventiva che curativa;
- rilievi sulla vegetazione per verificare presenza e gravità del LN;
- rilievo sulla vegetazione per verificare l'eventuale azione collaterale nel controllo di infezioni di *Plasmopara viticola*;
- elaborazione dei dati raccolti attraverso l'applicazione di modelli statistici;
- raccolta di campioni vegetali, estrazione del DNA e analisi biomolecolari per la diagnosi di '*Candidatus Phytoplasma solani*', agente del LN della vite.

4. MATERIALI E METODI

4.1. CARATTERISTICHE DEL VIGNETO OGGETTO DI STUDIO

Le prove sono state condotte presso un vigneto dell'azienda vitivinicola Moncaro Terre Cortesi, ubicato a Castelplanio (AN). Il vigneto ha una superficie di circa 1,45 ha ed è coltivato con cv. Chardonnay ed è posto a circa 217 m s.l.m. Il sistema di allevamento è il Guyot bilaterale con un sesto di impianto di $1 \times 2,6$ m, l'interfilare è inerbito. Il vigneto non è irriguo e le fertilizzazioni sono frazionate, la prima effettuata dopo la vendemmia e le successive in primavera ed estate (Fig. 6).



Fig. 6 A - Vigneto sperimentale dell'Azienda Moncaro Terre Cortesi a Castelplanio (AN) (Google Earth); **B** - Vigneto commerciale in fase vegetativa.

4.2. SCHEMA SPERIMENTALE

La sperimentazione ha previsto una “prova preventiva” ed una “curativa”. In quella preventiva sono state previste cinque tesi (acqua, Kendal, F1 dose1, F1 dose2 e controllo non trattato). Ogni tesi della prova preventiva comprendeva 30 piante e 7 repliche (210 piante per tesi) (Fig. 7).

Per la prova curativa sono state invece individuate 35 piante sintomatiche, in base al rilievo dell’anno precedente, per ciascuna delle 4 tesi previste (acqua, Kendal, F1 dose 1, F1 dose 2) (Fig. 7). Ogni colore riportato nella mappa corrisponde ad un diverso trattamento.

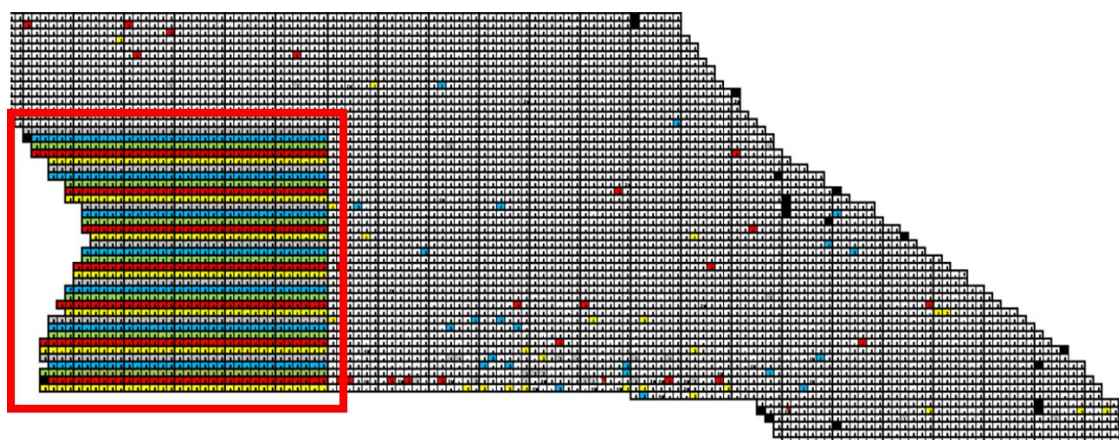


Fig. 7 – Mappa del vigneto in cui è avvenuta la sperimentazione. Nel riquadro rosso è evidenziata la porzione di vigneto investita dalla prova preventiva; nella restante parte del vigneto sono state individuate le piante sintomatiche utilizzate nella prova curativa. I diversi colori sono riferiti ai diversi trattamenti applicati. ■ = Kendal, ■ = F1 dose 1, ■ = F1 dose 2, ■ = acqua, ■ = controllo non trattato.

L’applicazione dei formulati è stata eseguita ogni due settimane, da metà aprile a metà settembre 2018 (18 aprile, 10 maggio, 21 maggio, 07 giugno, 18 giugno, 2 luglio, 16 luglio, 31 luglio e 19 settembre). I trattamenti sono stati distribuiti irrorando le viti con un volume equivalente a 1.000 litri/ha. I trattamenti sono stati eseguiti con una irroratrice a spalla modello Honda GX 25, 25cc, con motore a 4 tempi e potenza di kW 0,81 (CV1,1). La pressione massima è di 25 bar (2,5 Mpa) e la sua regolazione avviene tramite comando manuale a manopola con 5 posizioni impostate da 5 a 25 bar. La portata massima è di 7,1

l/minuto, la lancia è provvista di 2 spruzzatori e valvola di erogazione con sfera a comando a leva.

Le principali malattie fungine (peronospora, oidio, muffa grigia) sono state controllate dall'azienda concordando un calendario di interventi in modo che non ci fossero sovrapposizioni e comunque rispettando un periodo sicurezza di almeno tre giorni.

4.3. DATI CLIMATICI

Sono stati registrati i dati climatici, relativi a precipitazioni (mm), umidità relativa (%) e temperatura (°C) media, massima e minima, mediante la stazione meteo del Servizio Agrometeorologico ASSAM, situata a Castelplanio (AN).

4.4. RILIEVO DEI SINTOMI ASCRIVIBILI A LEGNO NERO

Nel campo sperimentale oggetto della prova, sono stati effettuati tre rilievi (13 giugno, 16 luglio e 28 settembre 2018) per registrare i sintomi di legno nero della vite, andando ad annotare su mappa bidimensionale la presenza/assenza del sintomo per ciascuna delle piante oggetto della prova preventiva e curativa. Nel rilievo è stata registrata non solo la presenza/assenza dei sintomi, ma è stato anche attribuito un valore da 1 a 4 secondo una scala empirica che descrive l'entità dei sintomi riscontrati sulla pianta (Murolo et al., 2014).

I dati raccolti sono stati sottoposti ad elaborazione statistica e sono state calcolate le medie e la deviazione standard per ciascuna delle tesi prese in esame. Infine, è stata condotta l'analisi della varianza (ANOVA) e le medie sono state separate con il test di Tukey, secondo il livello di probabilità $P < 0,05$

4.5. VALUTAZIONE DELLE INFEZIONI DI PERONOSPORA SULLE FOGLIE

E' stata valutata l'attività collaterale dei formulati anche per la prevenzione di infezioni di *Plasmopara viticola*, agente della peronospora della vite. La valutazione delle infezioni della peronospora della vite è stata effettuata su tutte le viti di ogni trattamento della prova preventiva, andando a considerare 100 foglie selezionate casualmente per pianta. Il primo rilievo è stato effettuato intorno al 13 giugno, periodo in cui sono iniziate a comparire le prime "macchie d'olio", mentre il secondo è stato condotto il 18 luglio. I

dati raccolti sono serviti per calcolare gli indici patometrici: gravità, incidenza e indice di McKinney. Per stimare la gravità della malattia sulle foglie, è stata applicata una scala empirica composta da 11 livelli di malattia: da 0 (foglia non infetta) a 10 (oltre il 90% della superficie foglia interessata dai sintomi) (Romanazzi *et al.*, 2016). L'incidenza della malattia è stata espressa come percentuale di foglie infette. L'indice di infezione (o indice di McKinney), che incorpora sia l'incidenza che la gravità della malattia, è stato espresso come media ponderata della malattia rispetto alla classe più alta.

I dati sono stati sottoposti all'analisi della varianza e le medie sono state separate mediante ANOVA e test di Tukey ($P < 0.05$) (Statsoft, Tulsa, OK).

4.6. RACCOLTA DEI CAMPIONI VEGETALI E ANALISI BIOMOLECOLARI

La raccolta dei campioni è stata effettuata il 28 settembre 2018 in concomitanza dell'ultimo rilievo. Durante il campionamento, sono stati raccolti casualmente 70 campioni, dai diversi trattamenti, 40 da piante sintomatiche e 39 da piante recovered. I campioni prelevati sono stati sottoposti ad analisi biomolecolare per rilevare la presenza di 'Ca. P. solani', agente di LN.

Ogni campione era costituito da 5 foglie. Per evitare la contaminazione, le foglie sono state raccolte con guanti. I campioni raccolti sono stati conservati in sacchetti di plastica sterile e conservati in una borsa termica fino a quando sono arrivati in laboratorio per ulteriori analisi.

4.7. ANALISI MOLECOLARE PER IL RILEVAMENTO 'CANDIDATUS PHYTOPLASMA SOLANI'

I campioni giunti in laboratorio sono stati sottoposti a un lavaggio in una soluzione di acqua distillata e Tween alla concentrazione dello 0,1% per 1 min e 30 s e successivamente sono state lavate con acqua corrente. Poi sono stati asportati i piccioli da cui sono stati prelevati circa 0,5 g. Questi sono stati macerati in un mortaio in 5 ml di tampone di estrazione a base di CTAB 3% (100 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, 100 mM EDTA) in presenza di un antiossidante ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), seguendo il protocollo modificato da Murolo *et al.* (2014) per campioni di vite (Fig. 8).

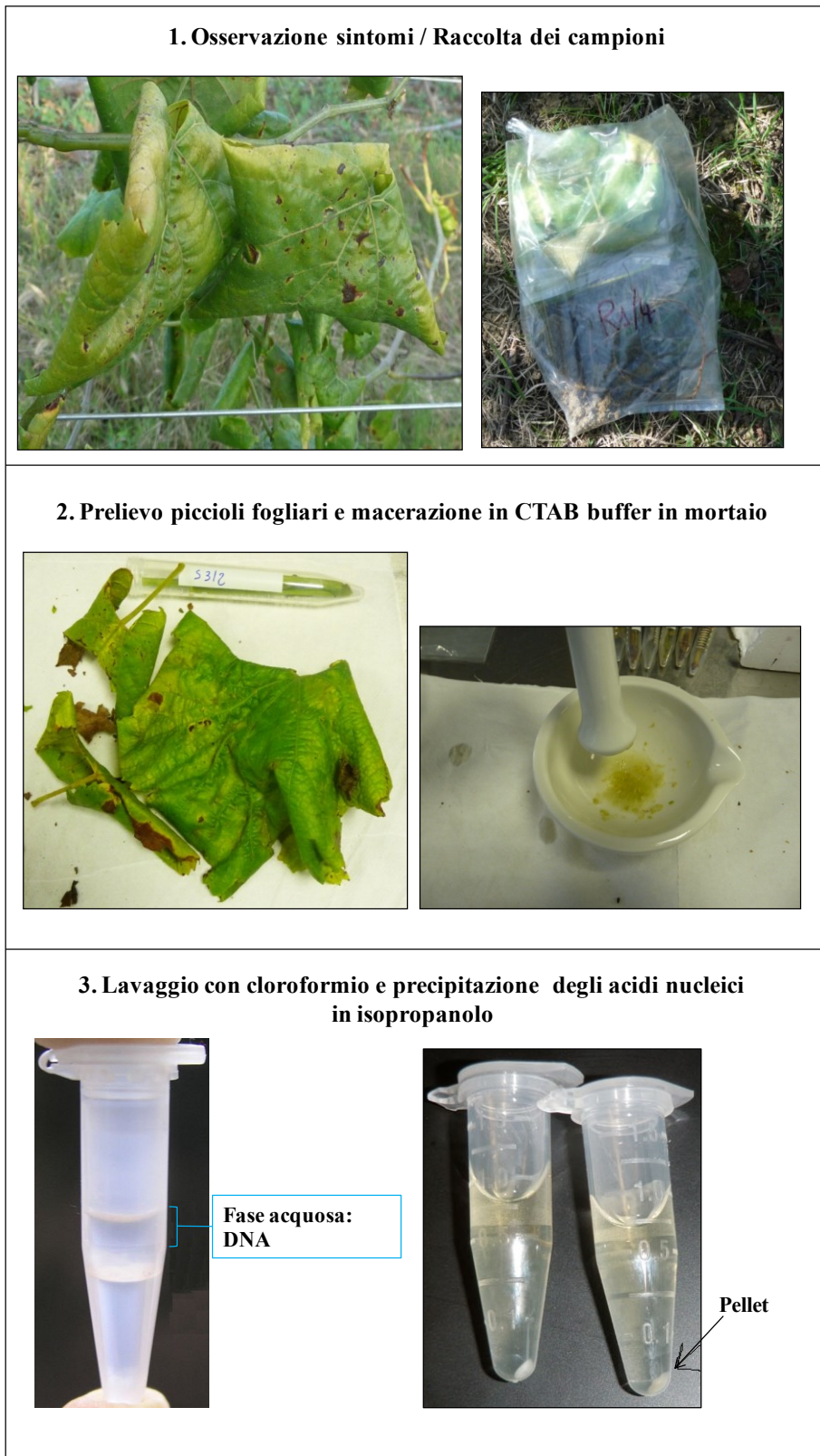


Fig. 8 – Sintesi del procedimento adottato per l'estrazione del DNA totale da foglie di vite.

Le provette, contenenti il succo grezzo, sono state poste ad incubare a 65°C per circa 20-30 min, successivamente è stata effettuata una centrifugazione a bassa velocità (5000 rpm) per favorire la sedimentazione delle parti più grossolane e sono stati prelevati 700-800 µl del sovrinatante, a cui è stato aggiunto un ugual volume di cloroformio. Le provette ripetutamente ed energicamente agitate su vortex, sono state centrifugate a 10000 rpm per 8 min, successivamente è stato recuperato il sovrinatante (circa 600 µl) a cui è stato aggiunto un ugual volume di isopropanolo. Le provette, dopo essere state agitate delicatamente, sono state lasciate a 4°C per 10 min e successivamente centrifugate a 12000 rpm per 15 min. Infine, dalle provette è stata allontanata la fase liquida ed è stato fatto asciugare il pellet, che è stato risospeso in 60 µl di acqua sterile. I campioni sono stati conservati a -20°C in attesa di essere analizzati in PCR.

Il DNA totale estratto, è stato sottoposto ad amplificazione generica utilizzando una prima coppia di primer universali per i fitoplasmi (P1/P7). A questa prima reazione di amplificazione effettuata con i primer universali, è seguita una seconda PCR (nested-PCR) che ha utilizzato come templatò l'amplificato ottenuto nella prima PCR (diluito 1:30) e la coppia di primer fStol/rStol (Maixner *et al.*, 1995; Tab. 3) specifici per fitoplasmi appartenenti al gruppo 16Sr XII. Il programma di amplificazione impostato prevedeva: 5 min di denaturazione a 95°C; 35 cicli di 1 min a 95°C, 1min a 58°C e 1 minuto a 72°C; più un ciclo finale di 7 min a 72°C.

Tab. 3 - Sequenze di primer specifici per fitoplasmi appartenenti al gruppo 16SrXII.

Primers	Sequenze del primer (5' 3')	Frammenti (bp)
rStol	AGA TGT GAC CTA TTT TGG TGG	500
fStol	GCC ATC ATT AAG TTG GGG A	500

Aliquote (10 µl) del prodotto di amplificazione sono state caricate su gel all'1,5% di agarosio (Molecular Biology Certified Agarose, Bio-Rad Laboratories) e fatte correre in tampone TAE (45 mM di Tris-borato; 1 mM EDTA, pH 8,0) a 110 Volts per 10 min in camera elettroforetica per gel orizzontale sommerso (Bio-Rad Laboratories). Per la stima delle dimensioni dei prodotti di amplificazione è stato utilizzato come standard il 100 pb DNA Ladder (New England Bio-Labs, Beverly, USA) che origina 12 bande di dimensioni

da 100 a 1500 pb. I gel, precolorati con GelRed 10,000× (Biotium), sono stati visualizzati e acquisiti mediante Gel Doc 1000 (Bio-Rad Laboratories).

5. RISULTATI

L'andamento climatico della stagione vegetativa 2018, relativo a Castelplanio (AN), zona in cui è avvenuta la sperimentazione ed era posizionata la stazione meteo dell'ASSAM, è rappresentato nel grafico sottostante (Fig. 9). In particolare, sono stati estrapolati i dati relativi al periodo che va da inizio maggio a inizio ottobre. Come si evince dal grafico, nel periodo compreso tra la prima decade di maggio e la prima di giugno, la zona interessata è stata soggetta ad un periodo quasi continuo di piogge, con valori di umidità relativa abbastanza alti e una temperatura media che in questo lasso di tempo è variata da 16 °C a 22°C.

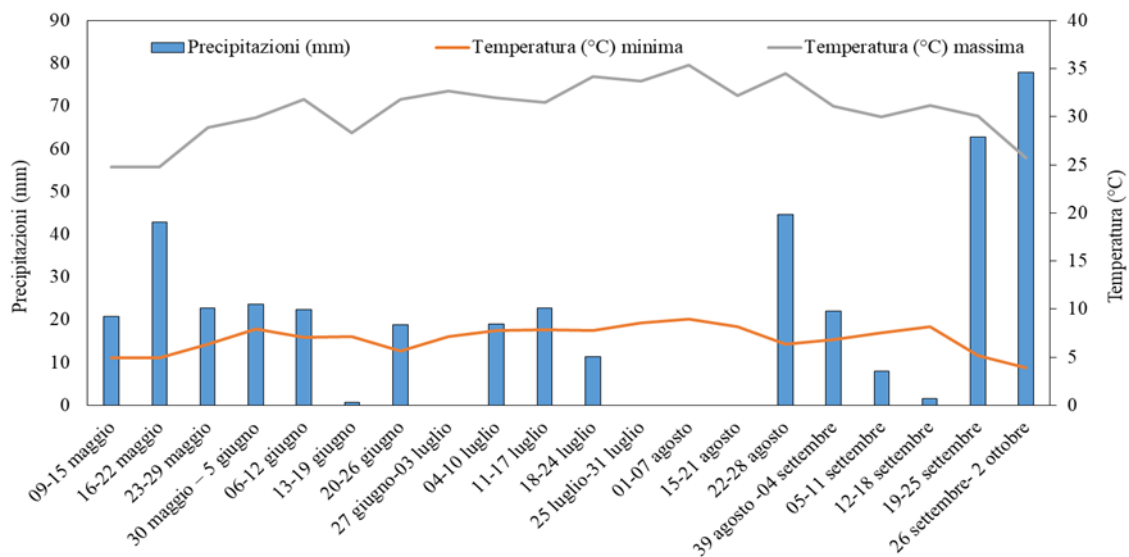


Fig. 9 – Andamento climatico registrato presso Castelplanio (AN) durante il periodo primaverile-estivo del 2018 (dati Servizio AgroMeteo, ASSAM, 2019).

Il periodo estivo è stato caratterizzato da alcuni fenomeni piovosi, distribuiti in modo irregolare che possono essere considerati nella norma per il territorio. Durante il periodo estivo le temperature medie non sono salite sopra i 30 °C.

Il periodo di fine agosto e inizio settembre, corrispondente al periodo della vendemmia, è stato caratterizzato da eventi piovosi di forte intensità, collegati ad un parziale abbassamento delle temperature, la cui media si è attestata attorno ai 20 °C.

L'ultima decade di settembre e la prima di ottobre sono state caratterizzate da piogge di forte intensità, accompagnate da un ulteriore abbassamento delle temperature. Possiamo però dire che in linea generale, le condizioni metereologiche non si sono discostate dalle condizioni medie dalla zona presa in considerazione.

5.1. VALUTAZIONE DEI SINTOMI ASCRIVIBILI A LEGNO NERO

Sono stati effettuati tre rilievi sull'intero vigneto, in particolare durante il primo rilievo (13/06/18) sono state individuate 64 piante su 5207 che mostravano sintomi ascrivibili a LN, con un'incidenza del 1,2% (Fig. 10A, B).

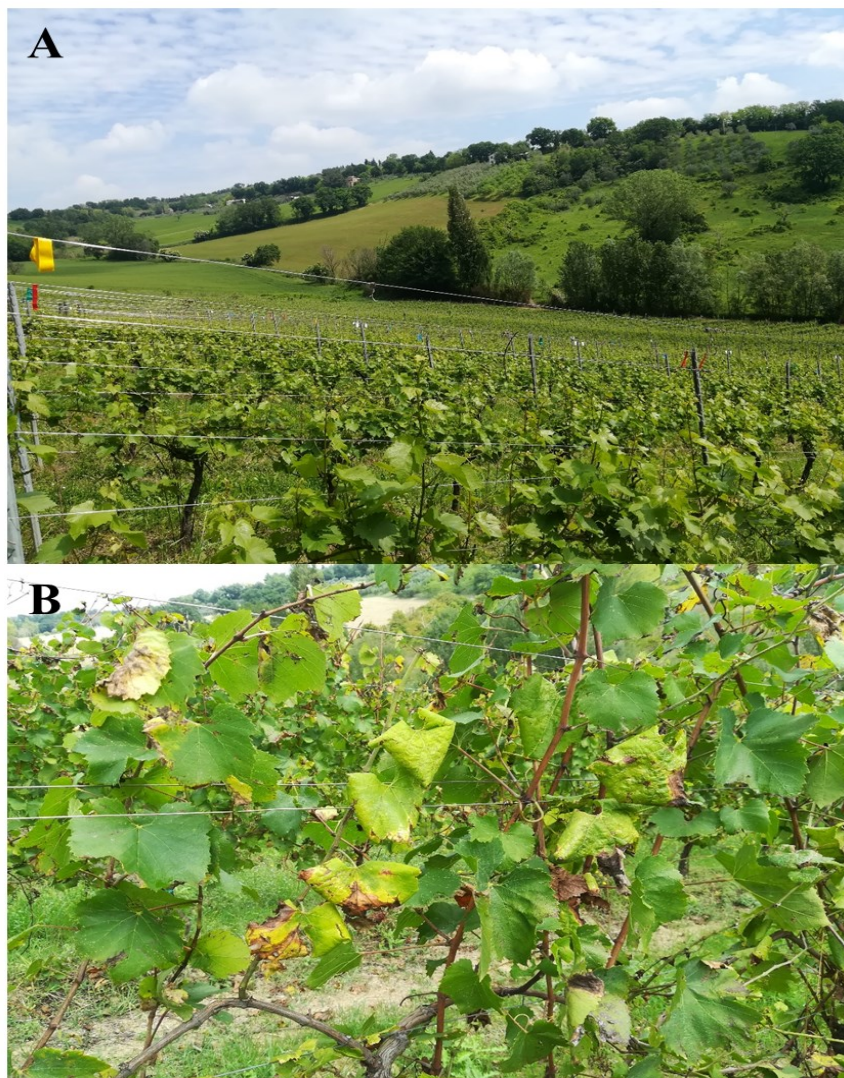


Fig. 10 – Vigneto di cv. Chardonnay (Castelplanio, AN) in cui è stata effettuata la sperimentazione (A); Sintomi di legno nero (LN) a carico delle foglie che assumono alterazioni cromatiche e morfologiche (epinastia) (B).

Le piante sintomatiche hanno mostrato inizialmente solo qualche foglia sintomatica per tralcio e quindi una bassa gravità della malattia. Le foglie sintomatiche avevano una colorazione verde pallido e iniziavano a presentarsi con il margine ripiegato verso il basso. La maggior parte delle piante rilevate appartenevano alla classe 1 (67 %) e alla classe 2 (33 %) (Fig. 10B).

Durante il secondo rilievo (16/07/2019), sono state registrate 279 piante con sintomi tipici di LN con un tasso di infezione del 5,3%. Le piante erano caratterizzate da un ingiallimento più evidente delle foglie che assumevano la conformazione accartocciata in modo più pronunciato. In alcuni casi erano evidenti anche sui frutti alterazioni come disidratazione dei grappoli. La maggior parte delle piante sintomatiche apparteneva alla classe 2 (43%), seguite dalla classe 3 (25%) e classe 1 (24%) e infine una modesta percentuale rientrava nella classe 4 (9%).

Un ultimo rilievo è stato effettuato il 28 settembre, durante il quale 373 piante sono state identificate con sintomi di LN, con un tasso di infezione del 7% (Fig. 11).



Fig. 11 – Principali sintomi riscontrati su foglie e grappoli nel rilievo del 28/09/2018.

A settembre i sintomi risultavano essere molto chiari, con le foglie che presentavano accartocciamento marcato dei lembi, ingiallimenti e necrosi dei tessuti (Fig. 11 A, B). In alcuni casi sono stati individuati i soli piccioli attaccati ai tralci e il lembo fogliare si era staccato preventivamente; inoltre sono stati notati tralci non lignificati e pustole necrotiche. La maggior parte delle piante sintomatiche appartiene alla classe 2 (44%) e classe 3 (25%), seguita da quelle di classe 1 (17%) e dalla classe 4 (14%) (Fig. 11). Anche sui grappoli sono stati notati fenomeni di disidratazione e in alcuni casi anche di disseccamento (Fig. 11 C). Di seguito si riportano i risultati relativi alle prove preventiva e curativa.

5.1.1. Prova preventiva

La prova preventiva prevedeva 210 piante per ciascuna delle tesi trattate. L'efficacia dei trattamenti è stata valutata andando a conteggiare le piante che hanno mostrato i sintomi per la prima volta nel 2018 (Tab. 4).

Tab. 4 - Risultati della prova preventiva, effettuata su 210 piante, andando ad applicare diversi formulati (Kendal, F1 dose1 e F1 dose2) e a rilevare la presenza di sintomi ascrivibili a legno nero (LN) in tre momenti della stagione vegetativa.

Formulati	Nuove piante sintomatiche (n.)		
	nei rilievi		
	13/06/2018	16/07/2018	28/09/2018
Kendal	3	6	10
F1 (dose 1)	4	9	8
F1 (dose 2)	0	3	3
Acqua	4	7	9
Non trattato	2	5	6
Totale	13	20	36

Durante il rilievo del 13 giugno 2018, è stata riscontrata la presenza di 13 piante sintomatiche, di cui 3 nella tesi trattata con Kendal, 4 viti trattate con F1 (dose 1), 4 piante trattate con acqua, 2 piante nel non trattato e nessuna in quello trattato con F1 (dose 2).

Nel rilievo di luglio, sono state registrate 6 nuove piante sintomatiche (rispetto alla valutazione del 2017) trattate con il Kendal, 9 viti trattate con F1 (dose 1), 3 piante trattate con F1 (dose 2), 7 trattate con acqua e 5 piante per la tesi controllo non trattato.

Infine, nel rilievo di settembre 2018, quando generalmente il quadro sintomatologico è più stabile e definitivo, è stato possibile verificare che il formulato che ha avuto le migliori performance nella prova preventiva è stata F1 (dose 2) con la comparsa di sole 3 piante sintomatiche, le altre tesi (Kendal e F1 dose1) non si sono discostate dalla tesi trattata con acqua e dal testimone non trattato (Tab. 4).

5.1.2. Prova curativa

Nella prova “curativa”, i formulati sono stati applicati a cadenza quindicinale, su piante individuate e selezionate in base all’espressione dei sintomi nel rilievo effettuato a settembre 2017.

Tab. 5 – Risultati prova curativa.

Formulati applicati	Piante sintomatiche (n.) nel 2017	Piante sintomatiche (n.) registrate nel 2018		
		13/06/2018	16/07/2018	28/09/2018
Kendal	37	4	20	27
F1 (dose 1)	36	3	14	19
F1 (dose 2)	35	6	20	25
Acqua	36	0	18	20
Totale	144	13	72	91

Anche per questa prova è stata registrata una progressivo aumento del numero delle piante con il decorrere della stagione, partendo da 13 piante riscontrate nel rilievo di giugno 2018 fino a 91 piante sintomatiche nel rilievo di settembre 2018, rispetto a 144 piante che erano state registrate nel settembre del 2017 che è stato preso come anno di riferimento (Tab. 5). In particolare, le piante trattate con il Kendal che hanno confermato i sintomi nel settembre 2018 sono state circa il 73% (27/37), il 52,7% (19/36) trattate con

F1 (dose 1), 71,4% (25/35) trattate con F1 (dose 2) e 55,5% (20/36) le piante trattate con acqua (Tab. 5). La percentuale di piante recovered, piante sintomatiche nel settembre 2017 e che hanno perso i sintomi nel 2018, oscilla tra il 47% per la tesi trattata con il formulato F1 (dose1) e il 27% per le piante trattate con il Kendal (Tab. 5).

Bisogna comunque sottolineare che anche il trattamento con acqua ha fatto registrare percentuali di recovery naturale pari al 44%. L'unico formulato che ha incrementato il tasso di piante recovered rispetto al testimone trattato con acqua è stato il formulato F1 (dose 1) (+3%). Anche per quanto riguarda l'indice di gravità non sono state evidenziate differenze tra le diverse tesi, passando da 2,2 per il testimone trattato con acqua, a 2,55 per il Kendal.

5.2. RISULTATI VALUTAZIONE DELLE INFEZIONI DI PERONOSPORA SULLE FOGLIE

È stata anche valutata l'azione collaterale dei formulati (Kendal, F1 dose1 e F1 dose 2), nel controllo di infezioni di peronospora della vite. A tal riguardo sono stati effettuati due rilievi (13/06, 18/07) per accertare e quantificare mediante indici patometrici la diversa incidenza e gravità della malattia. Le prime macchie d'olio sono state registrate già nel primo rilievo effettuato il 13 giugno 2018, anche se sporadicamente (Fig. 12).



Fig. 12 – Foglie di vite cv. Chardonnay che mostravano sintomi di peronospora, determinati da *Plasmoprara viticola* nel rilievo del 13 giugno 2018.

Nel rilievo del 13 giugno, l'incidenza della malattia è stata molto bassa tra tutti i trattamenti, con valori medi < 0,2%. Non sono state registrate differenze significative tra le tesi, considerando tutti gli indici patometrici (Tab. 6).

Tab. 6 – Quantificazione di peronospora su foglie di vite mediante gli indici patometrici in base ai dati raccolti durante il rilievo del 13 giugno 2018.

Tesi	Gravità (1-10)	Incidenza (%)	Indice di McKinney (%)
Kendal	1.00 ± 0.00	0.04 ± 0.16	0.00 ± 0.02
F1 dose 1	1.25 ± 0.38	0.07 ± 0.24	0.01 ± 0.04
F1 dose 2	1.34 ± 0.34	0.16 ± 0.36	0.03 ± 0.06
Acqua	1.31 ± 0.49	0.10 ± 0.37	0.01 ± 0.06
Testimone non trattato	1.21 ± 0.27	0.06 ± 0.14	0.01 ± 0.02

Nel secondo rilievo sulla peronospora effettuato il 18 luglio, si è registrata una pressione più elevata della malattia che è arrivata a valori medi di incidenza fino al 13% (Tab. 7; Fig. 13 – Fig. 14)



Fig. 13 – Danni da peronospora su grappoli.



Fig. 14 – Foglie di vite cv. Chardonnay che mostravano sintomi di peronospora, determinati da *Plasmopara viticola* nel rilievo del 18 luglio 2018.

Considerando la gravità della malattia e l'indice McKinney, non sono state registrate differenze significative tra le tesi (Tab. 7). Nelle tesi trattate con Kendal, l'incidenza della malattia è stata significativamente ridotta rispetto al controllo non trattato e alle piante trattate solo con acqua (Tab. 7).

Tab. 7 – Quantificazione delle infezioni di peronospora su foglie di vite mediante gli indici patometrici in base ai dati raccolti durante il rilievo del 13 giugno 2018.

Tesi	Gravità (1-10)	Incidenza (%)	Indice McKinney (%)
Kendal	3.04 ± 8.66	9.18 ± 28.19 b	4.95 ± 2.93
F1 dose 1	2.98 ± 11.07	11.49 ± 36.20 a	4.81 ± 2.88
F1 dose 2	3.31 ± 12.42	12.76 ± 45.07 a	5.09 ± 3.26
Acqua	3.21 ± 11.05	11.40 ± 38.34 a	4.54 ± 3.13
Controllo non trattato	3.16 ± 12.31	12.30 ± 43.33 a	5.25 ± 3.14

5.3. DIAGNOSI MOLECOLARE DI “*CANDIDATUS PHYTOPLASMA SOLANI*”

Dai campioni fogliari raccolti da viti sintomatiche e viti recovered il 28 settembre 2018, è stato estratto il DNA totale che è stato sottoposto amplificazione genica utilizzando i primer specifici per la diagnosi di ‘*Ca. P. solani*’.

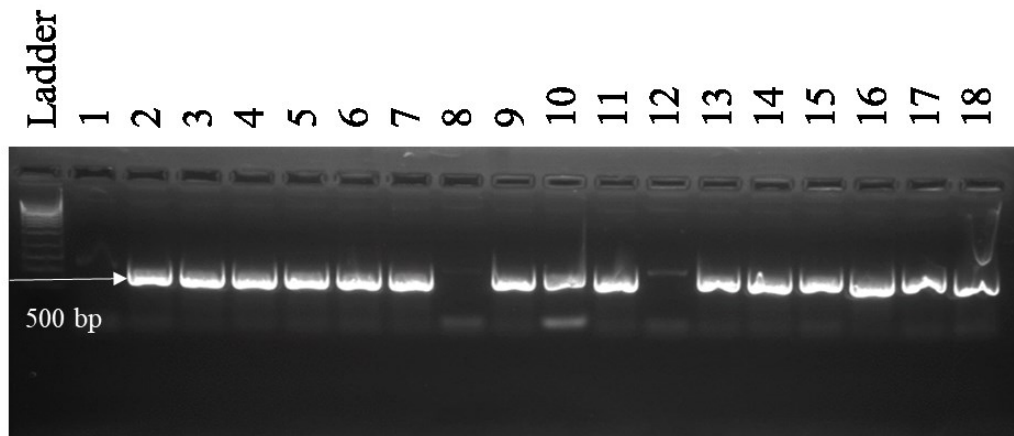


Fig. 15 – Gel di agarosio all’1,5% dei campioni sintomatici, amplificati con i primer fStol/fStol specifici per ‘*Ca. P. solani*’, agente del Legno nero della vite.

Dall’analisi molecolare delle viti sintomatiche, 39 campioni su 40 sono stati amplificati con i primer fStol/rStol e hanno prodotto una banda specifica di circa 500 bp (Tab. 8 e Fig. 15). Un solo campione raccolto tra i campioni sintomatici, trattati con Kendal non ha dato alcuna amplificazione.

Tab. 8 – Campioni positivi a ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’, amplificati con i primer fStol/rStol

Trattamento	Campioni positivi a ‘ <i>Candidatus Phytoplasma solani</i> ’ (28/09)		
	Nuove piante sintomatiche (n.)	Piante recovered (n.)	Piante totali (n.)
Kendal	9/10	0/8	9/18
F1 (dose 1)	10/10	0/9	10/19
F1 (dose 2)	10/10	1/8	11/18
Acqua	7/7	0/13	7/20
Controllo non trattato	2/3	0/1	2/4

Sono stati analizzati anche 39 campioni fogliari raccolti da piante recovered. In nessuna delle piante analizzate è stato possibile amplificare il DNA di ‘*Ca. P. solani*’ ad eccezione di un campione trattato con il formulato F1 dose 2 (Tab. 8; Fig. 16).

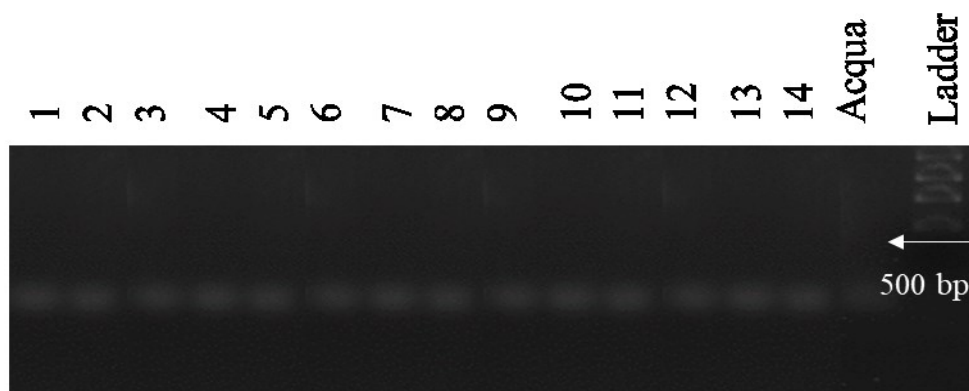


Fig. 16 – Gel di agarosio all’1,5% con i campioni recovered, analizzati con i primer fStol/fStol specifici per ‘*Ca. P. solani*’, agente del Legno nero della vite.

6. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il LN è un'ampelopatia chiave della vite che può influenzare gli scenari economici della viticoltura italiana ed europea, in quanto può causare seri danni sia a livello quantitativo che qualitativo soprattutto su varietà suscettibili quali Chardonnay (Borgo e Angelini, 2002; Martelli e Boudon Padieu, 2006; Maixner, 2011; Murolo *et al.*, 2014; Ember *et al.*, 2018). I sintomi macroscopici sono spesso espressione di danni a carico dei processi fisiologici e biochimici (Bertamini e Nedumchezhian, 2001; Endeshaw *et al.*, 2012). I fitoplasmi, infatti, come anche la maggior parte dei virus della vite, si localizzano nei fasci floematici e vanno ad interferire sull'efficienza fotosintetica, fortemente influenzata da stress biotici e abiotici (Balachandran *et al.*, 1994). Studi di fisiopatologia in viti di Chardonnay e Sangiovese infette da LN hanno messo in evidenza una riduzione della fotosintesi netta pari al 60-80% (Murolo *et al.*, 2009; Endeshaw *et al.*, 2012). Tale declino può essere imputato all'accumulo nelle foglie di carboidrati che possono inibire l'attività di enzimi coinvolti nel ciclo di Calvin (Bertamini *et al.*, 2002), ed in particolare ad una significativa riduzione trascrizionale di geni codificanti per Rubisco (Hren *et al.*, 2009). Inoltre, è stata registrata una diminuzione significativa dell'efficienza massima del fotosistema II, che in genere è determinata, a livello molecolare, da una repressione di diversi geni coinvolti nel PSII (Albertazzi *et al.*, 2009; Hren *et al.*, 2009). Il generale turbamento dei principali processi metabolici indotti da infezioni di LN su Chardonnay, varietà altamente suscettibile, può determinare una riduzione della produzione anche di circa il 70%, come anche dimostrato in prove sperimentali condotte con un numero più elevato di piante nel nord Italia e in Sardegna (Mutton *et al.*, 2004; Garau *et al.*, 2007a, 2007b). Oltre ai parametri quantitativi, i fitoplasmi possono interferire pesantemente anche sui parametri qualitativi, in quanto alterano il metabolismo degli zuccheri, riducendo il contenuto di solidi solubili e conseguentemente i gradi Brix.

Andando a valutare l'epidemiologia del LN in campo è stato possibile verificare la comparsa delle prime piante sintomatiche già a metà giugno 2018. Tale dato non può essere considerato definitivo, in quanto il rilievo di fine settembre è risultato essere quello più attendibile sia riguardo alla miglior individuazione delle piante sintomatiche e sia riguardo alla gravità dei sintomi riscontrata sulle stesse. Si assiste ad aumento esponenziale del numero di piante sintomatiche, partendo da metà giugno (64), fino a

settembre (373). A metà settembre i sintomi di LN sono molto evidenti (Murolo *et al.*, 2014), e la concentrazione dei fitoplasmi nelle piante sintomatiche è tale da poter essere facilmente rilevata mediante tecniche molecolari sia convenzionali che più sensibili (Prezelj *et al.*, 2013; Zahavi *et al.*, 2013).

Al momento nessun trattamento fitosanitario è capace di arginare la problematica delle fitoplasmosi. L'uso di antibiotici per il contenimento delle fitoplasmosi teoricamente potrebbe contribuire ad attenuare il problema, ma il loro uso negli stati dell'Unione Europea è proibito (Romanazzi *et al.*, 2009c). Inoltre, l'impossibilità di coltivare i fitoplasmi *in vitro* ha ulteriormente reso difficoltoso la ricerca di principi attivi efficaci. Considerando tali aspetti, una delle poche opportunità, potrebbe essere quella di promuovere le resistenze endogene della pianta. Questa strategia è stata applicata con successo a piante di pervinca infette da diversi fitoplasmi. Queste piante, trattate con acido indol-3-acetico (IAA) ed acido indol-3-butirrico (IBA) (Curković Perica, 2008) hanno presentato la remissione dei sintomi di malattia. Sulla base di questi dati incoraggianti, diverse prove sono state eseguite in vigneti, andando a valutare l'efficacia di induttori di resistenza nel controllo di questa malattia. In Emilia-Romagna, Mazio *et al.* (2008), hanno utilizzato diversi fertilizzanti organici, a base di azoto, acidi umici e acidi fulvici ed estratti di alga distribuiti rispettivamente sul suolo e sulla vegetazione in quattro diversi periodi della stagione vegetativa su piante di Lambrusco, Salamino e Ancellotta che mostravano sintomi di giallume. La percentuale di piante recovered è risultata influenzata da condizioni meteorologiche e dalla cultivar, mentre non sono state riscontrate differenze tra piante trattate con diversi induttori ed il controllo. In Sardegna, l'applicazione del Kendal su piante di Chardonnay e Vermentino affette da LN non ha consentito di registrare alcun effetto significativo sui parametri sia qualitativi che quantitativi delle piante sintomatiche analizzate, e soprattutto, lavorando su numeri di piante limitati, non ha determinato nessuna differenza sulla percentuale di piante recovered rispetto al controllo (Garau *et al.*, 2008). I risultati di una prova quadriennale svolta in vigneti di Chardonnay, siti nelle Marche ed in Abruzzo, ha permesso di evidenziare buone performance dei formulati commerciali Kendal, Bion ed Olivis, nel contenimento del LN (Romanazzi *et al.*, 2009b; Romanazzi *et al.*, 2013).

Kendal è composto da una miscela di glutatione ed oligosaccarine. Le funzioni proposte per il glutatione sulle piante superiori includono l'aumento dello stoccaggio e del trasporto dello zolfo ridotto (che ha un potere riducente), un ruolo protettivo nel

metabolismo cellulare e la rimozione dei radicali liberi. Lo stato di zolfo ridotto sembra essere cruciale per l'espressione di geni di difesa che codificano gli enzimi per la biosintesi di fitoalessine e lignina, nonché per la stimolazione dei geni che codificano per la biosintesi di componenti della parete cellulare (Wingate *et al.*, 1988; Gomez *et al.* 2004). Inoltre, una trascrizione massiccia di proteine per la difesa (PR1, MPK1 e TGA1) è stata osservata in piante di *Arabidopsis* trattate con Kendal (Salgado-Siclán *et al.*, 2012).

Nella presente tesi sia nella prova “preventiva” che in quella “curativa”, il Kendal applicato ogni quindici giorni non ha dato dei risultati soddisfacenti, a differenza di quanto era stato registrato in prove di campo effettuate nella stessa regione, sullo stesso vitigno ma con un calendario più intenso di applicazioni che venivano eseguite settimanalmente (Romanazzi *et al.*, 2013). Una notevole variabilità dell'efficacia dei diversi induttori, in parte giustificabile dal diverso andamento climatico registrato durante la sperimentazione, era stato già riscontrato da Mazio *et al.* (2008). In vite, il recovery naturale è stato osservato per diverse cultivar e in diversi areali (Garau *et al.*, 2004; Maixner, 2006; Osler *et al.*, 2003; Romanazzi *et al.*, 2007b). Inoltre, sembra essere influenzato oltre che dalla varietà coltivata (Bellomo *et al.*, 2007; Garau *et al.*, 2007ab; Romanazzi *et al.*, 2007b), anche dal portainnesto (Romanazzi and Murolo, 2008b) e dalle condizioni climatiche.

Le piante recovered sembrano, inoltre, ristabilire appieno la funzionalità delle foglie. Nei campioni prelevati da piante recovered non è stato possibile amplificare DNA di ‘*Ca. P. solani*’, come dimostrato da Romanazzi *et al.* (2013). Recentemente, anche in piante recovered, partendo da campioni di radici e utilizzando tecniche particolarmente sensibili, è stato possibile identificare la presenza di ‘*Ca. P. solani*’ (Landi *et al.*, 2019).

Nelle piante recovered, in particolare nelle foglie, avviene la sintesi dei carboidrati che sembrano implicati nell'attivazione dei segnali di difesa. Questo dato sembra essere confermato dalle performance di crescita in campo di piante che diventano resistenti ai nuovi attacchi quando sono recovered da fitoplasmosi (Osler *et al.*, 2000). Alcuni zuccheri quali glucosio, fruttosio e saccarosio, sono ampiamente riconosciuti come molecole segnale nelle piante, oltre ai loro ruoli come fonti di carbonio e di energia (Koch, 2004; Rolland *et al.*, 2006). Il saccarosio stimola, in maniera specifica, l'accumulo di antociani (Solfanelli *et al.*, 2006), che possono fungere da agenti antimicrobici nel sistema di difesa delle piante contro l'invasione da parte dei patogeni (Winkel-Shirley, 2001). Inoltre, gli zuccheri segnale, in particolare un elevato rapporto di saccarosio/esosi,

possono contribuire a risposte immunitarie e probabilmente operano come innesco molecolare per l'attivazione più rapida e robusta della difesa biotica o abiotica (Bolouri-Moghaddam e Van den Ende, 2012).

Nelle prove è stato possibile anche osservare che nessun formulato ha avuto un'azione collaterale nei confronti delle infezioni di peronospora sulle foglie.

Ad ogni modo, ulteriori studi di campo sono necessari per giungere alla definizione di protocolli di applicazione ed ottimizzare l'efficacia dei trattamenti andando a comprendere meglio i cambiamenti fisiologici che intervengono nella pianta a seguito della somministrazione di questi elicitori.

Attualmente la ricerca per il controllo del legno nero si sta orientando verso l'individuazione di microrganismi che sono in grado di colonizzare il floema di diverse piante, tra cui anche la vite, diventando antagonisti di patogeni come i fitoplasmi in quanto entrano in competizione per gli spazi e per i nutrienti e rilasciano sostanze in grado di stimolare lo sviluppo della pianta e le difese della stessa (Lahav *et al.*, 2016; Iasur-Kruh *et al.*, 2018).

7. BIBLIOGRAFIA

- Albanese G., Davis R.E., Granata G., Dally E.L., Santuccio T., Tessitori M., 1996. DNA-based analyses to detect and identify phytoplasmas in yellows-diseased grapevines in Sicily. *Petria* 6: 65-76.
- Albanese G., Granata G., Collodoro S., Egger E., Baioletti P., D'arcangelo M., 1997. Individuazione e caratterizzazione molecolare di fitoplasmi in piante di vite con sintomi di giallume in Umbria. *Rivista di Viticoltura e di Enologia* 4: 3-9.
- Albanese G., Pasquini G., Ferretti L., Sciarroni R., La Rosa R., Barba M., 2006. Identificazione molecolare di fitoplasmi in viti affette da giallumi in Calabria. *Informatore Fitopatologico* 56(4): 39-43.
- Albertazzi G., Milc J., Caffagni A., Francia E., Roncaglia E., Ferrari F., Tagliafico E., Stefani E., Pecchioni N., 2009. Gene expression in grapevine cultivars in response to Bois Noir phytoplasma infection. *Plant Science* 176: 792-804.
- Alma A., Conti M., 2002. Flavescenza dorata e altre fitoplasmosi della vite: il punto su vettori ed epidemiologia. *Informatore Fitopatologico* 52(10): 31-35.
- Alma A., 2008. Il Legno nero della vite: Malattia causata da un fitoplasma polifago trasmesso da una cicalina occasionale. *Vitenda* 70-71.
- Balachandran S., Osmond C.B., Daley P.F., 1994. Diagnosis of the earliest strainspecific interactions between tobacco mosaic virus and chloroplasts of tobacco leaves *in vivo* by means of chlorophyll fluorescence imaging. *Plant Physiology* 104: 1059-1065.
- Belli G., Fortusini A., Bianco P.A., Torresin G., Carraio S., Pizzoli L., 1997. Flavescenza dorata della vite in Lombardia. *L'Informatore Agrario* 19: 69-73.
- Belli G., Bianco P.A., Conti M., 2010. Grapevine yellows in Italy: past, present and future. *Journal of Plant Pathology* 92: 303-326.
- Bellomo C., Carraro L., Ermacora P., Pavan F., Osler R., Fraussin C., Governatori G., 2007. Recovery phenomena in grapevines affected by grapevine yellows in Friuli Venezia Giulia. *Bulletin of Insectology* 60: 235-236.
- Bertaccini A., Vibio M., Stefani E., 1995. Detention and molecular characterization of phytoplasmas infecting grapevine in Liguria (Italy). *Phytopatologia Mediterranea* 34: 137-141.

- Bertaccini A., Borgo M., Dal Molin F., Fontana P., Girolami V., Malagrini V., Martini M., Mori N., Murari E., Sancassani G.P., Sartori S., Zanzotto A., 1999. Regione Veneto e flavescenza dorata. *L'Informatore Agrario* **24**: 41-56.
- Bertamini M., Nedunchezian N., 2001. Effect of phytoplasma [stolbur-subgroup (Bios noir-BN)] on photosynthesis pigments, saccharides, ribulose-1,5bisphosphat carboxylase, nitrate and nitritereductase, and photosynthetic activities in the field-grown grapevine (*Vitis vinifera* L.cv. Chardonnay) leaves. *Photosynthetica* **39**: 119-122.
- Bertamini M., Nedunchezian N., Tomasi F., Grando M.S., 2002. Phytoplasma [Stolbur-subgroup (Bois noir-BN)] infection inhibits photosynthetic pigments, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and photosynthetic activities in field grown grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay) leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **61**: 357-366.
- Bisognin C., Mescalchin E., Grando M.S., 2002. Monitoraggio della diffusione dei giallumi della vite in Trentino. *Atti Giornate Fitopatologiche* **2**: 583-584.
- Bolouri-Moghaddam M.R., Van den Ende W., 2012. Sugars and plant innate immunity. *Journal of Experimental Botany* **63**: 3989-3998.
- Borgo M., Angelini E., 2002. Diffusione della flavescenza dorata della vite in Italia e relazioni con vitigni, pratiche agronomiche e materiali di propagazione. *Atti Giornate Fitopatologiche* **1**: 35-50.
- Botti S., Paltrinieri S., Mori N., Milanese L., Bondavalli R., Bertaccini A., (2005); Variabilità molecolare di fitoplasmi 16SrXII in vigneti delle province di Modena e Reggio Emilia. *Atti 3° Incontro Nazionale sulle Malattie da Fitoplasmi*, Milano.
- Carginale V., Maria G., Capasso C., Ionata E., La Cara F., Pastore M. Bertaccini A., Capasso A., 2004. Identification of genes expressed in response to phytoplasma infection in leaf of *Prunus armeniaca* by messenger RNA differential display. *Gene* **332**: 29-34.
- Carraro L., Ermacora P., Loi N., Osler R. (2004); The recovery phenomenon in apple proliferation infected apple trees. *Journal Plant Pathology* **86**: 141–146.
- Caudwell A., 1991. Les phénomènes de rétablissement chez la Flavescence dorée de la vigne. *Annales of Epiphyties* **12**: 347-354.

- Cimerman A., Pacifico D., Salar P., Marzachi C., Foissac X., 2009. Striking diversity of *vmp1*, a variable gene encoding a putative membrane protein of the stolbur phytoplasma. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 2951-2957.
- Constable FE, Gibb KS, Symons RH., (2003); Seasonal distribution of phytoplasmas in Australian grapevines. *Plant Pathology* **52**: 267–276.
- Conti M., 2001. Giallumi della vite. *Informatore Fitopatologico* **51**(4): 35-40.
- Credi R., Terlizzi F., Bissani R., Poggi Pollini C., 2001. Presenza e diffusione di fitoplasmi del Legno nero e della Flavescenza dorata della vite in EmiliaRomagna. *Vignevini* **12**: 107-110.
- Curković Perica M., 2008. Auxin-treatment induces recovery of phytoplasma-infected periwinkle. *Journal of Applied Microbiology* **105**: 1826-1834.
- Cvrkovic T., Jovic J., Mitrovica M., Krstica O., Tosevski I., 2014. Experimental and molecular evidence of *Reptalus panzeri* as a natural vector of bois noir. *Plant Pathology* **63**: 42–53.
- D’Ascenzo D., Murolo S., Di Giovanni R., Branzanti M.B., Romanazzi G., 2005. Monitoraggio dei fitoplasmi della vite in Abruzzo. *Petria* **15**(1/2): 173-175.
- Di Terlizzi B., Castellano M.A., Alma A., Savino V., 1993. Present status of grapevine yellows in Apulia. *Phytopathologia Mediterranea* **33**: 125-131.
- Ember I., Bodor P., Zsófi Z., Pálfi Z., Ladányi M., Pásti G., Deák T., Nyitrai DS., Bálo B., Szekeres A., Bencsik O., (2018); “Bois noir” affects the yield and wine quality of *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay. *European Journal of Plant Pathology* **152**: 185–197.
- Endeshaw S.T., Murolo S., Romanazzi G., Neri D., 2010. Fotosintesi e traspirazione: due processi metabolici profondamente modificati in viti infette da Legno nero. *Petria* **20**: 755-757.
- Endeshaw S.T., Murolo S., Romanazzi G., Neri D., 2012. Effects of Bois noir phytoplasma infection on carbon assimilation, transpiration, and stomatal conductance of field grown grapevine (*Vitis vinifera* L.) cv Chardonnay. *Physiologia Plantarum* **145**: 286-295.
- Fabre A., Danet JL., Foissac X., 2011. The stolbur phytoplasma antigenic membrane protein gene *stamp* is submitted to diversifying positive selection. *Gene* **472**: 37–41.

- Ferrari P.M., 1985. Rincoti omotteri raccolti nell'Italia centrale e meridionale dal prof. Capanna. *Bollettino della Società Entomologica Italiana* **17**: 269-292.
- Fraussin C., 2000. Flavescenza dorata e Legno nero della vite in Friuli-Venezia Giulia. *L'Informatore Agrario* **56**: 65-72.
- Fregoni M., 2005. Viticoltura di qualità. *Tecniche Nuove*, pp. 826.
- Garau R., Tolu G., Prota V.A., Sechi A., 2004. Differential reactivity of grapevine cultivars to “Bois noir” infections in Sardinia. *Journal of Plant Pathology* **86**: 320.
- Garau R., Sechi A., Prota V.A., Moro G., 2007a. Productive parameters in Chardonnay and Vermentino grapevines infected with “Bois noir” and recovered in Sardinia. *Bulletin of Insectology* **60**: 233-234.
- Garau R., Sechi A., Prota V.A., Moro G., 2007b. Applicazioni di biostimolanti su Chardonnay e Vermentino affetti da “Legno nero” e loro influenza sul recovery. Atti Convegno Nazionale “Nuove possibilità di lotta contro le fitoplasmosi della vite e dei fruttiferi basate su recovery, resistenze indotte e anatagonisti” – Ancona, 17-18 settembre, 12-13.
- Garau R., Prota V.A., Sechi A., Moro G., 2008. Somministrazione di biostimolanti a piante affette da “Legno nero”: esiti ai fini del recovery. *Petria* **18**: 366-368.
- Gatineau F., Larrue J., Clair D., Lorton F., Richard-Molard M., & Boudon-Padieu E., 2001. A new natural planthopper vector of stolbur phytoplasma in the genus *Pentastiridius* (hemiptera: cixiidae). *European Journal of Plant Pathology* **107**: 263–271.
- Gibb K. S.; Constable F. E.; Moran J. R.; Padovan A. C., 1999. Phytoplasmas in Australian grapevines - detection, differentiation and associated diseases. *Vitis* **38**: 107-114.
- Gomez L.D., Noctor G., Knight M.R., Foyer C.H., 2004. Regulation of calcium signalling and gene expression by glutathione. *Journal Experimental Botany* **55**: 1851-1859.
- Granata G., 1982. Deperimenti e giallumi in piante di vite. *Informatore Fitopatologico* **32**(7-8): 18-20.
- Hall J.L., 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1-11.

- Hren M., Nikolic P., Rotter A., Blejec A., Terrier N., Ravnikar M., Dermastia M., Grouden K., 2009. Bois noir phytoplasma induces significant reprogramming of the leaf transcriptome in the field grown grapevine. *BMC Genomics* **10**: 460.
- Iasur-Kruh L., Zahavi T., Barkai R., Freilich S., Zchori-Fein E. & Naor V., 2018. Dyella-like bacterium isolated from an insect as a potential biocontrol agent against grapevine yellows. *Phytopathology* **108**: 336–341.
- IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team – Phytoplasma taxonomy group, 2004. “*Candidatus* Phytoplasma” a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**: 1243-1255.
- ISTAT, 2018. Risultati definitivi. 8° Censimento Generale dell’Agricoltura.
- Jovic J., Cvrkovic T., Mitrovic M., Krnjajic S., Redinbaugh MG., Pratt RC., Gingery RE., Hogenhout SA. and Tosevski I., 2007. Roles of stolbur phytoplasma and *Reptalus panzeri* (Cixiinae, Auchenorrhyncha) in the epidemiology of maize redness in Serbia. *European Journal of Plant Pathology* **118**: 85-89.
- Junqueira A., Bedendo I., Pascholati S., 2004. Biochemical changes in corn plants infected by the maize bushy stunt phytoplasma. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **65**: 181-185.
- Koch K., 2004. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 235-246.
- Lahav T., Zchori-Fein E., Naor V., Freilich S., and Iasur-Kruh L., 2016. Draft genome sequence of a Dyella-like bacterium from the planthopper *Hyalesthes obsoletus*. *Genome Announcement* **4**(4): e00686-16.
- Landi L., Romanazzi G., 2011. Seasonal variant of defense-related gene expression in leaves from Bois noir affected and recovered grapevines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**: 6628-6637.
- Landi L., Murolo S. and Romanazzi G., 2019. Detection of ‘*Candidatus* Phytoplasma solani’ in roots from Bois noir symptomatic and recovered grapevines, *Scientific Reports* **9**: 2013.
- Langer M., Darimont H., Maixner M., 2003. Characterization of isolates of Vergilungskrankheit-phytoplasma by RFLP analysis and their association with grapevine, herbaceous host plant and vectors. *Extended abstracts 14th ICVG Meeting*, Locorotondo (BA), 66-67.

- Lee I.-M., Hammond R.W., Davis R.E., Gundersen D.E., 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* **83**: 834-842.
- Lee I.-M., Gundersen D.E., Hammond R.W., Davis R.E., 1994. Use of mycoplasma-like organisms (MLO) group-specific oligonucleotide primers for nested-PCR assays to detect mixed-MLO infections in a single host plant. *Phytopathology* **84**: 559-566.
- Lee I.-M., Gundersen D.E., Davis R.E., Bartoszyk I.M., 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analysis of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**: 1153-1169.
- Lee I.-M., Bottner K.D., Munyaneza J.E., Secor G.A., Gudmestad N.C., 2004a. Clover proliferation group (16SrVI) subgroup A (16SrVI-A) phytoplasma is a probable causal agent of potato purple top disease in Washington and Oregon. *Plant Disease* **88**: 429.
- Lee I.-M., Martini M., Marcone C., Zhu S.F., 2004b. Classification of phytoplasma strains in the elm yellows group (16SrV) and proposal of ‘*Candidatus* Phytoplasma ulmi’ for the phytoplasma associated with elm yellows. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* **54**: 337-347.
- Lee I.-M., Bottner K.D., Secor G., Rivera-Varas V., 2006. ‘*Candidatus* Phytoplasma americanum’, a phytoplasma associated with a potato purple top wilt disease complex. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* **56**: 1593-1597.
- Loi N., Ermacora P., Ferrini F., Carraro L., Osler R., 2002. Trasmissione sperimentale del fitoplasma degli scopazzi del melo da piante “recovered” e sintomatiche di melo. *Petria* **12**: 373-374.
- Maixner M., 1994. Transmission of German grapevine yellows (Vergilgungskrankheit) by the planthopper *Hyalesthes obsoletus* (Auchenorrhyncha: Cixiidae). *Vitis* **33**: 103-104.
- Maixner M., 2006. Grapevine yellows-current developments and unsolved questions. *Extended Abstract ICVG Meeting*, Stellenbosh, South Africa, 86-88.
- Maixner M., 2011. Recent advances in Bois noir research. *Petria* **21**: 95-108.

- Marcone C., Scaglione G., Nicotina M., De Florio N., Ragozzino A., 1997. Presenza di infezioni fitoplasmatiche della vite e relativi possibili vettori in Campania. *Informatore Fitopatologico* **47**(10): 49-52.
- Marcone C., Neimark H., Ragozzino A., Lauer U., Seemuller E., 1999. Chromosome sizes of phytoplasmas composing major phylogenetic groups and subgroups. *Phytopathology* **89**: 805-810.
- Marcone C., Scaglione G., Ragozzino A., 2000. Aspetti epidemiologici delle fitoplasmosi delle drupacee e della vite in Campania. *Informatore Fitopatologico* **50**: 1-2.
- Martelli G.P., Boudon-Padieu E., 2006. Directory of infectious diseases of grapevine and viroses and virus-like disease of the grapevine, *Bibliographic report 1998 2004. Options méditerranéennes, Serie B: Studies and Research* **55**: 279 pp.
- Martini M., Botti S., Marcone C., Marzachi C., Casati P., Bianco P.A., Benedetti R., Bertaccini A., 2002. Genetic variabilità among Flavescence dorée phytoplasmas from different origins in Italy and France. *Molecular and Cellular Probes* **16**: 197-208.
- Martini M., Lee I.-M., Bottner K.D., Zhao Y., Botti S., Bertaccini A., Harrison N.A., Carraro L., Marcone C., Osler R., 2007. Ribosomal protein gene-based phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**: 2037-2051.
- Marzachi C., Boarino A., Vicchi A., Palermo S., Morone C., Loria A., Boccardo G., 2001. Flavescenza dorata, legno nero e giallume dell'astro nei vitigni del Piemonte sud orientale. *L'Informatore Agrario* **9**: 58-64.
- Mazio P., Montermini A., Brignoli P., 2008. Preliminary trials to test the effectiveness of biological promoters for the control of grapevine yellows symptoms. *Atti Giornate Fitopatologiche* **2**: 593-600.
- Montano H., Davis R.E., Dally E.L., Hogenhout S., Pimentel P., Brioso P.S.T., 2001. "Candidatus phytoplasma brasiliense", a new phytoplasma taxon associated with hibiscus witches'-broom disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**: 1109-1118.
- Morone C., Gotta P., Boccardo C., 2000. Sintomi di fitoplasmi in vitigni coltivati in Piemonte. *L'Informatore Agrario* **23**: 69-77.

- Morone C., Boveri M., Giosuè S., Gotta P., Rossi V., Scapin I., Marzachi C., (2007); Epidemiology of flavescence dorée in vineyards in northwestern Italy. *Phytopathology* **97**: 1422–1427.
- Murolo S., Romanazzi G., Neri D., 2009. Phytosynthesis and transpiration in grapevines affected by Bois noir and recovered. *Extended abstracts 16th ICVG Meeting, Dijon, France, 2009*, 193-194.
- Murolo S., Marcone C., Prota V., Garau R., Foissac X., Romanazzi G., 2010a. Genetic variability of the stolbur phytoplasma vmp1 gene in grapevines, bindweeds and vegetables. *Journal of Applied Microbiology* **109**: 2049-2059.
- Murolo S., Piergiacomi M., Romanazzi G., 2010b. Suscettibilità a Legno nero di alcune varietà di vite allevate nelle Marche. *Petria* **20**: 752-754.
- Murolo S., Mancini V., Romanazzi G., 2014. Spatial and temporal stolbur population structure in a cv. Chardonnay vineyard according to vmp1 gene characterization. *Plant Pathology* **63**: 700–707.
- Murolo S. and Romanazzi G., 2015. In-vineyard population structure of ‘Candidatus Phytoplasma solani’ using multilocus sequence typing analysis, *Infection, Genetics and Evolution* **31**: 221-230.
- Musetti R., Sanità di Toppi L., Ermacora P., Favali M.A., 2004. Recovery in apple trees infected with the apple proliferation phytoplasma: an ultrastructural and biochemical study. *Phytopatology* **94**: 203-208.
- Musetti R., Sanità di Toppi L., Martini M., Ferrari F., Loschi A., Favali M.A., Osler R., 2005. Hydrogen peroxide localization and antioxidant status in the recovery of apricot plants from European stone fruit yellows. *European Journal of Plant Pathology* **112**: 53-61.
- Musetti R., Marabottini R., Badiani M., Martini M., Sanità di Toppi L., Borselli S., Borgo M., Osler R., 2007. On the role of H₂O₂ in the recovery of grapevine (*Vitis vinifera*, cv. Prosecco) from Flavescence dorée disease. *Functional Plant Biology* **34**: 750-758.
- Musetti R., Buxa S.V., De Marco F., Loschi A., Polizzotto R., Kogel K.H., Van Bel A.J., 2013. Phytoplasma-triggered Ca⁽²⁺⁾ influx is involved in sieve-tube blockage. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **26**: 379-386.

- Muto A., Osawa S., 1987. The guanine and cytosine content of genomic DNA and bacterial evolution. *Proceedings National Academy of Science of USA* **84**: 166-169.
- Mutton P., Boccalon W., Bressan S., Coassin C., Colautti M., Del Cont B.D., Floreani A., Zucchiatti D., Pavan F., Frausin C., Mucignat D., Antoniazzi P., Stefanelli G., Villani A., 2004. Legno nero della vite in vigneti di Chardonnay della provincia di Pordenone. *Supplemento Notiziario ERS* **5-6**: 33-39.
- Namba S., Kato S., Iwanami S., Oyazu H., Shiozawa H., Tsuchizaki T., 1993. Detection and differentiation of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms using polymerase chain reaction. *Phytopathology* **83**: 786-791.
- Nishigawa H., Oshima K., Kakizawa S., Jung H., Kuboyama T., Miyata S., Ugaki M., Namba S., 2002. Evidence of intermolecular recombination between extrachromosomal DNAs in phytoplasma: a trigger for the biological diversity of phytoplasma? *Microbiology* **148**: 1389-1396.
- Oostendorp M., Kunz W., Dietrich B., Staub T., 2001. Induced disease resistance in plants by chemicals. *European Journal of Plant Pathology* **107**: 19-28.
- Osler R., Carraro L., Loi N., Refatti E., 1993. Symptom expression and disease occurrence of a yellow disease of grapevine in Northeastern Italy. *Plant Disease* **77**: 496-498.
- Osler R., Loi N., Carraro L., Ermacora P., Refatti E., 2000. "Recovery in plants affected by phytoplasmas", in *Proceedings 5th Congress of the European Foundation for Plant Pathology*, ed. Società Italiana di Patologia Vegetale, Taormina, 589-592.
- Osler R., Carraro L., Ermacora P., Ferrini F., Loi N., Loschi A., Martini M., Mutton P.B., Refatti E., 2003. Roguing: a controversial practice to eradicate grape yellows caused by phytoplasmas. *Extended abstract 14th ICVG Meeting*, Locorotondo (BA), Italy, 68.
- Pacifico D., Alma A., Bagnoli B., Foissac X., Pasquini G., Tessitori M. and Marzachi C., 2009. Characterization of Bois noir isolates by restriction fragment length polymorphism of a stolbur-specific putative membrane protein gene. *Phytopathology* **99**: 711-715.

- Palermo S., Elekes M., Botti S., Ember I., Alma A., Orosz A., Bertaccini A., and Kölber M., (2004); Presence of stolbur phytoplasma in Cixiidae in Hungarian vineyards. *Vitis* **43**: 201-204.
- Pasquini G., Ferretti L., Gentilini A., Bagnoli B., Cavaliari V., Barba M., 2007. Molecular characterization of stolbur isolates collected in grapevines, weeds and insects in central and southern Italy. *Bulletin of Insectology* **60**: 355-356.
- Pavan F., 1989. Possibilità di controllo dei potenziali vettori della Flavescenza dorata. *L'Informatore Agrario* **41**: 55-61.
- Pierro R., Semeraro T., Luvisi A., Garg H., Vergine M., De Bellis L. and Gill H.K., 2019. The distribution of phytoplasmas in south and east asia: an emerging threat to grapevine cultivation. *Frontiers in Plant Science* **10**: 1108.
- Prati S., Maffi D., Longoni C., Chiesa S., Bianco P.A., Quadroni S., 2004. Preliminary study on the effects of two SAR inducers and prohexadione calcium on the development of phytoplasmas in vinca. *Journal of Plant Pathology* **87**: 303.
- Prezelj N., Nikolić P., Gruden K., Ravnikar M., Dermastia M., 2013. Spatiotemporal distribution of flavescence dorée phytoplasma in grapevine. *Plant Pathology* **62**: 760-766.
- Quaglino F., Zhao Y., Bianco P.A., Wei W., Romanazzi G., Murolo S., Casati P., Durante G., Davis R.E., 2009. Genetic diversity among Bois noir phytoplasma populations in Italy: new 16Sr subgroups and distinct SNP genetic lineages. *Extended abstracts 16th Meeting of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG)* - Dijon, France, 186-187.
- Quaglino F., Zhao Y., Casati P., Bulgari D., Bianco P.A., Wei W., Davis R.E., 2013. '*Candidatus* Phytoplasma solani', a novel taxon associated with stolbur and Bois noir related diseases of plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **63**: 2879–2894.
- Reggiani N., Credi R., 2010. Prove di capitozzatura per controllare il legno nero. *Agricoltura, Regione Emilia Romagna* **7-8**: 56-58.
- Riolo P., Murolo S., Riga F., Nardi S., Isidoro N., Romanazzi G., 2006. Identificazione di fitoplasmi in vettori e potenziali vettori di giallumi della vite nelle Marche. *Atti Giornate Fitopatologiche. Riccione (RN), 27-29 marzo 2006*, 2: 503-504.

- Rolland F., Baena-Gonzalez E., Sheen J., 2006. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* **57**: 675-709.
- Romanazzi G., Nigro F., Ippolito A., Di Venere D., Salerno M., 2002. Effects of pre and postharvest chitosan treatments to control storage gray mould of table grapes. *Journal of Food Science* **67**: 1862-1867.
- Romanazzi G., Murolo S., Terlizzi F., Talevi S., Branzanti M.B., Nardi S., Credi R., Savino V., 2005. Secondo rinvenimento di Flavescenza dorata nelle Marche. *Petria* **15**(1/2): 81-82.
- Romanazzi G., Murolo S., La Notte P., Virgili S., Silvestroni O., Savino V., 2006a. Miglioramento sanitario di vitigni autoctoni minori nelle Marche. Atti Convegno Nazionale “I vitigni autoctoni minori: aspetti tecnici, normativi commerciali” – Torino, 30 novembre-1 dicembre. ISBN 88-6136-001-7: pp. 4.
- Romanazzi G., Mlikota Glaber F., Smilanick J.L., 2006b. Preharvest chitosan and postharvest UV-C irradiation treatments suppress gray mould of table grapes. *Plant Disease* **90**: 445-450.
- Romanazzi G., Murolo S., Terlizzi F., Talevi S., Stimilli G., Savino V., 2007a. Fitoplasmi associati ai giallumi della vite nelle Marche. *Informatore Fitopatologico* **51**(4): 48-50.
- Romanazzi G., Prota V.A., Casati P., Murolo S., Silletti M.R., Di Giovanni R., Landi L., Zorloni A., D’Ascenzo D., Virgili S., Garau R., Savino V., Bianco P.A., 2007b. Incidenza del recovery in viti infette da fitoplasmi in diverse condizioni climatiche e varietali italiani e tentativi di comprensione ed induzione del fenomeno. Atti Convegno Nazionale “Nuove possibilità di lotta contro le fitoplasmosi della vite e dei fruttiferi basati su recovery, resistenze indotte e antagonisti” – Ancona, 17-18 settembre, 9-11.
- Romanazzi G., Murolo S., 2008a. Caratterizzazione molecolare di isolati di Legno nero della vite nelle Marche. *Petria* **18**: 284-286.
- Romanazzi G., Murolo S., 2008b. Partial uprooting and polling to induce recovery in Bois noir infected grapevines. *Journal of Phytopathology* **156**: 747-750.
- Romanazzi G., Murolo S., Pizzichini L., Nardi S., 2009a. Esca in young and mature vineyard, and molecular diagnosis of the associated fungi. *European Journal of Plant Pathology* **125**: 277-290.

- Romanazzi G., D'Ascenzo D., Murolo S., 2009b. Field treatment with resistance inducers for the control of grapevine Bois noir. *Journal of Plant Pathology* **91**: 725-730.
- Romanazzi G., Musetti R., Marzachi C., Casati P., 2009c. Induction of resistance in the control of phytoplasma diseases. *Petria* **19**, 113-129.
- Romanazzi G., Murolo S., Feliziani E., Masciulli A., Patrizio F., Piergiacomini M., D'Ascenzo D., 2010. E' possibile controllare il legno nero della vite mediante l'applicazione di induttori di resistenza? Risultati di 4 anni di trattamenti in campo. V Incontro Nazionale sulle Malattie da Fitoplasmi. *Petria* **20**: 782785.
- Romanazzi G., Murolo S., Feliziani E., 2013. Effects of an innovative strategy to contain grapevine Bois noir: Field treatment with resistance inducers. *Phytopathology* **103**: 785-791.
- Salgado-Siclán M.L., Rojas-Martínez R., Zavaleta-Mejía E., Ochoa-Martínez D., Burgueño-Ferreira J., Xoconostle-Cázares B., Ruiz-Medrano R., 2012. Differential accumulation of defense-related transcripts by inducers of resistance in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Pathology and Microbiology* **3**: 137.
- Schmid G., 1965. Five and more years of observation on the proliferation virus of apples in the field. *Zastita Bilja*, **16**: 285-291.
- Schneider B., Seemuller E., Smart C.D., Kirkpatrick B.C., 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenetic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. In: *Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology*, Razin S., Tully J.G. eds., Academic Press, New York, **2**: 369-390.
- Schneider B., Marcone C., Kampmann M., Ragozzino A., Lederer W., Cousin M.T., Seemüller E., 1997. Characterization and classification of phytoplasmas from wild and cultivated plants by RFLP and sequence analysis of ribosomal DNA. *European Journal Plant Pathology* **103**: 675-686.
- Schreiber K., Desveaux D., 2008. Message in a bottle: chemical biology of induced resistance in plants. *The Plant Pathology Journal* **24**: 245-268.
- Sears B.B., Lim P.O., Holland N., Kirkpatrick B.C., Klomparens K.L., 1989. Isolation and characterization of DNA from a Mycoplasma-like organism. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **2**: 175-180.
- Sfalanga A., Braccini P., Murari E., Martini M., Parrini C., Bertaccini A., 1999. Presenza di legno nero in viti toscane. *L'Informatore Agrario* **11**: 99-102.

- Sfalanga A., Botti S., Guadagnini M., Milano C., Egger E., Braccini P., Bertaccini A., 2001. Timore per i giallumi della vite in Toscana. *Terra e Vita* **27**: 78-80.
- Sforza R., Clair D., Daire X., Larrue J., Boudon-Padieu E., 1998. The role of *Hyalesthes obsoletus* (Hemiptera: Cixiidae) in the occurrence of Bois noir of grapevine in France. *Journal of Phytopathology* **146**: 549-556.
- Silletti M.R., Murolo S., Romanazzi G., Savino V., 2008. Caratterizzazione molecolare di isolati pugliesi di Legno nero della vite. *Petria* **18**: 287-289.
- Smart C.D., Schneider B., Blomquist C.L., Guerra L.J., Harrison N.A., Ahrens U., Lorenz K.H., Seemuller E., 1996. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16-23S rRNA spacer region. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 2988-2993.
- Solfanelli C., Poggi A., Loreti E., Alpi A., Perata G., 2006. Sucrose-specific induction of the anthocyanin biosynthetic pathway in Arabidopsis. *Plant Physiology* **140**: 637-646.
- Stackebrandt E., Goebel B.M., 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**: 846-849.
- Trivellone, V., Pinzauti, F., and Bagnoli B., 2005. *Reptalus quinquecostatus* (Dufour) (*Auchenorrhyncha Cixiidae*) as a possible vector of stolbur-phytoplasma in a vineyard in Tuscany. *Redia* **88**:103-108.
- Wei W., Davis R.E., Lee I.-M., Zhao Y., 2007. Computer simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**: 1855-1867.
- Wingate V.P.M., Lawton M.A., Lamb C.J., 1988. Glutathione causes a massive and selective induction of plant defense genes. *Plant Physiology* **87**: 206-211.
- Winkel-Shirley B., 2001. Flavonoid biosynthesis: a colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology* **126**: 485-493.
- Zahavi T., Sharon R., Sapir G., Mawassi M., Dafny-Yelin M., Naor V., 2013. The long-term effect of Stolbur phytoplasma on grapevines in the Golan Heights. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **19**: 277-284.
- Zhong B.X., Shen Y.W., 2004. Accumulation of pathogenesis related type-5 like proteins in phytoplasma-infected garland chrysanthemum *Chrysanthemum coronarium*. *Acta Biochimica Biophysica Sinica* **36**: 773-779.

8. RINGRAZIAMENTI

Al termine di tale percorso, il primo ringraziamento va a coloro che mi hanno affiancato durante questa pagina della mia vita. Inanzitutto, ringrazio il Prof. Gianfranco Romanazzi, che mi ha dato la possibilità di prendere parte a questo lavoro sperimentale, offrendomi l'occasione di entrare nel mondo della ricerca scientifica. Come un mentore ha seguito passo dopo passo questa fase conclusiva del mio percorso di studi, coordinando le attività che mi hanno visto partecipare. Per la disponibilità mostrata nei miei confronti e la cordialità manifestatami, gli indirizzo la mia gratitudine e la mia stima.

Di pari rilevanza è stato il contributo del Prof. Sergio Murolo, a cui rivolgo i miei più sentiti ringraziamenti. Davvero preziosa è stata l'assistenza prestatami e la professionalità mostrata nei miei confronti. Ha costituito una fonte di aiuto indispensabile durante lo svolgimento delle attività sperimentali e la stesura della tesi. Ringrazio inoltre sentitamente tutto il personale con cui ho condiviso l'attività sperimentale in campo e in laboratorio.

Detto ciò, devo un profondo grazie alla mia famiglia, che dall'inizio della carriera universitaria mi ha sempre incoraggiato e sostenuto. Ringrazio i miei amici per il sostegno e la pazienza mostratami.

Un grazie speciale va ai miei genitori, da sempre punto di riferimento imprescindibile della mia vita.