



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

Dipartimento Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali

Corso di Laurea in Scienze e Tecnologie Agrarie

**Flavescenza dorata e sue implicazioni nel
panorama viticolo**

Effects of Flavescence dorée on viticulture

TIPO TESI: compilativa

Relatore:

Prof. Gianfranco Romanazzi

Tesi di laurea di:

Federico Coppari

Anno Accademico 2019/2020

*Alla mia famiglia e a Corinne,
per tutto l'amore e l'aiuto
che mi hanno dato*

PRESENTAZIONE

La Flavescenza dorata è una malattia che colpisce la pianta di vite e rientra nel gruppo dei “giallumi della vite”. Si tratta di una malattia che ha provocato gravi danni alla produzione viticola del Nord Italia e non solo. Negli ultimi anni si è accentuato il rischio di una diffusione nelle aree viticole centro-meridionali, dato che in alcune regioni ci sono stati dei rinvenimenti dell’insetto vettore, il mezzo attraverso il quale si avvale il patogeno per diffondersi, e casi isolati di Flavescenza dorata. È quindi importante avere una buona conoscenza della diffusione della malattia e degli aspetti tecnici che la diversificano negli ambienti viticoli.

Lo scopo di questo lavoro è finalizzato quindi ad una divulgazione tecnico-scientifica e ad un approfondimento sugli aspetti che caratterizzano e contraddistinguono la Flavescenza dorata da altre patologie, al fine di poter individuare e riconoscere la malattia ed adottare quindi le eventuali misure preventive, data anche la scarsità delle misure di controllo, siano esse di carattere agronomico o fitoiatrico.

Indice

Pag.

1.	INTRODUZIONE	9
1.1.	ORIGINE E DIFFUSIONE DELLA VITICOLTURA IN ITALIA	9
1.2.	CENNI STORICI E DIFFUSIONE DEI GIALLUMI	10
2.	FITOPLASMI	13
2.1.	CARATTERISTICHE GENERALI	13
2.2.	CLASSIFICAZIONE, FILOGENESI E TASSONOMIA	14
2.3.	METODI DIAGNOSTICI	17
2.3.1.	Colorazione DAPI	17
2.4.	DIAGNOSI SIEROLOGICA	18
2.4.1.	Metodo ELISA	18
2.5.	DIAGNOSI MOLECOLARE	19
2.5.1.	Ibridazione molecolare	20
2.5.2.	Amplificazione genica: PCR	21

2.5.3.	Nested PCR	22
2.5.4.	Amplificazione RFLP	22
3.	VETTORE DI FLAVESCENZA DORATA: <i>Scaphoideus titanus</i>	23
3.1.	CENNI DI MORFOLOGIA E SISTEMATICA	23
3.2.	CICLO BIOLOGICO E DANNI	25
3.3.	LOTTA E MONITORAGGIO	25
4.	FLAVESCENZA DORATA DELLA VITE	27
4.1.	CARATTERISTICHE GENERALI	27
4.2.	SINTOMATOLOGIA E DANNI	28
4.2.1.	Sintomi su foglie	29
4.2.2.	Sintomi su tralci	30
4.2.3.	Sintomi su grappoli	31
4.3.	ALTERAZIONI IMPUTABILI AD ALTRE CAUSE	33
4.4.	EZIOLOGIA E DIAGNOSI	37

4.4.1.	Metodi diagnostici innovativi	37
4.5.	EPIDEMIOLOGIA	39
4.5.1.	Trasmissione di Flavescenza dorata	40
4.6.	MISURE DI CONTROLLO E DIFESA	42
4.6.1.	Misure da adottare nelle zone ancora indenni	42
4.6.2.	Misure da adottare nelle zone focolaio	43
4.6.3.	Misure da adottare nelle zone di insediamento	45
4.7.	TERMOTERAPIA	47
5.	CONCLUSIONI	48
6.	BIBLIOGRAFIA	50
7.	RINGRAZIAMENTI	55

RIASSUNTO

La Flavescenza dorata è una malattia tipica della pianta di vite, provocata da microrganismi inizialmente sconosciuti o considerati erroneamente virus, chiamati in seguito fitoplasmi. La loro scoperta è dovuta all'evoluzione in campo scientifico delle tecniche di diagnosi. In seguito all'avvento delle tecniche molecolari, in particolare della PCR, si sono potuti scoprire e conoscere meglio questi microrganismi e ciò ha permesso la messa a punto di nuovi protocolli di diagnosi sempre più efficaci. La Flavescenza dorata, che al giorno d'oggi risulta essere ancora una delle patologie più temute per i danni che provoca e per la facilità con cui si diffonde, è stata la prima forma di giallume ad essere stata individuata in campo internazionale a metà degli anni '50 in Guascogna. In Italia la malattia è stata segnalata per la prima volta intorno agli anni '70 nelle zone dell'Oltrepò pavese e da qui, in seguito alla diffusione del suo insetto vettore, si è rapidamente espansa in Veneto, Piemonte e Lombardia.

Data la quasi impossibilità di agire direttamente sull'agente causale della patologia, la lotta e la difesa si concentrano prevalentemente sull'insetto che funge da vettore di trasmissione, la cicalina *Scaphoideus titanus*. Di quest'ultima si hanno buone conoscenze in relazione alla morfologia, ciclo biologico e periodi di riproduzione. Proprio su questi aspetti si impostano piani di lotta insetticida volti a ridurre al minimo o nel migliore dei casi sterminare le popolazioni di *S. titanus*.

Oltre alla corrette norme fitoiatriche ed agronomiche, un aiuto arriva anche da quelle legislative, perché grazie al *DM n° 32442 del 31 maggio 2000*, vengono tracciate delle linee guida da seguire in caso di presenza di Flavescenza dorata e del suo vettore. In particolare bisogna sottolineare il fatto che la Flavescenza dorata è una malattia da quarantena molto difficile da debellare completamente per la presenza inevitabile di fonti di inoculo, come piccoli vigneti abbandonati che fungono anche da rifugio di *S. titanus*. Da qui l'importanza di controllare la sua diffusione evitando l'instaurarsi nei vigneti di popolazioni consistenti del suo vettore.

ABSTRACT

Flavescence dorée is a pathology typical of the grapevine plant, caused by microorganisms initially unknown or mistakenly considered viruses, later called phytoplasmas. Their discovery is due to the scientific evolution of diagnostic techniques. Following the advent of molecular techniques, in particular PCR, these microorganisms have been discovered and become better known, which has led to the development of new and increasingly effective diagnostic protocols. Flavescence dorée, which today is still one of the most feared pathologies because of the damage it causes and the ease with which it spreads, was the first form of yellowish jaundice to be detected internationally in the mid-1950s in Gascony. In Italy, the disease was first reported around the 1970s in the areas of the Oltrepò pavese and from here, following the spread of its vector insect, it rapidly expanded into Veneto, Piedmont and Lombardy.

Given the near impossibility of acting directly on the causal agent of the disease, the fight and defence are mainly focused on the insect that acts as a vector of transmission, the cicada *Scaphoideus titanus*. We have good knowledge of the latter (morphology, biological cycle and reproduction periods). It is precisely on these aspects that insecticide control plans are set up aimed at minimising or at best exterminating the populations of *S. titanus*.

In addition to the correct phytoiatric and agronomic rules, help is also provided by the legislative ones, because thanks to *DM n° 32442 of 31st May 2000*, guidelines are drawn up to be followed in case of Flavescence dorée and its vector. In particular, it is necessary to underline the fact that Flavescence dorée is a quarantine pathology very difficult to completely eradicate due to the inevitable presence of inoculum sources, such as small abandoned vineyards that also serve as a refuge for *S. titanus*. Hence the importance of controlling its spread by avoiding the establishment in the vineyards of large populations of its vector.

1. INTRODUZIONE

1.1. ORIGINE E DIFFUSIONE DELLA VITICOLTURA IN ITALIA

La vite appartiene al genere *Vitis* della famiglia delle Vitaceae. La quasi totalità delle viti coltivate appartiene alla specie *Vitis vinifera* L., originaria del Mediterraneo e del Vicino Oriente, oggi detto Medio Oriente. La *Vitis vinifera*, originariamente diffusa dall'Europa all'Asia, durante le glaciazioni del Pleistocene, si rifugiò nei territori del bacino del Mediterraneo e nei territori asiatici che oggi corrispondono all'Armenia, alla Georgia e all'Iran. Crescendo in condizioni ambientali profondamente differenti, si diversificò dando origine a due sottospecie: *Vitis vinifera* L. subsp. *sylvestris* (Gmelin) Hegi, in Europa, e *Vitis vinifera* L. subsp. *sativa* Hegi, in Oriente. La vite è una pianta arbustiva a foglia caduca, rampicante, a liana sarmentosa. Il fusto può essere unico o dividersi in branche che portano un certo numero di tralci. Il frutto è l'acino, una bacca contenente da due a quattro semi, detti vinaccioli, portato da un corto pedicello; l'insieme degli acini costituisce un racemo, quello che comunemente viene chiamato grappolo. Nonostante il passaggio dalla raccolta dei frutti dalle piante selvatiche alla coltivazione sia stato lento e graduale, la vite sembra essere stata, insieme ad altre colture come orzo, grano, lino e cotone, una delle prime piante coltivate dalle antiche civiltà che precedettero le grandi civiltà sumere, assire, babilonesi, cartaginesi ed egizie. La coltivazione della *Vitis vinifera sativa* per la vinificazione risale almeno a 4.000 anni prima di Cristo. Si può ipotizzare che il primo centro di coltivazione fu l'area situata intorno al monte Ararat nel Caucaso. La coltivazione della vite si sarebbe diffusa secondo tre percorsi: il primo va proprio dal monte Ararat verso la Mesopotamia, l'Egitto e la Grecia, il secondo percorso va dalla Grecia alla Magna Grecia (Sicilia, Italia del Sud), la Francia e la Spagna, diffusa grazie all'influenza dei Greci e dei Fenici. Il terzo ed ultimo va dalla Francia verso il Nord dell'Europa, principalmente attraverso il Rodano, il Reno e il Danubio, sotto l'influenza romana. La vite era coltivata nella penisola italiana prima dell'arrivo dei Greci, soprattutto nei luoghi di espansione etrusca, ed era il frutto della domesticazione delle viti selvatiche spontanee presenti nei boschi. Non è da escludere, tuttavia, che alcune coltivazioni di vite nel sud della penisola fossero la conseguenza di contatti con le popolazioni della costa orientale dell'Adriatico e dello Ionio. Gli Etruschi

coltivavano *la Vitis vinifera sylvestris* sin dal 800 a. C., prima che i Greci e poi i Romani diffondessero in Italia la *Vitis vinifera sativa* con le sue numerose varietà.

I sistemi di coltivazione della vite erano vari, ma sostanzialmente possiamo dividerli in tre gruppi predominanti: ad alberello, a sostegno morto e a sostegno vivo. Il primo utilizzato anche al giorno d'oggi, consiste nel coltivare la vite a ceppo basso, lasciandola crescere liberamente o con l'ausilio di semplici paletti, il secondo con sostegni in genere di legno, ai quali la pianta si "appoggia" per sostenersi meglio. Infine l'ultimo che prevede l'utilizzo di altre piante utilizzate come sostegno (sostegno vivo); questo ultimo metodo di coltivazione si prestava anche alla coltura promiscua, ovvero viticoltura e colture erbacee sullo stesso terreno. I primi due di origine mediterranea ed il secondo di matrice autoctona.

Il merito maggiore degli studiosi romani di argomenti agricoli è rappresentato dalle loro descrizioni delle varietà di viti coltivate e delle caratteristiche organolettiche dei vini che da queste si ottenevano. Gli Autori di questo periodo (Polibio, Virgilio, Columella), che proseguì fino alla caduta dell'Impero Romano d'Occidente (476 d. C.), contribuirono a definire le tecniche di coltivazione della vite che furono utilizzate praticamente fino al 1700.

1.2. CENNI STORICI E DIFFUSIONE DEI GIALLUMI

La Flavescenza dorata rientra nel gruppo dei "giallumi della vite" (GY, dall'inglese *grapevine yellows*) che racchiude al suo interno un insieme di varie patologie, o più precisamente ampelopatie (dal greco *ampelos*: vite e *patos*: malattia) causate da fitoplasmi che si manifestano tipicamente con ingiallimenti o arrossamenti fogliari, scarsa lignificazione dei tralci e disseccamento parziale o totale dei grappoli. La prima forma di giallume ad essere stata osservata fu proprio la Flavescenza dorata, che a tutt'oggi è ancora la forma più temuta sia per i danni che può provocare sia per la facilità con cui si diffonde. Essa fu osservata prima che in Italia in campo internazionale, più precisamente nella Francia sud-occidentale, in Guascogna intorno alla metà degli anni '50 dove colpì alcune viti e determinò danni alla produzione, deperimento generale ed evidenti ingiallimenti fogliari con riflessi metallici; da qui il nome di "Flavescence dorée" assegnatole dai ricercatori francesi ed in particolare da Caudwell, nel 1957, che per primo la descrisse; anche se già nel 1924, Ravaz e Verge

attribuirono il nome di “flavescence” alla nuova malattia che comparve per la prima volta in vigneti sempre del Sud-Ovest della Francia. Qualche anno più tardi, intorno al 1959, Gärtel segnalò nei vigneti della valle della Mosella, in Germania, una malattia simile a Flavescenza dorata, denominandola “Vergilbungskrankheit” (VK) (dal tedesco “giallume della vite). Nel giro di qualche anno, Schvester (1961) dimostrò che Flavescenza dorata può essere trasmessa dalla cicalina *Scaphoideus titanus* (allora nota come *S. littoralis*). Caudwell segnalò la presenza in Francia di una forma di giallume simile a Flavescenza dorata, ma non trasmessa da *S. titanus*, che decise di nominare “Bois noir” (BN), dal francese “Legno nero”, a causa dell’evidente annerimento che assumevano i tralci.

Le tre malattie sopracitate erano all’epoca considerate di natura virale, in quanto non si era ancora a conoscenza dell’esistenza dei fitoplasmi e le patologie infettive vegetali, non associate a batteri o funghi, venivano in genere considerate virali. Oggi dopo numerosi studi e ricerche nel settore possiamo dire con sicurezza che “Flavescence dorée”, “Vergilbungskrankheit” e Bois noir” sono tre fitoplasmosi; e che le ultime due sono manifestazioni in ambienti diversi di una stessa malattia nota in Italia con il nome di “Legno nero”. Anche in Italia, la prima forma di giallume ad essere individuata fu proprio Flavescenza dorata intorno agli anni ‘60 in vigneti dell’Oltrepò pavese e fu ufficialmente segnalata da Belli nel 1973.

Le tecniche diagnostiche dell’epoca non erano certamente avanzate come quelle di cui disponiamo oggi, tuttavia alcuni elementi garantiscono con buona precisione che quella osservata da Belli si trattava effettivamente di Flavescenza dorata. In primo luogo la malattia comparve improvvisamente, su specie sperimentali virus-esenti e sottoposte a controlli annuali per la selezione, il terreno sul quale si trovavano le viti era frequentemente lavorato sfavorendo così l’insediarsi di insetti non strettamente ampelofagi (come invece lo è *S. titanus*) ed infine vi era la presenza di un piccolo vigneto, semiabbandonato, non più sottoposto a trattamenti antiparassitari in cui venne successivamente individuata una popolazione dell’insetto vettore, *S. titanus*.

All’inizio degli anni ‘80 si susseguirono, in varie regioni del nord, segnalazioni di malattie probabilmente ascrivibili a Flavescenza dorata, senza però averne la certezza, data la mancanza di test diagnostici specifici. Proprio negli anni ‘90 grazie alla scoperta e messa a punto di nuove metodologie diagnostiche basate sullo studio

del DNA come ad esempio l'ibridazione molecolare, la PCR (Polymerase Chain-Reaction) e il saggio RFLP (Restriction Fragment Length Polymorfism) la situazione in Italia e non solo andò man mano chiarendosi. Grazie in particolare all'applicazione di queste ultime metodologie non solo si poté essere sicuri di essere presenza di Flavescenza dorata, ma anche individuare con precisione l'agente infettante, e quindi non confonderlo con altri fitoplasmi, appartenenti ad altri gruppi e agenti di altri giallumi, come ad esempio Legno nero.

Proprio in virtù di questo, all'inizio del nuovo millennio si è riscontrata una riduzione della frequenza della malattia, in particolare nelle zone del Nord Italia, dove all'inizio si manifestò con più forza. A dimostrazione che negli ultimi vent'anni, grazie all'innovazione scientifica e tecnologica e all'avviamento di programmi di monitoraggio e contenimento della malattia basati sul controllo del vettore, sull'eliminazione dei focolai e sull'utilizzo di materiale certificato hanno contribuito enormemente a tenere sotto controllo questa grave e subdola malattia.

2. FITOPLASMI

2.1 CARATTERISTICHE GENERALI

I fitoplasmi: che cosa sono? I fitoplasmi sono microrganismi unicellulari, procarioti, appartenenti alla classe *Mollicutes* (dal latino *mollis cutis* “pelle molle”). Hanno una forma generalmente sferica o globulare, ma a causa dell’assenza della parete cellulare possono assumere forme e dimensioni diversissime; proprio la mancanza della parete cellulare è ciò che li differenzia da comuni batteri. Sono parassiti obbligati, endocellulari a localizzazione floematica e tendono ad accumularsi nei tubi cribrosi. Le loro cellule sono contenute all’interno di una sottile membrana che si denatura facilmente se viene alterato l’equilibrio osmotico che permette loro di vivere e moltiplicarsi all’interno della cellula ospite. Proprio questa loro caratteristica fragilità, unita all’impossibilità di coltivarli in vitro, è stata la causa della loro ritardata scoperta; fu infatti solo verso la metà degli anni ‘60 che alcuni ricercatori giapponesi, utilizzando nuove tecniche di preparazione dei campioni per microscopia elettronica, riuscirono a rilevare la presenza, nelle cellule floematiche delle piante malate, di microrganismi mai descritti in precedenza e simili ai micoplasmi, tanto da essere inizialmente denominati proprio “MLO” mycoplasma - like organism; organismi simili ai micoplasmi.

Questi ultimi sono batteri, sempre appartenenti alla classe dei *Mollicutes*, e anch’essi privi di parete cellulare, più precisamente di peptidoglicano, di piccolissime dimensioni. Essendo privi di parete cellulare, necessitano di steroli che conferiscono una consistenza rigida alla membrana senza la quale avrebbe una consistenza fluida inadatta a mantenere il volume della cellula costante e sensibile agli shock osmotici. Per l’assenza di parete cellulare, i micoplasmi non subiscono l’azione di antibiotici, in particolare alle penicilline (che inibiscono appunto la sintesi di parete), e non possono essere classificati secondo la colorazione di Gram. Sono inoltre dotati di un notevole polimorfismo strutturale, ossia sono in grado di assumere forme anche molto diverse tra loro: per questo motivo sono stati raggruppati nella classe *Mollicutes*. Successivamente, a partire dagli anni ‘90, nonostante le notevoli somiglianze tra i due organismi venne accertata la loro differente natura, anche grazie al fatto che gli organismi di recente scoperta, risultavano essere tendenzialmente fitoparassiti, non

presenti nell'uomo e negli animali come i micoplasmi, venne quindi accolta la proposta di adottare la nuova e definitiva denominazione di "fitoplasmi".

2.2. CLASSIFICAZIONE, FILOGENESI, TASSONOMIA

La tassonomia (dal greco: *tàxis*, ordinamento e *nòmos*, norma o regola) è la disciplina che si occupa della classificazione gerarchica di esseri viventi e non viventi. Questo è un classico esempio di tassonomia biologica, ossia di quei metodi con cui si classificano gli organismi in una gerarchia di "taxa" con cui si può, per esempio, risalire alla loro evoluzione.

I fitoplasmi vengono così ordinati:

Tab. 1 - Classificazione fitoplasmi

<u>Dominio</u>	Prokaryota
<u>Regno</u>	Bacteria
<u>Phylum</u>	Tenericutes
<u>Classe</u>	Mollicutes
<u>Famiglia</u>	Acholeplasmataceae
<u>Ordine</u>	Acholeplasmatales
<u>Genere</u>	Candidatus Phytoplasma

Il fatto di non riuscire a coltivarli in vitro, ha determinato per parecchi anni, non poche difficoltà alla definizione di una loro tassonomia, come sopra descritta, e dei rapporti filogenetici presenti con organismi affini. Non vi era cioè la possibilità di individuare caratteri morfologici, biochimici e fisiologici, come ad esempio le

richieste nutrizionali, che erano alla base dei criteri di classificazione dei microrganismi.

Tuttavia, intorno agli inizi degli anni '90, grazie soprattutto all'utilizzo, all'applicazione e all'innovazione delle tecniche di biologia molecolare, si poté cominciare a classificarli sotto nuovi aspetti e caratteristiche; fu proprio questo il punto di svolta che consentì finalmente una nuova e definita classificazione dei fitoplasmi. L'aiuto maggiore venne dai primi esperimenti di ibridazione molecolare, effettuati con l'impiego di sonde fitoplasma-specifiche, che fornirono le prime informazioni sulla natura di questi microrganismi e permisero quindi di mettere a punto i primi strumenti diagnostici per la loro individuazione in piante ed insetti, utilizzando la sequenza del gene 16S dei fitoplasmi. Questo gene in particolare, è molto conservato all'interno del regno dei procarioti ed è divenuto il punto di riferimento per la loro classificazione. Dal confronto tra le sequenze 16S di organismi diversi tutti appartenenti alla classe dei *Mollicutes* e di procarioti tipici, è scaturita l'ipotesi secondo cui i *Mollicutes* potrebbero derivare da un progenitore ancestrale batterico Gram positivo, appartenente alla linea evolutiva dei Lattobacilli, che si suppone abbia perso, nel corso dell'evoluzione, la capacità di sintetizzare la parete cellulare per un fenomeno di degenerazione evolutiva.

L'analisi RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), condotta sul gene codificante l'rRNA 16S ha consentito di costruire una suddivisione dei fitoplasmi conosciuti in 15 gruppi ribosomici (gruppi 16Sr) e di individuare al loro interno un numero complessivo di circa 40 sottogruppi. Occorre inoltre sottolineare che a causa della mancanza di sufficienti caratteristiche fenotipiche per questi patogeni non è prevista la distinzione in genere e specie ma si parla di "Candidatus"; si introduce un nuovo "*Candidatus Phytoplasma*" quando esso condivide una omologia inferiore al 97,5% sul gene 16S (1500 nucleotidi) rispetto ai fitoplasmi già descritti; tale limite è stato fissato in quanto al di sotto di esso è 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.

Tab. 2 - Schema riassuntivo classificazione fitoplasmi

<i>Gruppo di riferimento</i>	<i>Denominazione del ceppo</i>
16SrI	Aster yellows
16SrII	Peanut witches' broom
16SrIII	X-disease
16SrIV	Coconut lethal yellows
16SrV	Elm yellows
16SrVI	Clover proliferation
16SrVII	Ash yellows
16SrVIII	Loofah witches' broom
16SrIX	Pigeon pea witches' broom
16SrX	Apple proliferation
16SrXI	Rice yellow dwarf
16SrXII	Stolbur
16SrXIII	Mexican periwinkle virescence
16SrXIV	Bermuda grass white leaf
16SrXV	Hibiscus witches'

Più recentemente, l'analisi molecolare dei geni *housekeeping rpl22-rps3* (geni costitutivi), ovvero che codificano per proteine ed enzimi fondamentali alla sopravvivenza della cellula, ha permesso di caratterizzare in modo più dettagliato i fitoplasmi responsabili della Flavescenza dorata. Sulla base degli studi condotti su questi geni, in viti affette da Flavescenza dorata, sono stati individuati, finora, quattro differenti sottogruppi rpV (ribosomal protein V). Di questi, rpV-D, rpV-F e rpV-G, appartengono al sottogruppo 16SrV-C mentre rpV-E al sottogruppo 16SrV-D. Altri frammenti genici vengono ormai comunemente utilizzati per la caratterizzazione molecolare dei fitoplasmi che causano Flavescenza dorata. Fra di essi il più interessante è il frammento non ribosomico denominato "fd9", un gene che codifica la sintesi di una traslocasi di membrana. Quest'ultima appartiene ad un gruppo di proteine trasportatrici presenti nelle membrane per l'appunto, che permettono il

passaggio di molecole e ioni tra i due lati delle membrane stesse. Sebbene in questi ultimi anni gli studi sull'eziologia di Flavescenza dorata abbiano fornito preziose informazioni, molto resta ancora da indagare circa il ruolo dei diversi fitoplasmi riscontrati finora in vite. I suddetti fitoplasmi, che come sappiamo trovano la loro localizzazione all'interno dei vasi del tessuto floematico, trovano tuttavia una certa difficoltà nel diffondersi nei vari organi della vite. Nonostante i sintomi possono manifestarsi su vari organi della pianta, non è detto ad esempio che dei sintomi presenti su di un tralcio, siano presenti in tutti i tralci, stesso discorso per le foglie o i grappoli; ciò, è rafforzato dal fatto che il patogeno si presenta spesso in maniera irregolare in vari punti del tessuto floematico, come rilevato attraverso osservazione al microscopio elettronico.

2.3. METODI DIAGNOSTICI

Fino a circa 30-35 anni fa la differenziazione e la classificazione dei fitoplasmi si basavano fondamentalmente su alcune loro proprietà biologiche quali la morfologia, l'habitat, la specificità di insetti vettori e di piante ospiti e sulla sintomatologia indotta da essi. La maggior parte delle indagini era condotta al microscopio elettronico o al microscopio a fluorescenza (colorazione del DNA con il fluorocromo DAPI), ma entrambe queste tecniche, oltre a essere molto laboriose, si sono nel tempo rivelate non molto attendibili ai fini diagnostici, infatti i fitoplasmi sono spesso presenti nei tubi cribrosi a concentrazioni talmente basse da non potere essere rilevati.

L'uso di sonde molecolari fitoplasma-specifiche, ottenute per clonazione "random" da estratti di piante infette, la produzione di anticorpi mono e policlonali impiegati in indagini sierologiche tramite ELISA, e gli esperimenti di ibridazione per valutare il grado di omologia tra le sonde e gli isolati di fitoplasmi, hanno consentito di chiarire, almeno in parte, alcune delle relazioni tassonomiche tra fitoplasmi diversi.

2.3.1. Colorazione DAPI

Uno dei primi metodi utilizzati in ambito sperimentale, per la diagnosi dei fitoplasmi, fu l'osservazione al microscopio elettronico e fluorescenza di cellule infette, con il metodo della colorazione DAPI. Il 4',6-diamidino-2-fenilindolo cloridrato (DAPI) è un colorante per la colorazione in fluorescenza appartenente al gruppo dei coloranti

derivanti dall'indolo. Il DAPI veniva e viene tutt'ora impiegato per la colorazione del DNA, dei nuclei di cellule vive e per la controcolorazione in colorazioni in immunofluorescenza. Tuttavia, questo metodo si rivelò non troppo preciso, e venne presto superato da altri metodi diagnostici, come ad esempio quelli sierologici. La colorazione DAPI oggi viene di più utilizzata nella diagnostica cellulare dell'uomo e serve per l'esame istologico di campioni di origine umana.

2.4. DIAGNOSI SIEROLOGICA

La diagnosi sierologica si basa sul fatto che le macromolecole organiche e in particolare le proteine, hanno potere antigenico, ossia se iniettate o immesse in un organismo animale, stimolano la produzione di anticorpi (generalmente indicati con la sigla "Ab" dall'inglese antibody). Questi una volta prodotti da cellule specializzate, dette linfociti, o comunemente conosciute con il termine globuli bianchi, diffondono nel sangue e raggiungono ogni parte dell'organismo e si legano con le sostanze da essi determinate, dette antigeni (Ag), bloccandone così l'eventuale azione patogena o sfavorendone la diffusione. È su tali meccanismi biologici che si basano le reazioni immunitarie, attraverso le quali l'uomo e gli animali possono difendersi da possibili infezioni causate da virus, micoplasmi, batteri o funghi: infatti questi patogeni disponendo di un rivestimento (capside, membrana o parete cellulare) costituito prevalentemente da proteine, determinano la formazione di anticorpi specifici, che si legano poi con gli antigeni precedentemente determinati dal patogeno. Le piante non sono dotate di tessuto linfatico né di sistema sanguigno e non producono anticorpi; quando si parla di sierologia in ambito vegetale, si intendono quindi anticorpi prodotti in un animale da laboratorio (topo o coniglio) nel quale il virus è stato appositamente iniettato. I metodi che possono usare i cosiddetti saggi sierologici sono numerosi e diversificati: la scelta dell'uno o dell'altro dipende dallo scopo che si vuole raggiungere; nel caso specifico dei fitoplasmi particolare rilevanza venne data al metodo ELISA, anche se venne presto superato dai metodi molecolari.

2.4.1. Metodo ELISA

Il termine ELISA deriva dalle iniziali della terminologia inglese: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, ossia saggio immunologico con anticorpi legati ad un enzima.

È un metodo estremamente sensibile capace di rilevare anche piccole quantità di cellule di organismi patogeni, ideato però più specificatamente per patogeni di origine virale. La notevole sensibilità deriva dal fatto che la reazione di combinazione fra virus e anticorpi è resa particolarmente vistosa da un passaggio con colorazione di fosfatasi alcalina (gialla). La reazione è ottenuta in singoli pozzetti di un'apposita piastra, in genere di polistirene, e consta di quattro passaggi fondamentali:

- *Sensibilizzazione della piastra*: anticorpi policlonali diluiti in tampone di sensibilizzazione. Incubazione a 37°C per 2 ore. A cui segue lavaggio.
- *Aggiunta del campione*: estratto grezzo in tampone di estrazione. Incubazione a 4°C per 16 ore. A cui segue lavaggio.
- *Aggiunta del coniugato*: anticorpi mono o policlonali coniugati con fosfatasi alcalina. Incubazione a 37°C per 2 ore. A cui segue lavaggio.
- *Aggiunta del substrato*: aggiunta di p-nitrofenil-fosfato destinato a colorarsi di giallo in presenza di fosfatasi alcalina.

In caso di esito positivo, si otterrà un pozzetto contenente una miscela con colorazione gialla; l'intensità della colorazione è proporzionale alla concentrazione del virus del campione; quindi effettuando la lettura con un adatto fotometro, è possibile ottenere anche un dato di carattere quantitativo. Quanto appena descritto è il metodo classico ELISA, detto anche DAS-ELISA (*Double Antibody Sandwich ELISA*) e nel caso specifico di Flavescenza dorata questa diagnosi sierologica prevede l'assorbimento in piastra di una miscela di anticorpi policlonali e monoclonali per la cattura del patogeno, l'utilizzo di anticorpi specifici (IgM) coniugati alla biotina, quindi di coniugati di streptavidin-fosfatasi e infine il complesso formatosi viene messo in evidenza dall'aggiunta di substrato. L'estrazione di Flavescenza dorata da vite richiede uno specifico tampone pH 8,2 costituito da Tris HCl, detergente Chaps e acido ascorbico.

2.5. DIAGNOSI MOLECOLARE

I metodi di diagnosi molecolare si basano sull'utilizzo della tecnologia del DNA ricombinante, ovvero sull'analisi degli acidi nucleici del patogeno. A differenza dei metodi sierologici si sono rivelati molto utili in quanto dotati di elevata sensibilità e specificità. Tali caratteristiche sono particolarmente appropriate nel caso della

diagnosi dei fitoplasmi della vite, in quanto presenti a basse concentrazioni all'interno dei tessuti della pianta ospite (tubi cribrosi). Questo tipo di diagnosi prevede vari metodi che si sono poi affinati e sviluppati sempre più nel corso degli anni.

2.5.1. Ibridazione molecolare

Uno di questi metodi è proprio l'ibridazione molecolare; un fenomeno che peraltro avviene in natura ogni volta che una doppia elica di DNA o RNA si forma da due eliche singole, complementari l'una all'altra. In ambito ricercativo l'ibridazione molecolare si basa sull'utilizzo di sonde; ovvero di sequenze nucleotidiche marcate con fosforo radioattivo (sonde calde) oppure con biotina o digossigenina (sonde fredde, non radioattive). Queste vengono opportunamente preparate al fine di rilevare la presenza di acido nucleico complementare, detto target, in un estratto di acidi nucleici provenienti da una pianta infetta; presuppone quindi la conoscenza della sequenza di una parte del DNA del patogeno. La reazione di riconoscimento, detta per l'appunto ibridazione, da parte della sonda di una sequenza omologa presente nell'estratto di DNA, depositato su una matrice solida (membrana di nylon o cellulosa), in genere carica positivamente, indica la presenza di fitoplasmi nella vite dalla quale l'estratto è stato ottenuto. Possiamo quindi schematizzare i passaggi sopra descritti in quattro momenti principali:

- Immobilizzazione delle catene di DNA target su membrana di cellulosa o nylon.
- Ibridazione con sonde marcate con digossigenina o fosforo radioattivo. Le sonde si legano ai corrispondenti nucleotidi.
- Aggiunta di anticorpi anti-digossigenina coniugati con fosfatasi alcalina.
- Rilevamento della reazione con reattivi chemiluminescenti o colorimetrici.

I risultati più rilevanti per la diagnosi di Flavescenza dorata mediante sonde molecolari sono stati ottenuti da Daire et al. (1992) utilizzando come sonda frammenti specifici, per il fitoplasma agente di Flavescenza dorata, di DNA marcato radioattivamente. Queste sonde sono state utilizzate in esperimenti su campioni di vite da campo, ma a causa del basso titolo dei fitoplasmi in questa pianta, è stato necessario effettuare dispendiose operazioni di arricchimento degli estratti prima di sottoporli a ibridazione.

2.5.2. Amplificazione genica: PCR (polymerase chain reaction)

L'introduzione della tecnica PCR ha portato notevoli vantaggi per l'individuazione dei fitoplasmi in vite e in particolare di quelli responsabili di Flavescenza dorata. Si tratta infatti di una tecnica estremamente efficiente, in grado di rilevare piccole quantità di DNA e di mettere in evidenza differenze nel genoma dei diversi fitoplasmi. La specificità nel rilevamento di tali differenze viene ulteriormente migliorata attraverso l'analisi del polimorfismo della lunghezza dei frammenti di restrizione nota come RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), che vedremo più avanti. La PCR è una tecnica molecolare che permette di ottenere un numero elevato di copie di un frammento di DNA grazie all'attività di un enzima detto *Taq* polimerasi, ottenuto da un microrganismo termofilo, *Thermus aquaticus*. La specificità di tale sintesi è assicurata dalla presenza, nel composto di reazione, di primers (brevi sequenze di DNA che iniziano la reazione) all'interno dei quali l'enzima *Taq* polimerasi procederà a sintetizzare un frammento di DNA specifico, detto amplicone: nel caso dei fitoplasmi della vite ciò avviene solamente quando questi primers riconoscono una sequenza genica appartenente al fitoplasma corrispondente. Per far sì che ciò accada occorre inizialmente separare le catene di DNA del target portando la temperatura a 94°C, segue poi una seconda fase in cui la temperatura viene abbassata a 50°C per permettere ai primers di appaiarsi ai rispettivi target e infine una terza fase, a 72°C, in cui si dà avvio alla sintesi della nuova catena di DNA, che andrà a formare l'amplicone. Queste tre fasi che costituiscono il cuore della PCR vengono ripetute per un numero variabile di cicli compreso tra 30 e 40, dopo dei quali si ottengono miliardi di copie di DNA. In pratica questa tecnica è in grado di produrre un numero così alto di copie di DNA, relativo al fitoplasma designato che, anche nel caso in cui questo sia presente in bassa concentrazione, possa essere individuato. Il risultato di ogni reazione di amplificazione genica viene visualizzato mediante corsa elettroforetica in gel di agarosio e colorazione in bromuro di etidio.

Per quanto riguarda i primers utilizzati per la diagnosi di Flavescenza dorata, essi possono essere distinti in primers universali e specifici. I primi sono in grado di amplificare un tratto di DNA di tutti i fitoplasmi, i secondi, invece, amplificano un tratto di DNA specifico dei fitoplasmi appartenenti al gruppo tassonomico per il quale

i primers sono stati appositamente progettati. Al giorno d'oggi l'identificazione dei fitoplasmi si basa soprattutto sulle informazioni relative alla sequenza del gene ribosomico 16S. Purtroppo la positività di un campione vegetale al saggio PCR non permette la diretta collocazione tassonomica del fitoplasma individuato, ma fornisce solo indicazioni sulla presenza del patogeno nel campione vegetale saggiato; per tipizzare il fitoplasma individuato nel campione è necessaria l'applicazione di un ulteriore saggio chiamato analisi RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

2.5.3 Nested-PCR

La nested-PCR, detta anche PCR indiretta, è una modificazione della reazione di amplificazione genica precedentemente descritta, progettata per incrementare la specificità e la sensibilità di quest'ultima. Nella nPCR sono previste due successive reazioni di amplificazione utilizzando due coppie specifiche di primers. Nella prima amplificazione (prima PCR) si utilizza una coppia di primers più esterni al frammento di DNA da amplificare. Nella seconda amplificazione (seconda PCR) si utilizza una coppia di primers che amplificano un frammento interno a quello amplificato nella prima reazione. In pratica, una frazione del prodotto amplificato nella prima PCR viene trasferito in una seconda provetta contenente una nuova miscela di reazione, uguale alla precedente per tutti i componenti ad eccezione dei primers. Nella prima ci sono poche copie di sequenza bersaglio in un "background" di DNA complesso e abbondante, mentre nella seconda PCR il numero di sequenze bersaglio è maggiore e il "background" è significativamente ridotto.

2.5.4. Amplificazione RFLP

L'analisi RFLP, analisi del polimorfismo della lunghezza dei frammenti di restrizione, detta anche CAP (*Cleaved Amplified Polimorphism*), è una tecnica che sfrutta la capacità di alcuni enzimi, detti per l'appunto enzimi di restrizione, di tagliare gli acidi nucleici in corrispondenza di specifiche sequenze di basi azotate producendo in tal modo frammenti di lunghezze specifiche per ogni molecola di acido nucleico digerito. I frammenti originati dal taglio enzimatico vengono separati solitamente in gel di poliacrilammide producendo profili tipici di ogni specifico raggruppamento tassonomico. In definitiva facendo seguire un'analisi del polimorfismo della

lunghezza dei frammenti di restrizione (RFLP) ad un'amplificazione genica, è possibile ottenere un'informazione completa riguardo alla specie o addirittura al ceppo del patogeno responsabile.

3. VETTORE DI FLAVESCENZA DORATA: *Scaphoideus titanus*

3.1. CENNI DI MORFOLOGIA E SISTEMATICA

S. titanus Ball, è una cicalina originaria dell'America Settentrionale appartenente all'ordine dei Rincoti, anche detti Emitteri, e alla famiglia Cicadellidae ed è stata introdotta accidentalmente in Europa negli anni '60, con buone probabilità, attraverso uova svernanti contenute nel ritidoma di talee. È il principale e per quanto sappiamo finora, unico vettore di Flavescenza dorata, della quale riesce a trasmettere l'agente patogeno, attraverso il suo apparato boccale da una pianta all'altra. La caratteristica che rende questo insetto particolarmente pericoloso è di essere strettamente ampelofago, vive cioè unicamente a spese della vite.

Tab. 3 - Classificazione di *S. titanus*

<u>Classificazione scientifica</u>	
<u>Ordine</u>	Rhynchota
<u>Sottordine</u>	Homoptera
<u>Sezione</u>	Auchenorrhyncha
<u>Famiglia</u>	Cicadellidae
<u>Sottofamiglia</u>	Deltocephalinae
<u>Genere</u>	<i>Scaphoideus</i>
<u>Specie</u>	<i>S. titanus</i>

In generale, il corpo, come in tutti gli insetti, è suddiviso in tre regioni principali: capo, torace e addome. Nel capo è collocato l'apparato boccale, di tipo pungente succhiante, costituito da vari pezzi detti gnati; i principali, che causano ferite alla pianta sono quattro stilette, tenuti a riposto nel rostro o labbro inferiore: due

mandibolari e due mascellari. L'unione degli stiletto mascellari dà luogo alla formazione di due canali, di cui uno (dorsale) per l'ingestione alimentare e l'altro (ventrale) per l'iniezione della saliva. Questa distinzione apparentemente solo morfologica è di fondamentale importanza, dato che l'immissione di saliva da questo secondo canale coincide con l'iniezione del patogeno, che si è precedentemente replicato all'interno dell'insetto.

Il torace è suddiviso in 3 segmenti, protorace, mesotorace e metatorace. Esso ricopre importanza tassonomica sia nella conformazione del dorso, o noto, che del ventre o sterno. Ciascun segmento porta un paio di zampe, le ali sono invece situate nel mesotorace e metatorace. Quest'ultime sono sempre presenti e sviluppate, pur essendo presenti casi di brachitterismo o microtterismo. Quelle anteriori sono dette tegmine e possono avere consistenza più o meno coriacea; le posteriori sono sempre membranose.

L'addome è costituito da undici segmenti o uriti di cui i primi due solitamente contengono gli organi per la produzione di suoni, l'ottavo e il nono, nelle femmine, e solamente il nono nei maschi, portano gli organi genitali esterni; ovopositore per le prime, organo riproduttore per i secondi. All'interno dell'addome si trova il sistema digerente, che presenta caratteristiche peculiari in quanto questi insetti, detti anche fitomizi, si nutrono esclusivamente di cibi liquidi.



Fig. 1 - Adulto e ninfa di *S. Titanus* (foto di L. Torres, Vila Real 2001)

3.2. CICLO BIOLOGICO E DANNI

S. titanus è un insetto a metamorfosi eterometabolica, ovvero le forme giovanili sono molto simili all'adulto definitivo, la cui vita, dopo la schiusura dell'uovo, passa attraverso cinque stadi giovanili. I primi due stadi sono detti di "neanide" e i restanti tre di "ninfa"; questi ultimi si distinguono dai primi per la presenza sul torace degli abbozzi alari.

Il ciclo biologico si svolge per lo più nella fase primaverile-estiva, *S. titanus*, come già accennato, vive prevalentemente nell'agroecosistema vigneto e svolge una sola generazione all'anno, da qui detta anche specie monovoltina. Lo svernamento avviene prevalentemente allo stadio di uovo, sebbene può capitare che a svernare siano le forme giovanili o gli adulti, riparati in inverno su piante sempreverdi, in attesa di condizioni ambientali favorevoli. Le uova vengono deposte quasi esclusivamente nel ritidoma dei tralci di due o più anni. Le schiusure, scalari nel corso dell'estate, iniziano generalmente verso la metà di maggio, con ampie variazioni (anche di 15 giorni) a seconda delle annate e degli ambienti viticoli.

I danni diretti causati da *S. titanus* sono di scarsa entità, e si manifestano generalmente con piccole necrosi o alterazioni cromatiche sui germogli o sulle nervature dovute alle punture di suzione e all'azione leggermente tossica della saliva. Il danno più grave, fulcro per altro di questo lavoro, è di tipo indiretto e consiste proprio nella trasmissione dell'agente patogeno di Flavescenza dorata, il fitoplasma 16SrV, che vedremo in dettaglio più avanti.

3.3. LOTTA E MONITORAGGIO

Il rilevamento della comparsa delle prime neanidi assume una grande importanza perché consente di valutare l'inizio del rischio di trasmissione della Flavescenza dorata. I primi campionamenti devono essere effettuati sui polloni alla base delle piante, dove tendono a localizzarsi le forme giovanili dell'insetto. L'osservazione diretta fornisce informazioni precise sull'epoca di comparsa e sulla densità di popolazione dello *S. titanus*. Il campionamento viene normalmente effettuato mediante trappole cromotropiche gialle, collocate in corrispondenza della fascia in cui è maggiore la vegetazione; queste sono da sostituire ogni 10-15 giorni e da posizionare

a 1-2 m di altezza, in genere vengono utilizzate 5 o 6 trappole ad ettaro. Le trappole sono importanti per rilevare la presenza della cicalina ma non forniscono indicazioni circa la sua densità. In alternativa per un riscontro immediato riguardo la presenza dell'insetto si può utilizzare un comune retino entomologico. Per gli stadi giovanili, vista la loro particolare localizzazione è consigliabile un monitoraggio mediante osservazione visiva dei succhioni o delle foglie basali dei germogli lungo i cordoni permanenti delle viti (a partire dalla metà di maggio), anche se non è escluso anche in questo caso l'utilizzo delle trappole cromotropiche. Dalle osservazioni di campo e dalle prove sperimentali effettuate nel corso degli anni è emerso che *S. titanus* è molto sensibile ai trattamenti insetticidi. I principi attivi che hanno dimostrato efficacia contro la cicalina possono essere raggruppati in:

- prodotti neurotossici, efficaci sia contro gli stadi giovanili che contro gli adulti;
- prodotti regolatori di crescita, inibitori della biosintesi della chitina, efficaci solo nei confronti degli stadi giovanili;
- prodotti biologici.

Per quanto riguarda i prodotti neurotossici, come gli esteri fosforici, è stato evidenziato che bastano due trattamenti nell'arco di una sola estate per portare le popolazioni a livelli molto bassi indipendentemente dalla formulazione. Per la lentezza di azione, gli insetticidi chitino-inibitori non sono consigliabili da soli nelle strategie di controllo nei primi anni di forte espansione della Flavescenza dorata dove è necessario l'abbattimento veloce del vettore su una superficie estesa. Per quanto riguarda i vigneti a conduzione biologica è stata confermata l'efficacia dei trattamenti con piretro naturale e con l'aggiunta di piperonil butossido a patto che vengano rispettate alcune norme importanti, quali i trattamenti nelle ore serali con elevati volumi d'acqua.

4. FLAVESCENZA DORATA

4.1. CARATTERISTICHE GENERALI

La Flavescenza dorata, è una forma di giallume della vite, a forte carattere epidemico, causata da fitoplasmi e trasmessa in natura dalla cicalina *S. titanus* Ball. Flavescenza dorata e le altre forme di giallume, come il Legno nero, mostrano una sintomatologia molto simile tra loro, rendendo così impossibile riconoscerle solamente sulla base dei sintomi. Tuttavia alcune piccole differenze ci sono: nel caso di Legno nero, ad esempio, la diffusione della malattia in campo avviene in forma meno epidemica rispetto a Flavescenza dorata e interessa, spesso, piante isolate nel vigneto. I sintomi di Flavescenza dorata si manifestano generalmente l'anno successivo a quello dell'infezione; possono verificarsi nel corso dello stesso anni nel caso in cui le piante vengano inoculate precocemente oppure in regioni dal clima caldo, caratterizzate da una prolungata stagione vegetativa.

La Flavescenza dorata è stata per lungo tempo ritenuta una malattia a eziologia virale come del resto le altre fitoplasmosi. A partire dal 1972, quando Caudwell e colleghi dimostrarono che Flavescenza dorata è una malattia causata da fitoplasmi, numerosi sono stati i tentativi per giungere all'isolamento e alla coltivazione in vitro dell'agente responsabile. È stato però solo grazie all'impiego delle tecniche di biologia molecolare che ha permesso di dimostrare che Flavescenza dorata e Legno nero sono associate a fitoplasmi geneticamente differenti e che la prima è associata a fitoplasmi appartenenti a due sottogruppi tassonomici indicati come 16SrV-C e 16SrV-D, entrambi riuniti sotto il nome di *Candidatus Phytoplasma vitis*. La caratterizzazione molecolare dei fitoplasmi finora individuati, e l'assegnazione degli stessi a una delle sopracitate categorie tassonomiche, viene effettuata tramite l'amplificazione genica (PCR) e la successiva analisi del polimorfismo della lunghezza dei frammenti di restrizione (RFLP) del gene ribosomico 16S. Sebbene in questi ultimi anni gli studi sull'eziologia di Flavescenza abbiano fornito numerose informazioni, resta ancora molto da indagare riguardo il ruolo dei diversi fitoplasmi riscontrati finora in vite.

Infine, fra gli aspetti di Flavescenza dorata che suscitano notevole interesse vi è il fenomeno del risanamento delle piante malate che a livello internazionale viene riportato con il termine “*recovery*”; cioè della scomparsa spontanea dei sintomi. Questo fenomeno, facilitato dai trattamenti contro il vettore che riducono le continue

reinfezioni alle piante, permette spesso di poter convivere con la malattia. Si tratta di un comportamento osservato in misura frequente sia in Francia che in Italia e riscontrato in misura differente in quasi tutte le varietà di *Vitis vinifera*.

4.2. SINTOMATOLOGIA E DANNI

In generale la comparsa di una nuova patologia viene sempre contraddistinta dalla presenza di specifici sintomi che le piante ammalate riescono a mettere in evidenza. Questa risulta maggiormente percepibile quanto più intensa e marcata è la reazione che la pianta è in grado di manifestare. I sintomi sono quindi l'immediata risposta che l'individuo, in questo caso le piante, mette in atto attraverso un'azione di causa/effetto e che si esprime con alterazioni di tipo fisiologico. Queste si possono manifestare direttamente sugli organi attaccati e danneggiati dal parassita o anche indirettamente su quelle parti della pianta che subiscono i danni più vistosi, in quanto dotate di maggiore suscettibilità. La presenza dei giallumi della vite, e in particolare di Flavescenza dorata, risulta, in genere, di facile percezione, grazie alla peculiarità dei sintomi, che si contraddistinguono chiaramente da quelli causati da altre avversità di tipo biotico e abiotico. Le malattie da fitoplasmi si manifestano attraverso varie forme, che vanno dai deperimenti gravi ed estesi a tutta la pianta, alle alterazioni attenuate e circoscritte solo alle foglie di qualche tralcio. I sintomi sono la conseguenza dei danni subiti dal floema e dal cambio dei tralci e del tronco; ciò dipende dal fatto che i fitoplasmi intervengono sull'equilibrio ormonale della pianta, privilegiando la fase vegetativa a quella riproduttiva. L'agente patogeno invade i tessuti conduttori floematici (le nervature, i piccioli fogliari, i tralci), generando la disgregazione del sistema vascolare discendente e interrompendo la continuità dei tubi linfatici e dei tessuti midollari. L'alterazione del floema provoca l'accumulo di amidi nelle foglie, blocca la migrazione delle sostanze elaborate e progressivamente impedisce il nutrimento dell'uva, dei tralci e del fusto. La manifestazione dei sintomi di giallume, osservati su viti dell'ibrido "Baco 22 A", permise nel 1924 a Ravaz e Verge di attribuire il nome di "flavescence", letteralmente "biondeggiante", alla nuova malattia che comparve per la prima volta in vigneti del Sud-Ovest della Francia. La definizione di "flavescence dorée" venne attribuita nel 1957, da Caudwell e allievi, per meglio specificare la patologia che si stava allora diffondendo in alcuni vigneti francesi.

4.2.1. Sintomi su foglie

La presenza delle fitoplasmosi, nel nostro caso di Flavescenza dorata, generalmente si rende evidente osservando l'apparato fogliare: sulle viti ammalate i sintomi compaiono generalmente verso l'inizio dell'estate e tendono gradualmente ad accentuarsi con l'avanzare della stagione vegetativa, risultando inconfondibili in settembre e ottobre. Tuttavia sulle cultivar più suscettibili possono comparire già nel mese di maggio, quando possono manifestarsi necrosi e disseccamenti a carico degli apici vegetativi e dei grappolini appena formati. Le alterazioni più caratteristiche cominciano a comparire verso la metà di luglio, quando iniziano ad evidenziarsi i tipici sintomi fogliari, i quali consistono in un ripiegamento e arrotolamento della lamina verso la pagina inferiore ed un'intensa e disforme colorazione della stessa, che diventa giallo-vivo per le varietà a uva bianca e rosso-intenso e vivace nelle varietà a bacca nera. In entrambi i casi si evidenzia una particolare lucentezza con riflessi metallici sulla pagina superiore, favorendo il tipico aspetto "flavescente". L'alterazione cromatica può interessare tutta la foglia, oppure può rimanere limitato ad alcune zone di varia estensione, che restano definite dalle nervature primarie o secondarie, le quali si colorano intensamente e con varia tonalità in funzione del vitigno.

Quest'ultimo è un aspetto molto importante che serve a contraddistinguere la Flavescenza dorata dalla virosi GLRaV (Grapevine Leafroll associated Virus), conosciuta come accartocciamento della vite, nella quale le nervature non vengono intaccate da ingiallimenti o alterazioni cromatiche, inoltre in presenza di virosi si è notato che sono le foglie più vecchie ad andare incontro a rossori o ingiallimenti.



Fig. 2 - Aspetto “flavescente” e ripiegatura lamina su Chardonnay (foto di Mauro Jermini, Agroscope)



Fig. 3 - Arrossamenti e ripiegature dei lembi su bacca nera (foto presa da Gazzetta d'Alba, Langhe 2019)

4.2.2 Sintomi su tralci

I tralci ammalati assumono una colorazione verde sbiadito, tendente al grigio-verdastro. Nei casi gravi rimangono erbacei, di consistenza spugnosa e gommosa;

presentano uno sviluppo ridotto accompagnato a volte da andamento a zig-zag. Per effetto della ridotta lignificazione diventano molli e flessuosi con comportamento ricadente. In tali situazioni si formano spaccature longitudinali con suberificazioni abbastanza estese lungo gli internodi. In alcune varietà il parenchima corticale dei tralci colpiti risulta ricoperto da piccole e numerose se pustole dall'aspetto oleoso, che emergono vistosamente dall'epidermide. Inizialmente esse si presentano di colore verde intenso, mentre in seguito assumono una tonalità bruna e poi necrotizzano, similmente i tralci, essendo più sensibili al gelo, durante l'inverno necrotizzano e assumono una colorazione nerastra.



Fig. 4 - Tralci colpiti da piccole e numerose pustole, mancata lignificazione dei tralci (sinistra, regione autonoma Friuli Venezia Giulia; sito web ERSA. Destra sito web del S.F.R. dell'Emilia Romagna)

4.2.3. Sintomi su grappoli

I grappoli possono manifestare una variabilità di sintomi, che vanno dall'appassimento delle infiorescenze, all'aborto florale, al disseccamento dei raspi e all'avvizzimento dell'uva. L'intensità dei sintomi e la gravità del danno variano in relazione all'epoca di comparsa dei sintomi e allo stadio fenologico della vite; essi sono inoltre collegati all'intensità delle anomalie presenti sulle foglie e sui tralci. In presenza di sintomi

precoci, la malattia provoca un grave deperimento su tutta la vegetazione, danneggiando gravemente anche le infiorescenze.

Nel caso in cui la malattia manifesti i primi sintomi a partire dalla fioritura, si può avere l'aborto dei fiori: il raspo, si secca interamente e può rimanere attaccato al tralcio per un breve periodo, oppure si stacca quando non ci sono più acini allegati. Se invece la malattia comincia a manifestarsi dopo l'allegagione, i grappoli colpiti rimangono attaccati al tralcio: il rachide appare disteso, di colore violaceo e può presentare mutilazione di alcune sue parti. Le bacche tendono in genere a raggrinzire oppure, con il passare del tempo, seccano e cadono in maniera graduale e con intensità variabile, iniziando spesso dalle porzioni più distali del grappolo. L'uva, che si mantiene fino all'epoca di vendemmia, si presenta acerba e non è idonea alla vinificazione, poiché il succo è aspro e privo di zuccheri. In tal modo gran parte della produzione di uva viene compromessa.

Il danno economico, nelle cultivar più sensibili, può essere di notevole importanza, in quanto si può avere la perdita totale o di gran parte della produzione. Proprio intorno alla fine degli anni '90, quando si verificò l'ultima grave epidemia nel Nord Italia, in particolare Piemonte, Veneto e Lombardia, in alcuni vigneti l'incidenza della malattia raggiunse punte dell'80-90%, determinando perdite, nella produzione totale, superiore al 50%. Ovviamente il danno risulta tanto maggiore quanto più sensibile è la cultivar interessata. A tal proposito è importante ricordare che la sensibilità varia parecchio all'interno delle diverse varietà. Ve ne sono alcune particolarmente sensibili come le cultivar Barbera, Chardonnay, Garganega, Pinot grigio, Sangiovese, Trebbiano veronese; altre però come ad esempio Moscato bianco e Cortese, che risultano piuttosto tolleranti e che quindi difficilmente subiscono danni importanti.



Fig. 5 - Appassimento del grappolo durante la fase di maturazione su Chardonnay (foto presa da IASMA notizie Notiziario tecnico del Centro Trasferimento Tecnologico della Fondazione Edmund Mach - Istituto Agrario di S. Michele all'Adige)



Fig. 6 - Sintomi precoci: disseccamento totale del grappolo (foto presa da IASMA notizie, Notiziario tecnico del Centro Trasferimento Tecnologico della Fondazione Edmund Mach - Istituto Agrario di S. Michele all'Adige)

4.3. ALTERAZIONI IMPUTABILI AD ALTRE CAUSE

Manifestazioni sintomatologiche simili a quelle dei giallumi possono presentarsi a seguito di altre fitopatologie, parassiti o danni meccanici e potrebbero essere confusi con quelli imputabili a Flavescenza dorata. Spesso, vedendo per la prima volta piante affette da giallumi o da rossori molto vistosi, capita che si sia indotti a fare diagnosi non esatte, in quanto non si conoscono perfettamente i sintomi causati da altre malattie della vite. Alcune patologie virali, come accennato per l'accartocciamento fogliare, possono presentare sintomi che in parte assomigliano a quelli causati dai fitoplasmi. Andiamo quindi ad elencare sommariamente le sintomatologie di alcune virosi della vite e che in parte possono essere confuse con quelli di Flavescenza dorata e altri giallumi.

1) La virosi del *Giallume infettivo* o *Arricciamento della vite*, nota come GFLV (Grapevine Fanleaf Virus) è data da un virus isometrico appartenente al genere dei Nepovirus, assai diffuso in tutto il mondo. Le foglie delle piante ammalate presentano giallumi nervali e/o perinervali sia su varietà a uva bianca, sia su quelle a bacca nera. Le foglie mostrano vistose deformazioni con seni peziolari aperti, nervature primarie ravvicinate (prezzemolatura), bordi arricciati con denti molto pronunciati. Il danno sui grappoli si manifesta con acinellatura a volte molto forte e con irregolare crescita delle bacche. I tralci possono presentare fasciazioni, biforcazioni, nodi doppi, internodi irregolari, appiattimento degli internodi, andamento a zig-zag, spostamento dei viticci. Questo complesso virale, si trasmette mediante propagazione di materiale viticolo infetto o mediante nematodi vettori di virus presenti nel terreno, dovrebbe invece essere assente sui nuovi impianti costituiti con materiale di categoria "certificato".

2) La virosi dell'*Accartocciamento fogliare*, considerata una delle più importanti malattie da virus della vite e ampiamente diffusa in tutti gli ambienti viticoli del mondo, si caratterizza per la presenza di sintomi che manifestano arrossamenti o giallumi della lamina fogliare. La malattia, causata da un complesso virale comprendente vari closterovirus associati alla vite (Grapevine Leafroll associated Virus: GLRaV), è trasmissibile mediante l'uso di materiali di moltiplicazione viticola infetti o tramite attacchi di insetti vettori, prevalentemente le cocciniglie. A differenza di quanto si verifica in piante affette da Flavescenza dorata, le foglie sintomatiche presentano le nervature e gli spazi perinervali sempre verdi, i tralci raggiungono una

maturazione normale, i grappoli non risultano danneggiati, mentre l'uva tarda a maturare con gran parte degli acini che rimangono ancora verdi. Sulle piante ammalate i sintomi dell'accartocciamento si presentano ogni anno e possono essere osservati fin dal primo anno di impianto, come pure in vivaio. L'intensità dei sintomi e l'epoca di comparsa variano in funzione dei vitigni e degli ambienti di coltivazione della vite.

3) La disaffinità d'innesto è un'altra malattia da virus, scoperta recentemente, in grado di provocare sintomi assimilabili a quelli dei fitoplasmi. È causata dalla presenza di un closterovirus (GLRaV-2), microrganismo patogeno che, oltre a provocare sintomi di accartocciamento fogliare, risulta coinvolto anche nella complesso del *Legno riccio della vite*. Il danno può diventare molto grave, in quanto innestando marze di piante virosate su portinnesti sensibili, si può assistere alla improvvisa comparsa di alterazioni cromatiche su tutto il fogliame, a cui si accompagna un progressivo deperimento dell'intera pianta fino a provocarne la morte nei casi fitopatologici più gravi.

4) La suberosi corticale o "corky bark" è una delle quattro sindromi coinvolta nel complesso del *Legno riccio della vite* oltre a butteratura del legno di *Vitis rupestris* (RSP= *Rupestris stem pitting*), scanalatura del Kober 5BB (KSG= *Kober stem grooving*) e scanalatura dell'ibrido LN33 (LNSG= *LN stem grooving*). Le piante ammalate mostrano una ridotta ripresa vegetativa, accompagnata da forte ritardo di germogliamento; le foglie dei tralci colpiti manifestano colorazioni anomale, caratterizzate da ingiallimenti su varietà a uva bianca e da arrossamenti su quelle a uva nera e da un inizio di arrotolamento del lembo verso le pagine inferiori. La malattia colpisce anche i tralci, che rimangono erbacei o poco lignificati, elastici e con portamento cadente. La vigoria vegetativa risulta ridotta, comportando una scarsa produzione di uva, che matura irregolarmente.

5) Legno nero, altra fitoplasmosi, che sostanzialmente presenta lo stesso quadro sintomatologico di Flavescenza dorata; ingiallimenti o arrossamenti fogliari, mancata lignificazione dei tralci, che assumono in inverno colorazione molto scura, da cui il nome e raggrinzimento delle bacche o ritardo nella maturazione. Le differenze sostanziali riguardano eziologia ed epidemiologia ovvero le cause che scaturiscono le due patologie e il modo in cui si diffondono.

6) Attacchi da parte di *Armillaria mellea*. *A. mellea* è un fungo parassita di diverse specie di piante che provoca marciume radicale e che porta al deperimento e alla morte della pianta. Le foglie assumono una colorazione rosso acceso, facilmente confondibile con rossori da fitoplasmosi.

7) Attacco di *Stictocephala bisonia* anche detta *Cicalina buffalo*. La *S. bisonia* è, per l'appunto, una cicalina che attraverso la suzione o l'ovideposizione può danneggiare i tralci della vite provocando strozzature e blocco del passaggio della linfa elaborata. Al di sopra delle strozzature le foglie di vite assumono una colorazione rossastra o giallastra e si accartocciano in modo simile a quanto succede negli attacchi di Flavescenza. Se si vedono sintomi sulla parte apicale dei rami, soprattutto femminelle, è importante verificare che sul tralcio non siano presenti danni meccanici.

8) Alterazioni abiotiche. Nei sistemi colturali della vite si possono a volte verificare danni sulle piante dovuti a interventi meccanici o a squilibri fisiologici, che possono dare origine a sintomi simili a quelli provocati dai fitoplasmi. Non sono rari i casi in cui le viti portano strozzature o lesioni corticali a livello dei tralci e del fusto per traumi meccanici. Altri danni possono essere provocati da forti colpi di vento e sono più ricorrenti alla base dei tralci e in prossimità di biforcazioni e dei nodi. In corrispondenza degli organi lesionati si generano modificazioni morfologiche nel sistema vascolare, con conseguente alterazione del soprastante apparato vegetativo, il quale può portare foglie con arrossamenti o ingiallimenti, arrotolamento del lembo, scarsa e irregolare lignificazione dei tralci, anomalie della maturazione dell'uva.

Altre manifestazioni di tipo anomalo possono insorgere a seguito di carenze nutrizionali, indotte per effetto di assenza o di scarsa disponibilità degli elementi nutritivi necessari alla pianta. Tra i fenomeni di carenza, in grado di indurre sintomi assimilabili a quelli dei giallumi, troviamo la carenza di potassio. Questa provoca un rallentato sviluppo della vite e una scarsa lignificazione dei tralci; nei casi più gravi causa alterazioni cromatiche sulle foglie, che corrispondono a ingiallimenti o arrossamenti più accentuati lungo i bordi, che poi finiscono per necrotizzare e seccare.

In conclusione, la corretta diagnosi visiva dei sintomi della Flavescenza e in generale di altre patologie, richiede sempre una adeguata preparazione tecnica del personale, al fine di evitare possibili confusioni con altre malattie della vite. Questa comporta la necessità di ispezionare con attenzione tutta la pianta ammalata e non

alcune foglie. Inoltre ricordiamo che la sola diagnosi visiva non è certamente un buon metodo per accertarsi se si è in presenza di Flavescenza dorata o di altre patologie, ma è solo un primo passo, nel caso in cui tutti i sintomi facciano pensare ad una specifica patologia, a cui deve seguire poi un saggio in laboratorio.

4.4. EZIOLOGIA E DIAGNOSI

Come accennato nell'introduzione, la Flavescenza dorata è una forma di giallume della vite, a forte carattere epidemico, causata da fitoplasmi appartenenti al gruppo tassonomico V (del "giallume dell'olmo" o "Elm Yellows") e trasmessa in natura dalla cicalina *S. titanus* Ball. In particolare sia i fitoplasmi del sottogruppo 16SrV-C sia quelli del sottogruppo 16SrV-D risultano in grado di determinare la malattia.

Per quanto riguarda la diagnosi di Flavescenza dorata sono stati messi a punto alcuni protocolli nei quali il prodotto della reazione di amplificazione genica (PCR) viene sottoposto a una reazione di ibridazione mediante sonde marcate. In altre parole, si tratta di utilizzare come DNA bersaglio (target) per l'ibridazione molecolare il prodotto della PCR, ottenuto mediante primers specifici. I metodi diagnostici più diffusi al giorno d'oggi utilizzano le tecniche di PCR che, attuate con opportune varianti, permettono di ottenere risultati altamente affidabili, raggiungendo livelli di sensibilità notevolmente più alti rispetto a quelli ottenuti con altre metodologie come l'ELISA o l'ibridazione molecolare stessa. La PCR è infatti potenzialmente in grado di rilevare la presenza di quantità di acido nucleico bersaglio, ovvero del patogeno, pari a pochi femtogrammi (10^{-15}): sebbene livelli di sensibilità così elevati, sono per ora difficilmente raggiungibili, la PCR è comunque da considerare una tecnica molto affidabile nonostante sia ancora piuttosto costosa.

4.4.1. Metodi diagnostici innovativi

La ricerca in campo diagnostico, negli ultimi trent'anni, ha prodotto notevoli risultati e i metodi, sia sierologici che molecolari, sono piuttosto numerosi e già descritti nel capitolo 2. Tuttavia meritano di essere menzionati altri due protocolli diagnostici che hanno avuto notevole successo tra le tecniche innovative per la diagnosi dei fitoplasmi; la Real-time PCR e il DNA microarray. La Real-time PCR si basa sull'utilizzazione di un sistema combinato di reazioni la prima delle quali è appunto la PCR, seguita

dall'ibridazione da parte di una sonda, di poche decine di basi, alla quale vengono legate molecole fluorogeniche, dette fluorofori. La funzione dei fluorofori è di segnalare il riconoscimento da parte della sonda, del frammento di DNA appartenente al fitoplasma per il quale sono state designate. Sebbene questa tecnica venga utilizzata da anni in altri settori della diagnostica, solo recentemente essa è stata utilizzata per la diagnosi delle fitoplasmosi della vite, e rappresenta una evoluzione della PCR convenzionale che sfrutta un sistema ottico per il rilevamento della fluorescenza fissato su un normale termociclatore. Tale tecnica è definita "Real-time" dal momento che permette di seguire in tempo reale la produzione dell'amplicone a partire dal DNA di partenza, anche detto template, e PCR quantitativa, poiché consente di misurare la quantità di DNA bersaglio presente all'interno del campione analizzato prima della reazione. La variazione della fluorescenza avviene a ogni ciclo di amplificazione grazie alla presenza all'interno della miscela di reazione di un sistema di generazione di fluorescenza che può essere aspecifico ("SYBR® Green") o specifico ("TaqMan"). Nel primo caso abbiamo una molecola fluorescente facente parte del gruppo delle cianine, il SYBR Green per l'appunto, che si intercala alla doppia elica di DNA e in questo stato legato aumenta notevolmente la propria emissione di fluorescenza; con l'aumento delle doppie eliche di DNA prodotte a ogni ciclo dalla reazione PCR aumenta esponenzialmente anche il numero di molecole fluorescenti legate e quindi anche il livello di emissione di fluorescenza. La sonda "TaqMan" invece permette di monitorare in tempo reale l'amplificazione di uno specifico DNA; la specificità del saggio è legata all'impiego nella miscela di reazione di una sonda marcata in posizione 3' e al 5' con due fluorofori diversi, definiti "quencher" (attenuatore) e "reporter". La sonda deve essere complementare a una sequenza collocata all'interno delle posizioni di "annealing" o appaiamento dei due primers utilizzati per l'amplificazione genica. In condizioni di sonda integra i due fluorofori si trovano uno rispetto all'altro a una distanza tale da permettere al quencher di spegnere l'emissione di fluorescenza del reporter. Durante la fase di allungamento della PCR la polimerasi procede sul filamento denaturato aggiungendo nucleotidi sulla base del DNA stampo e a un certo punto incontra la sonda legata alla regione a essa complementare; la polimerasi procede sul filamento distaccando la sonda (*cleavage*) e degradandola mediante la sua attività esonucleasica, questo comporta l'allontanamento dei due fluorofori e

conseguentemente l'emissione di fluorescenza da parte del reporter. L'aumento del livello di emissione di fluorescenza all'interno della miscela di reazione sarà proporzionale all'aumento di specifici ampliconi prodotti e verrà rilevato dal sistema ottico accoppiato al termociclatore.

Fra le tecnologie innovative, troviamo anche la microibridazione su supporto solido, detta anche DNA microarray, utilizzata in via sperimentale per la diagnosi in campo umano e, di recente anche per la diagnosi di fitopatie da virus e fitoplasmi. Si tratta di una nanotecnologia utilizzata esclusivamente nei laboratori di ricerca; è una tecnica che rappresenta una forma di ibridazione in cui centinaia di sonde contenenti informazioni geniche diverse vengono fissate su di un supporto solido, di piccole dimensioni (vetro o silice). La deposizione delle sonde viene eseguita da appositi strumenti che, con estrema precisione, consentono di deporre un numero molto alto (parecchie centinaia) su superfici molto limitate. Il saggio consiste nel "confrontare" l'estratto di DNA di viti da saggiare con le sonde in precedenza depositate sul microchip; esse vengono scelte in modo che contengano tutte le informazioni atte a identificare i fitoplasmi riscontrati. Qualora una o più sonde riconoscano sequenze a esse omologhe, eventualmente presenti nei campioni di vite in saggio, un segnale emesso da molecole fluorogeniche preventivamente legate al DNA bersaglio, indica l'avvenuta reazione. Dato che le sonde vengono deposte sul supporto solido in base a uno schema prestabilito, il segnale indica anche la localizzazione della reazione stessa consentendo così di individuare quale sonda sia coinvolta nella reazione di ibridazione. Un apposito scanner è in grado di trasmettere questo segnale a un computer che, grazie a opportuni programmi di bioinformatica, giunge alla determinazione precisa del fitoplasma riscontrato. I vantaggi che l'impiego di questa nanotecnologia potrebbe apportare alla diagnosi di Flavescenza dorata e delle altre forme di giallume sono molteplici, il primo dei quali è legato alla possibilità di standardizzare il procedimento diagnostico. Un ulteriore vantaggio è rappresentato dalla rapidità con la quale il saggio microarray potrebbe fornire informazioni precise e dettagliate ottenibili solamente mediante il sequenziamento genico, una tecnica difficilmente utilizzabile per la diagnosi su larga scala. Bisogna tuttavia riconoscere che il costo della attrezzature richieste e dei reagenti necessari per lo svolgimento di questi saggi è piuttosto elevato.

4.5. EPIDEMIOLOGIA

L'areale di diffusione della Flavescenza dorata della vite è confinato al continente europeo. La malattia venne segnalata e descritta per la prima volta in Francia, dove causò danni notevoli nelle aree viticole della Guascogna. Nel 1970 venne riportata per la Corsica, ove pare sia stata introdotta nei primi anni '60 in seguito a una importazione di materiale per innesto e barbatelle di vite dal continente francese. In seguito venne riscontrata in tutte le aree viticole del Sud-Ovest della Francia (Borgogna, Jura, Garonna, versante francese dei Pirenei e bassa valle del Rodano). Oltre alla Francia, la Flavescenza dorata è presente in Spagna (Catalogna), Serbia e Italia. Tuttavia l'areale di diffusione della malattia è inferiore a quello del suo vettore; infatti esistono aree, sia in Italia che in Europa, in cui è presente *S. titanus*, ma non ancora la Flavescenza dorata. È proprio in tali aree a rischio (per esempio, parte della Toscana, Friuli-Venezia Giulia o - in Europa - Slovenia, Croazia e Portogallo) che l'azione di lotta preventiva alla malattia deve essere particolarmente attenta.

4.5.1. Trasmissione di Flavescenza dorata

Come sappiamo la Flavescenza dorata si diffonde all'interno del vigneto e in quelli vicini soprattutto per mezzo del suo insetto vettore, la cicalina *S. titanus*. Numerosi lavori sperimentali hanno confermato la capacità vettrice di tale specie che è di tipo persistente-propagativo; ovvero una volta che l'insetto acquisisce il fitoplasma tramite suzione, è in grado di trasmetterlo per tutta la sua vita; si distinguono inoltre tre fasi strettamente interdipendenti:

1) *fase di acquisizione*: si realizza mediante le punture trofiche su piante infette; il tempo di nutrizione necessario varia da 2 a 4 giorni e la capacità di acquisizione da parte dell'insetto è più elevata nelle forme giovanili. Inoltre è possibile anche la trasmissione trans-ovarica da femmine infette alla prole.

2) *fase di latenza*: avviene la moltiplicazione e la diffusione nelle cellule parietali del mesentero dell'insetto, quindi nell'emolinfa poi in organi come tubi malpighiani, ovario e passaggio nelle ghiandole salivari.

3) *fase di inoculazione*: quando la concentrazione delle cellule del fitoplasma ha raggiunto certi valori nelle ghiandole salivari, l'insetto è in grado di trasmetterlo a nuove piante. L'acquisizione di un fitoplasma da parte di un insetto vettore è

condizionata da molti fattori biologici come la specie, il biotipo, l'età e il sesso, dalle caratteristiche della piante sorgente di inoculo, ma anche da fattori ambientali come la temperatura, l'umidità e il fotoperiodo. *S. titanus* può raggiungere livelli di infettività superiori al 30% e può quindi essere considerato un vettore efficiente; nonostante in prove sperimentali si sia riusciti a trasmettere il fitoplasma di Flavescenza dorata anche attraverso altre specie di cicaline, come ad esempio *Orientus ishida* e *Dictyophara europea*, si è convinti che l'unica specie realmente importante ai fini epidemiologici sia proprio *S. titanus*, ed è proprio su questa che si devono concentrare la lotta e il monitoraggio, onde evitare diffusioni non volute.

Oltre che per vettore animale, l'agente causale di Flavescenza dorata può essere trasmesso o, più propriamente, propagato, mediante innesto. Recentemente è stato dimostrato che, impiegando marze prelevate da viti infette, l'efficienza di propagazione di Flavescenza dorata mediante innesto può raggiungere il 16%; l'efficienza di propagazione varia a seconda della cultivar impiegata. Nello stesso esperimento si è inoltre dimostrato che, prelevando il materiale per l'innesto da vigneti "standard" (vigneti a bassa incidenza di Flavescenza dorata) e avendo cura di escludere dal prelievo le viti sintomatiche, l'efficienza di propagazione scende notevolmente, raggiungendo valori massimi del 4‰: questa modalità di trasmissione risulterebbe quindi di scarsa importanza ai fini epidemiologici. Va però detto che la presenza anche di poche piante infette in un vivaio o in un vigneto di nuovo impianto, costituisce una pericolosa sorgente di inoculo, destinata ad espandersi rapidamente nel caso di contemporanei presenza dell'insetto vettore.

Al momento risulta difficile stilare una graduatoria di suscettibilità e di sensibilità a Flavescenza dorata delle diverse cultivar di vite in base alle osservazioni di campo. Si può solo affermare che la malattia interessa sia cultivar bianche che rosse e che alcune di esse (per esempio, Chardonnay) dimostrano costantemente sintomi gravi; questo perché quello che ancora manca è un metodo efficiente di trasmissione del fitoplasma di Flavescenza dorata; un metodo cioè che permetta di effettuare prove comparative di suscettibilità e sensibilità, impiegando cultivar diverse allevate in ambienti omogenei o controllati. Tali differenze tra cultivar sono spesso valutate mediante osservazioni di campo. Questo metodo, indubbiamente valido, non è però sufficiente. Il confronto dell'incidenza, della frequenza e della gravità dei sintomi della

malattia su piante della medesima cultivar, allevate però in condizioni diverse, non può essere considerato universalmente valido.

Un altro aspetto non sufficientemente indagato in ambito epidemiologico è il comportamento del portinnesto. Le osservazioni vengono infatti effettuate nella gran parte dei casi solo sulla cultivar produttrice, dimenticando che la vite è quasi sempre una pianta bimembre. Anche dopo l'avvento delle moderne tecniche diagnostiche, lo studio della Flavescenza a livello del portinnesto è stato trascurato. Non si sa, ad esempio, se e quanto i diversi portinnesti sono suscettibili alla malattia, se sono ospiti asintomatici, se e quanto sono in grado di trasmettere l'infezione alla marza, se vanno incontro a fenomeni di *recovery*. Anche in questo caso, l'assenza di un metodo di trasmissione del fitoplasma di Flavescenza dorata efficiente, rende difficile questo tipo di studi.

4.6. MISURE DI CONTROLLO E DIFESA

Come ormai è ben noto la difesa della vite dalla Flavescenza dorata si basa su interventi e strategie di tipo preventivo. Questi interventi sono diretti essenzialmente verso la pianta e il vigneto e verso il vettore responsabile della diffusione del fitoplasma causale. I criteri che si adottano possono avere priorità diversa a seconda delle zone che si prendono in considerazione; possiamo infatti suddividere queste zone in tre tipi: zone indenni ovvero areali in cui la malattia non si è ancora presentata, zone focolaio, areali in cui la malattia è comparsa di recente ed è limitata a pochi vigneti ed infine zone di insediamento, areali in cui la malattia è ampiamente diffusa. Questa suddivisione non è semplicemente utilizzata a fini didattici e di studio, ma segue il D.M. n. 32442 del 31 maggio 2000, con il quale la lotta alla Flavescenza dorata è stata resa obbligatoria. Tale disposizione individua compiutamente le linee d'intervento, distinguendo ciò che è possibile attuare in aree per l'appunto ancora indenni dalla malattia o aree in cui rappresenta una minaccia reale; come ad esempio le zone focolaio o di insediamento.

4.6.1. Misure da adottare nelle zone ancora indenni

Decreto Ministeriale n° 32442 del 31 maggio 2000 recante

"Misure per la lotta obbligatoria contro la Flavescenza dorata della vite"

Art. 6 Misure fitosanitarie nelle zone indenni:

“Nelle zone indenni da FD i Servizi fitosanitari regionali possono adottare misure fitosanitarie a carattere obbligatorio per prevenire la diffusione della malattia e del suo vettore.”

In queste zone, ancora più che altrove è necessario, evitare l'introduzione di barbatelle infette, tuttavia è di fondamentale importanza vigilare sull'eventuale insediamento di popolazioni di *S. titanus*. La ricerca del rincote, in un'area nella quale non ne è nota la presenza, può basarsi sulla sola ricerca degli adulti. Tale indagine viene normalmente effettuata installando 2-3 trappole cromotropiche gialle invischiata per stazione, nell'epoca di massima presenza degli adulti (da fine luglio a tutto agosto nelle condizioni dell'Italia settentrionale, presumibilmente un po' prima nel resto d'Italia). Le stazioni di monitoraggio vanno possibilmente scelte in vigneti adulti nei quali non vengono eseguiti trattamenti con insetticidi efficaci contro *S. titanus*. Le trappole, collocate all'interno della chioma della vite, vanno raccolte dopo circa 15 giorni dal loro posizionamento. Il monitoraggio delle forme giovanili deve essere effettuato in vigneti non trattati con insetticidi mediante osservazione diretta dei germogli che crescono alla base del tronco della vite.

Per impostare corrette strategie di intervento contro Flavescenza dorata in un determinato territorio, è necessario possedere informazioni non solo sulla diffusione di *S. titanus*, ma anche sulla reale presenza della malattia. Una prima fase d'indagine può essere basata sulla ricerca nel territorio di viti che manifestano sintomi di giallume della vite. A tal fine risulta importante il livello di organizzazione della rete di vigilanza e di assistenza tecnica presente in una zona. Le Autorità fitosanitarie devono procedere a una preventiva sensibilizzazione delle strutture tecniche presenti nel territorio addestrando i tecnici al riconoscimento dei sintomi di Flavescenza e alla loro discriminazione da quelli dovuti ad altre cause. Per dare un significato preciso all'indagine conoscitiva bisogna necessariamente procedere a specifiche analisi di laboratorio in modo da associare il fitoplasma causale alla sindrome osservata. In campo nazionale è stato definito un protocollo d'analisi per la ricerca di Flavescenza dorata e di altre fitoplasmosi. Oggi sono numerosi i laboratori pubblici e privati in

grado di effettuare tali analisi. Il monitoraggio territoriale per l'individuazione della fitoplasmosi e del suo vettore è obbligo dei Servizi Fitosanitari Regionali (SFR), a termini dell'art. 2 del citato D.M. n. 32442 del 31 maggio 2000.

4.6.2. Misure da adottare nelle zone focolaio

Decreto Ministeriale n° 32442 del 31 maggio 2000 recante

"Misure per la lotta obbligatoria contro la Flavescenza dorata della vite"

Art. 4 Misure fitosanitarie nei focolai:

"All'interno della zona dichiarata "focolaio", area in cui è stata accertata ufficialmente la presenza di FD e si può ritenere tecnicamente possibile l'eradicazione della malattia, ogni pianta con sintomi sospetti di Flavescenza dorata deve essere immediatamente estirpata, senza necessità di analisi di conferma. Il Servizio fitosanitario competente può adottare ulteriori misure fitosanitarie ritenute idonee al fine di eradicare la malattia o di limitarne la diffusione, compreso l'obbligo della estirpazione dell'intero appezzamento infetto o il divieto di svolgere attività vivaistica."

Nel caso in cui Flavescenza dorata venga scoperta in una nuova area, e prima che essa assuma andamento epidemico, deve essere impostata una tempestiva azione di contenimento con l'obiettivo di giungere all'eradicazione della malattia. Tale azione è richiesta, tra l'altro, dalla normativa fitosanitaria comunitaria che, con l'art. 16 della Direttiva 2000/29/CE del Consiglio dell'8 maggio 2000, impone agli Stati membri di adottare tutte le misure possibili per il contenimento degli organismi da quarantena, tra cui, ovviamente, anche *Ca. P. vitis*, agente causale di Flavescenza dorata. Prima azione da intraprendere in questa evenienza è l'adozione di un efficace programma di lotta insetticida al vettore. Solitamente questa si basa su due interventi: il primo volto ad abbattere le popolazioni dell'insetto prima che questi raggiunga la quarta-quinta età giovanile (età nelle quali può già essere infettivo), e il secondo, finalizzato a eliminare i giovani nati successivamente al primo trattamento. La verifica dell'effettiva attuazione della lotta contro il vettore deve essere effettuata, a campione, da parte delle Autorità fitosanitarie, con visite aziendali nelle quali *S. titanus* viene ricercato

mediante la posa di trappole cromotropiche. Nel caso in cui l'obiettivo dell'azione fitosanitaria sia l'eradicazione di Flavescenza dorata da piccoli focolai localizzati, accanto alla lotta al vettore, dovrà essere prevista la sistematica eliminazione delle fonti di inoculo costituite dalle viti infette. La diffusione in zona di altri giallumi della vite, con sintomatologia indistinguibile, complica l'operazione di eradicazione e comporta, l'eliminazione non solo delle viti affette da Flavescenza, ma anche di quelle con sintomi riferibili ai giallumi della vite in senso lato, con la conseguenza di aumentare anche di molto il numero delle viti sacrificate. Una volta individuate le viti sintomatiche dovrà seguire la notifica all'azienda dell'obbligo dell'estirpazione e, in seguito, la verifica dell'adempimento di lotta obbligatoria. Riguardo l'epoca in cui eliminare le viti sintomatiche, non sempre è necessario o conveniente intervenire immediatamente nel corso della stagione vegetativa. Se infatti il vettore è raro i rischi di aumentare le infezioni sono trascurabili, il viticoltore, soprattutto se la vite è produttiva, può attendere la vendemmia e procedere all'estirpazione della vite opportunamente marcata durante la stasi vegetativa invernale. Anche nel caso in cui il vettore sia presente nel vigneto con popolazioni non trascurabili non è sempre conveniente procedere all'eliminazione delle viti infette subito dopo la loro individuazione. In tal caso è probabilmente più importante prima eliminare i vettori infetti, se il rispetto dei tempi di carenza rende ancora possibili trattamenti insetticidi, e solo successivamente estirpare le viti sorgenti di inoculo. In caso di estirpo immediato di una vite infetta, si potrebbe indurre, infatti, un'eventuale vettore infetto presente su di essa a spostarsi immediatamente su altre viti, ancora sane, diffondendo così ulteriormente la malattia. In ogni caso le viti sintomatiche devono essere eliminate mediante estirpazione prima della successiva ripresa vegetativa. L'obiettivo di una completa eradicazione di Flavescenza dorata non si è dimostrato affatto semplice da realizzare. Ad oggi non si è a conoscenza di casi in cui questa fitoplasmosi sia stata eradicata in modo completo e stabile da aree dove era presente il vettore *S. tianus*. Anche in casi nei quali si è intervenuti in modo tempestivo ed energico, la malattia, pur essendo stata contenuta a livelli estremamente ridotti, ha tuttavia continuato a persistere nei vigneti, a dimostrazione della imprevedibilità della sua manifestazione e della sua grande capacità di diffusione.

4.6.3. Misure da adottare nelle zone di insediamento

Decreto Ministeriale n° 32442 del 31 maggio 2000 recante

"Misure per la lotta obbligatoria contro la Flavescenza dorata della vite"

Art. 5 Misure fitosanitarie nelle zone di insediamento:

"Si definisce "zona di insediamento" l'area in cui è stata comprovata la presenza di FD e del suo vettore S. titanus e la malattia ha raggiunto una diffusione tale da non far ritenere possibile un'eventuale azione di eradicazione. Tale condizione è riconosciuta dal Servizio fitosanitario regionale competente per territorio. Nelle zone di insediamento l'adozione delle misure di contenimento dell'organismo nocivo sono definite di volta in volta dal Servizio fitosanitario regionale competente per territorio."

Le misure per contrastare Flavescenza dorata in ampie aree viticole dove la malattia è ormai insediata e ha assunto un andamento epidemico, devono necessariamente essere diverse. In questi casi il numero dei soggetti sintomatici presenti nei vigneti può essere anche molto elevato e, soprattutto in territori ampi e densamente vitati, una attenta e tempestiva azione di ispezione per individuare tutte le viti sintomatiche spesso risulta impossibile. L'impatto economico derivante dall'eliminazione delle singole viti sintomatiche o di intere superfici vitate facilita l'aggravio dei bilanci delle aziende viticole; l'eventuale intervento finanziario pubblico di sostegno richiede del resto notevoli risorse, non sempre disponibili. Tuttavia la strategia di lotta principale rimane la stessa delle zone focolaio: la prima e urgente misura da porre in atto è l'imposizione della lotta insetticida contro vettore. Il fenomeno della regressione dei sintomi, anche noto come *recovery*, soprattutto in presenza di un'attenta lotta insetticida al vettore, è reale e può essere determinante ai fini dell'andamento dell'epidemia. Non può però essere considerato fenomeno universale su cui contare a priori e in assoluto.

Un ulteriore fattore di variabilità potrebbe derivare dai diversi ceppi di fitoplasmi presenti. È ormai noto che in Italia sono stati accertati almeno due ceppi di fitoplasmi che si distinguono geneticamente tra loro: il ceppo 16SrV-C, diffuso in Veneto (provincia di Treviso), Friuli-Venezia Giulia, Piemonte e Liguria e il ceppo

16SrV-D, presente in Veneto (provincia di Verona e Vicenza), in Lombardia e in Emilia Romagna. Alcuni Autori attribuiscono alla natura del ceppo di Flavescenza dorata, in particolare al suo agente patogeno, notevole rilevanza ai fini epidemiologici, segnalando una maggiore aggressività al ceppo 16SrV-D.

4.7. TERMOTERAPIA

La lotta contro le malattie fitoplasmatiche e in particolare Flavescenza dorata, è concentrata sulla riduzione dell'inoculo nei vigneti tramite l'estirpo delle piante infette, il contenimento delle popolazioni dell'insetto vettore e l'utilizzo di materiale di moltiplicazione sano e certificato.

Una tecnologia segnalata da diversi decenni per il risanamento di materiali di propagazione di specie vegetali è quella della termoterapia in acqua calda. Nel caso della vite, consiste nell'immersione in acqua calda di marze, portinnesti o talee innestate, per tempi variabili da 10 minuti a più ore in funzione della temperatura prescelta (45-55°C). Sono stati definiti specifici diagrammi della relazione temperatura/tempo di immersione per effettuare l'intervento, con il rispetto della doppia esigenza di devitalizzare il fitoplasma e nel contempo preservare le qualità vivaistiche dei materiali trattati; la principale criticità alla diffusione di questa tecnica, oltre ad un aumento dei costi di produzione, consiste proprio nel rischio che il trattamento riduca la vitalità del materiale di propagazione. Per il trattamento vengono utilizzati bagni termostatici anche di dimensione notevole, la cui complessità costruttiva è imposta dall'esigenza di assicurare una temperatura uniforme nell'intera massa trattata. Il metodo ha trovato conferme di fattibilità e in alcuni Paesi (USA, Australia e Sud Africa) è stato da tempo proposto per l'eliminazione anche di altre malattie della vite quali il tumore batterico, la malattia di Pierce, e i funghi precursori del mal dell'esca. Nel mondo vivaistico italiano sulla tecnica vengono espresse perplessità di fondo: non sempre, infatti, si sono avute assicurazioni di affidabilità ai fini della conservazione delle qualità vivaistiche dei materiali trattati. Pertanto la termoterapia in acqua calda è utilizzata solo per particolari esigenze, per lo più per movimentare specifiche partite di talee. Certamente non ha trovato largo impiego per il trattamento delle grandi partite di barbatelle. I trattamenti termici non compromettono la vitalità del materiale vivaistico se il legno è ben maturo (come

avviene di norma in località molto calde e asciutte, per esempio, in Australia); possono essere invece rischiosi per materiale vivaistico raccolto in ambienti in cui la maturazione del legno è incompleta. Inoltre, per il momento, non sono stati progettati impianti di termoterapia a elevata capienza in grado di funzionare in regime di continuità. Si ritiene, inoltre, che prima di prevedere la generalizzata adozione della termoterapia nella filiera produttiva vivaistica, siano anche da indagare approfonditamente le conseguenze del trattamento sui numerosi organismi che vivono associati a vite (endofiti e non), verificando il loro ruolo, e gli effetti della loro eventuale devitalizzazione.

5. CONCLUSIONI

La Flavescenza dorata della vite è ritenuta la malattia più grave e preoccupante fra quelle che rientrano nel gruppo dei “giallumi della vite” causati da fitoplasmi. Infatti, Flavescenza dorata è fortemente epidemica, può essere distruttiva per la vite e la sua produzione e può colpire moltissime varietà, forse tutte quelle più coltivate. È di recente introduzione in Europa (anni '50 in Francia) e pertanto non esistono fenomeni di selezione e di adattamento patogeno/ospite vegetale. Per quanto riguarda il vettore, essendo originario del Nord America, non si conoscono ancora, in Europa, suoi competitori efficaci. L'eziologia di Flavescenza è certa e ampie sono le informazioni sulle caratteristiche del fitoplasma causale, incluse quelle genetiche. Anche la diagnosi è certa e precisa, specialmente quella molecolare, ormai applicata di consueto. Buone sono le conoscenze sull'ecologia del vettore e anche sulle caratteristiche della trasmissione del fitoplasma nonché sulla relazioni fondamentali patogeno/pianta ospite. Per quanto concerne la lotta e la difesa, possiamo affermare che sono molti gli esempi dove la malattia è stata frenata nella sua diffusione, sia in Italia sia all'estero, in seguito all'adozione di strategie e di interventi idonei; specialmente mirati alla lotta al vettore, e alla distruzione delle viti infette. Ciò ci consente di affermare che, attualmente, le conoscenze acquisite sulla malattia e le esperienze maturate nell'ambito della prevenzione, fanno pensare che Flavescenza dorata, se monitorata adeguatamente e fronteggiata per tempo, non deve essere più un problema grave. Va tuttavia ricordato che Flavescenza dorata si tratta di una malattia epidemica e che possono comunque permanere forme pericolose di endemie laddove si sono esaurite

le epidemie; quest'ultime possono nascere dall'arrivo incontrollato di vettori; differenti genotipi di Flavescenza dorata possono riavviare epidemie anche in zone precedentemente già infette. Nuove infezioni, anche a distanze ragguardevoli, possono essere innescate attraverso l'introduzione di materiale vegetale infetto. Da qui l'importanza dell'adozione di severe misure per la produzione di barbatelle.

Sembra ormai opinione abbastanza condivisa nella comunità scientifica, che al giorno d'oggi si dispone di conoscenze, di mezzi e di tecniche che dovrebbero essere idonei a evitare situazioni gravi come quelle registrate in passato, purché non si abbassi eccessivamente la guardia.

6. BIBLIOGRAFIA

- Alma A., Arnò C., Arzone A., Vidano C., 1988. New biological reports on Auchenorrhyncha in vineyards, 509-516
- Alma A., Conti M., 2002. Flavescenza dorata e altre fitoplasmosi della vite: il punto sui vettori ed epidemiologia. *Informatore fitopatologico*, 10, 31-35
- Arzone A., Alma A. (1997) - Auchenorrhinchi vettori di agenti fitopatogeni in Italia (Rhynchota Homoptera). *Annali dell'Accademia Agricola di Torino, Facoltà di Agraria*: 205-225.
- Bagard A., 1987. La flavescence dorée dans le vignoble corse, 69-90.
- Baker K.F., 1962. Thermotherapy of planting material. *Phytopathology*, 52, 1244-1255.
- Battle A., Angeles Martinez M., Lavina A., 2000. Occurrence, distribution and epidemiology of Grapevine yellows in Spain. *Europ. Journal of Plant Pathology* 106, 811-816.
- Bazzi C., Stefani E., Gozzi R., Burr T.J., Moore C.L., Anaclerio F., 1991. Hot-water treatment of dormant grape cuttings: Its effects on *Agrobacterium tumefaciens* and on grafting and growth of vine. *Vitis*, 30: 177-187.
- Belli G., 2012. Elementi di Patologia Vegetale *seconda edizione*, 249-255
- Bertaccini A., 2002. Il punto sull'epidemia di Flavescenza dorata in Italia. *Informatore agrario*, 58, 15, 97-98
- Bertaccini A., Borgo M., Bertotto L., Bonetti A., Botti S., Sartori S., Pondrelli M., Murari E., 2001. Termoterapia e chemioterapia per eliminare i fitoplasmi da materiali di moltiplicazione della vite. *Informatore agrario*, 57, 42, 137-144.
- Bianco P.A., Casati P., Marzigliano N., 2004. Detection of phytoplasmas associated with Grapevine flavescence dorée disease using real-time PCR. *Journal of Plant Pathology*, 86, 3, 257-261.
- Bianco P.A., Fortusini A., Scattini G., Casati P., Carraro S., Torresin G.C., 2000. Prove di risanamento di materiale viticolo affetto da Flavescenza dorata mediante termoterapia. *Informatore fitopatologico*, 50, 4, 43-49.
- Bianco P.A., Frosini A., Casati P., De Bellis G., 2003. Identification of phytoplasmas infecting grapevine by ligase detection reaction and universal array, 55.

- Boarino A., Loria A., D'Aquilio M., Veratti F., Zara G., Marzachi C., 2001. Quick and reliable methods for the diagnosis of phytoplasmas in grapevine, 139
- Borgo M., 1998. Riconoscimento di viti affette da malattie da fitoplasmi. *Informatore agrario*, 54, 24, 51-63.
- Borgo M., Egger E., 1983. Diffusione di una malattia virus-simile su "Chardonnay" e altre cultivar nel Veneto. *Informatore agrario*, 16, 25547-25556.
- Boudon-Padieu E., Larrue J., Caudwell A., 1989. ELISA and Dot-blot detection Flavescence dorée MLO in individual leafhopper vectors during latency and inoculative state. *Current Microbiology*, 19, 357-364.
- Buono R., Vallariello G. Introduzione e diffusione della vite (*Vitis vinifera* L.) in Italia, 2002, 44, 39-51. *Orto Botanico di Napoli, Università degli Studi di Napoli Federico II, Via Foria 223*, 80139.
- Caudwell A., 1957. Deux années d'études sur la flavescence dorée, nouvelle maladie grave de la vigne. *Annales de l'Amélioration des Plantes*, 4, 359-393.
- Caudwell A., 1993. Advances in Grapevine yellows research since 1990, 79-93.
- Caudwell A., Kuszala C., 1992. Mise au point d'un test ELISA sur les tissus de vignes atteintes de flavescence dorée. *Research in Microbiology*, 143, 791-806.
- Caudwell A., Meignoz R., Kuszala C., Schneider C., Larrue J., Fleury A., Boudon E., 1982. Purification immunologique et observation ultramicroscopique en milieu liquide, de l'agent pathogene (MLO) d'une jaunisse végétale la flavescence dorée de la vigne. *Academie d'Agriculture de France*: 407-415.
- Daire X., Boudon-Padieu E., Berville A., Schneider B., Caudwell A., 1992. Cloned DNA probes for detection of grapevine Flavescence dorée mycoplasma-like organism (MLO). *Annals of Applied Biology*, 121, 95-103.
- Duduk B., Botti S., Ivanovic M., Krstic B., Dukic N., Bertaccini A., 2004. Identification of phytoplasmas associated with Grapevine yellows in Serbia. *Journal of Phytopathology*, 152, 575-579.
- Edwards J., Pascoe I.G., Salib S., Laukart N., 2004. Hot water treatment of grapevine cuttings reduces incidence of *Phaeomonella chlamydospora* in young vines. *Phytopathology mediterranea*, 43, 158-159
- Frausin C., 2002. Resoconto di due anni di attività per l'eradicazione della Flavescenza dorata della vite dal Friuli. *Notiziario ERSA*, 14, 3, 35-42.

- Frausin C., Osler R., 2005. La Flavescenza dorata della vite in Friuli-Venezia Giulia: le azioni intraprese per contrastarne la diffusione. *Notiziario ERSA (2004)*, 17, 5-6, 40-48.
- Gärtel W., 1959. Die Flavescence dorée oder maladie du Baco 22 A. *Weinbau u. Weink*, 6, 295-311.
- Goheen A.C., Nyland G., Lowe S.K., 1973. Association of a rickettsialike organism with Pierce's Disease of grapevines and Alfalfa Dwarf and heat therapy of disease in grapevines. *Phytopathology*, 63, 341-345.
- Gundersen D.E., Lee I.-M., 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathology mediterranea*, 35, 144-151.
- Lee I.-M., Gundersen D.E., Davis R.E., Bartoszyk I.M., 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48, 1153-1169.
- Maniloff J., 1992. Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis. *American Society for Microbiology, Washington D.C.*, 549-559.
- Martini M., Murari E., Mori N., Bertaccini A., 1999. Identification and epidemic distribution of two Flavescence dorée-related phytoplasmas in Veneto (Italy). *Plant Disease*, 83, 925-930.
- Mori N., Bianco P.A., 2020. Flavescenza dorata tra vecchie conoscenze e nuove acquisizioni. Webinar AIPP www.youtube.com/watch?v=dCXD6O0mnBE&t=3305s
- Mori N., Martini M., Malagnini V., Fontana P., Bressan A., Girolami V., Bertaccini A., 1999. Vettori dei giallumi della vite: diffusione e strategie di lotta. *Informatore agrario*, 55, 24, 53-56.
- Mori N., Posenato G., Sancassani G., Tosi L., Girolami V., 1999. Insetticidi per il controllo delle cicaline nei vigneti. *Informatore agrario*, 55, 15, 93-97.
- Osler R., Fortusini A., Belli G., 1975. Presenza di *Scaphoideus littoralis* in vigneti dell'Oltrepò pavese affetti da una malattia del tipo "flavescence dorée". *Informatore fitopatologico*, 25, 6, 13-15.
- Osler R., Zucchetto C., Carraro L., Frausin C., Mori N., Pavan F., Vettorello G., Girolami V., 2002. Trasmissione di Flavescenza dorata e Legno nero e comportamento delle viti infette. *Informatore agrario*, 58, 19, 61-65.

- Pavan F., 1989. Possibilità di controllo dei potenziali vettori dell'agente della Flavescenza dorata. *Informatore agrario*, 45, 41, 55-61.
- Posenato G., Mori N., Bressan A., Girolami V., Sancassani G.P., 2001. *Scaphoideus titanus*, vettore della Flavescenza dorata: conoscerlo per combatterlo. *Informatore agrario*, 57, 15, 91-93.
- Ragazzi A., Moricca S., Della Valle I. 2004. Endophytism in forest trees. *Accademia Italiana di Scienze Forestali, Firenze*, 2004.
- Ravaz L., Verge G., 1924. Le Rougeau de la vigne. *Progrés Agricole et Viticole*, 79, 11-17, 86-89, 110-113, 135-141.
- Schvester D., Carle P., Moutous M., 1961. Sur la transmission de la flavescence dorée des vignes par une cicadelle. *Comptes-rendus de l'Academie d'Agriculture de France*, 47, 1021-1024.
- 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.
- Vidano C., Arzone A., Alma A., Arnò C., 1987. Auchenorrhinchi e diffusione della Flavescenza dorata della vite in Italia, 57-68.
- Weisburg W.G., Tully J.G., Rose D.L., Petzel J.P., Oyaizu H., Yang D., Mandeico L., Sechrest J., Lawrence T.G., Van Etten J., Maniloff J., Woese C.R., 1989. A phylogenic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. *Journal of Bacteriology*, 71, 6455-6467.

7. RINGRAZIAMENTI

Sento un brivido correre lungo la schiena nel pensare di essere arrivato a scrivere quest'ultimo capitolo; le emozioni sono tante, si intrecciano ed a volte si scontrano.

Le persone da ringraziare arrivato alla fine di questo percorso sono tantissime: in primis il Prof. Gianfranco Romanazzi, relatore di questa tesi, che ha accolto di buon grado la mia idea sull'argomento da trattare e che si è reso sempre disponibile per dubbi o chiarimenti; purtroppo il periodo in cui ci troviamo ha reso le comunicazioni un po' più difficoltose e macchinose, ciononostante è grazie a lui che la stesura di questo lavoro ha preso corpo ed è giunta a termine.

Un grazie infinito va anche alla mia famiglia, a mia sorella e alla mia fidanzata, che nonostante le difficoltà incontrate in questo cammino non hanno mai smesso di credere in me e mi hanno spronato ad andare avanti con più leggerezza possibile.

Per ultimi, ma non meno importanti, sono doverosi dei ringraziamenti anche ai miei amici; alcuni dei quali hanno intrapreso un percorso simile al mio e con i quali ho potuto confrontarmi e condividere gioie e dolori.

Un grazie immenso a tutti voi!