

# ALLA RICERCA DELLE FONTI DELLA RESISTENZA ALLA FLAVESCENZA DORATA

Elisa Angelini, Nadia Bertazzon, Sofia Casarini

La Flavescenza dorata (FD) è una gravissima malattia della vite, diffusa in tutte le aree viticole del Nord e parte del Centro Italia, oltre che in diversi Stati europei, dal Portogallo all'Ungheria. È causata da batteri molto particolari, chiamati fitoplasmi, che vivono nel floema delle piante, causando danni importanti alla vite, che vanno dal decadimento qualitativo e quantitativo delle produzioni al progressivo declino e deperimento delle piante.

Per tale motivo, e perché è fortemente epidemica, è inclusa fra le malattie da quarantena nella Comunità Europea e in Italia (Direttiva 2000/29/CE, D.M. 31 maggio 2000). È trasmessa dalla cicalina *Scaphoideus titanus*, un insetto di origine americana che vive sulla vite e che trasmette il fitoplasma da una vite all'altra in maniera molto efficiente. I sintomi sono tipici, ed includono ingiallimenti o arrossamenti delle foglie sulle varietà rispettivamente a bacca bianca e nera, mancata lignificazione dei tralci e colatura dei fiori o dei grappoli (A).

La FD e il suo vettore sono stati identificati in Europa già negli anni 1950, in Francia, da dove negli anni si sono diffusi in molti Paesi europei, fra cui l'Italia. Nel nostro Paese il periodo più critico è stato dagli anni 1990 ai primi del 2000, quando finalmente si è riusciti a porre un rallentamento all'epidemia, che nel frattempo si era però già diffusa in molte regioni italiane.

Tale contenimento era stato ottenuto grazie alle conoscenze acquisite dalla ricerca e alle misure di lotta obbligatoria introdotte nel 2000, che includono il trattamento insetticida e l'espianto obbligatorio nelle zone focolaio.

Purtroppo, negli ultimi due anni in diverse aree vitivinicole italiane stiamo assistendo ad una forte recrudescenza dell'epidemia, probabilmente associata anche alle modifiche nelle strategie di lotta insetticida: infatti i principi attivi oggi permessi, nel rispetto di una maggior sostenibilità, sono in numero minore e generalmente anche meno efficaci rispetto a quelli usati in precedenza.

## Lo studio della resistenza alla FD

Il CREA Centro per la ricerca in Viticoltura ed Enologia ha eseguito ricerche sulla malattia della FD, la sua epidemiologia ed il suo controllo fin da quando la patologia è comparsa in Veneto nei primi anni '90. Fra le altre attività, un argomento importante su cui ci si focalizza è lo studio di eventuali varietà di vite resistenti, o perlomeno meno suscettibili alla FD, e le ragioni profonde di tali caratteristiche, con l'implementazione di studi genetici e genomici.



(A) - Sintomatologia tipica da fitoplasmosi su vitigno a bacca nera.

Come riportato da diversi studi, sembra che la gran parte dei portinnesti utilizzati non siano suscettibili all'infezione, e comunque non manifestino sintomi della malattia, tranne casi rarissimi. Tale comportamento è stato accertato anche nella collezione di portinnesti del CREA, situata a Susegana (TV), dove, intorno agli anni 2000, nonostante la presenza dell'epidemia negli appezzamenti vicini e del vettore infettivo negli stessi portinnesti, questi ultimi non hanno quasi mai mostrato sintomi ascrivibili alla FD, risultando in parallelo negativi al saggio molecolare diagnostico. Il nostro interesse è però focalizzato soprattutto sulla suscettibilità e resistenza nelle varietà di *Vitis vinifera* coltivate in Europa.

In particolare, in questo articolo vengono riportate in sintesi le seguenti attività:

- ➔ monitoraggio in vigneto della suscettibilità e resistenza nelle diverse varietà di vite;
- ➔ studi di espressione genica su cultivar con diversa suscettibilità tramite sequenziamento del trascrittoma;
- ➔ incroci fra cultivar suscettibili e parzialmente resistenti, su cui eseguire la fenotipizzazione e la genotipizzazione, al fine di localizzare i tratti genetici associati ai caratteri di suscettibilità e resistenza;
- ➔ studio di cloni con diversa suscettibilità.

## Monitoraggi in vigneti infetti

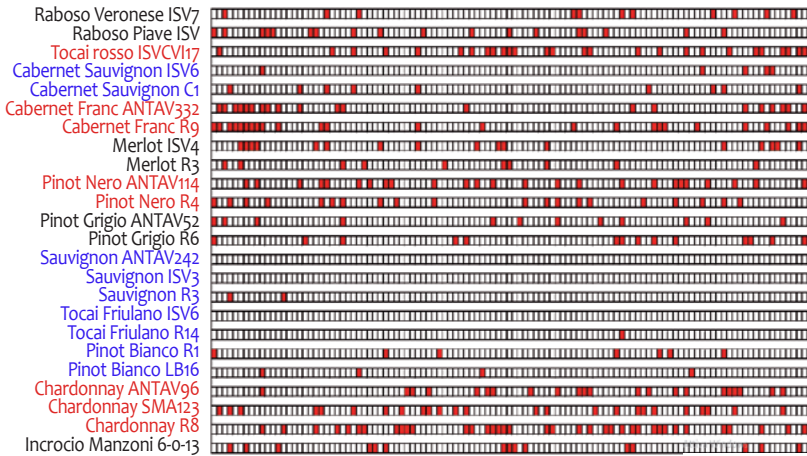
Per diversi anni sono state condotte attività di monitoraggio su vigneti e collezioni ampelografiche, per valutare la suscettibilità delle diverse varietà alle infezioni da FD. Sono stati scelti appezzamenti dove erano presenti più varietà piantate nello stesso anno, sottoposte alle stesse pratiche agronomiche ed alla medesima pressione di malattia. Solo in tale modo, infatti, è possibile ridurre al minimo l'influenza dell'ambiente, delle condizioni agronomiche e delle strategie di controllo della malattia, ed ottenere un confronto valido sulle eventuali differenze di suscettibilità nelle diverse varietà. I monitoraggi, svolti in gran parte fra il 1995 ed il 2005, sono stati eseguiti mediante osservazioni visive dei sintomi di FD ceppo per ceppo, seguite da analisi molecolari PCR dei campioni fogliari. Le attività sono state condotte in aree viticole dell'Italia settentrionale, in particolare nelle collezioni ampelografiche del CREA di Spresiano e Susegana (TV), ma anche in altre collezioni private e pubbliche di germoplasma viticolo. Il livello di suscettibilità è stato valutato in base al numero di viti infette sul totale delle viti presenti per quella varietà.

Confrontando i dati ottenuti dai diversi monitoraggi, si nota come i vitigni più suscettibili siano risultati Chardon-

nay, Riesling, Barbera, Cabernet Sauvignon, Cabernet franc, Tocai rosso, mentre altri come Moscato bianco, Sauvignon bianco, Merlot e Tocai friulano sono risultati poco colpiti.

Si riporta a titolo di esempio la mappa dei rilievi visivi effettuati per 3 anni in un vigneto plurivarietale situato a Vazzola (TV), nel momento in cui era in atto un'importante epidemia di FD difficilmente controllabile (B).

L'incidenza della malattia appare



(B) - Mappa dei sintomi in un vigneto plurivarietale situato a Vazzola (TV), con indicate le piante sane (quadrato bianco) ed infette da FD (quadrato rosso). Dati ottenuti dal monitoraggio triennale 2003-05.

variabile fra le diverse cultivar, ma si nota subito una zona centrale del vigneto dove l'infezione era quasi assente: corrisponde alla presenza di filari di alcuni cloni di Sauvignon bianco e Tocai friulano, dato che conferma quanto sopra riportato relativamente alla bassa suscettibilità alla FD di tali varietà.

Per confermare le osservazioni visive effettuate per tanti anni in situazioni diverse e da operatori differenti, nel 2021 il CREA ha impiantato due vigneti sperimentali gemelli, uno in Piemonte ed uno in Veneto, con circa 40 varietà con caratteristiche opposte, quindi già note per essere estremamente o pochissimo suscettibili alla FD. Lo scopo di tale sperimentazione è da una parte di confermare i dati già noti, ma con maggior precisione visto che tutte le varietà sono in un unico ambiente, e dall'altra di condurre ulteriori studi sui meccanismi di resistenza alla FD.

Le diversità di suscettibilità varietale alla FD ci suggeriscono quindi la presenza di differenze genetiche, che permettono ad alcune cultivar di essere maggiormente resistenti all'attacco del patogeno. È importante sapere che queste potenzialità sono parte del

patrimonio genetico di alcune varietà tuttora coltivate per le loro caratteristiche qualitative ed organolettiche, e non solo dei portinnesti.

### Studi di espressione genica

Per comprendere i meccanismi di difesa attivati in varietà scarsamente sensibili, è di fondamentale importanza esaminare la risposta della pianta durante la fase iniziale dell'infezione,

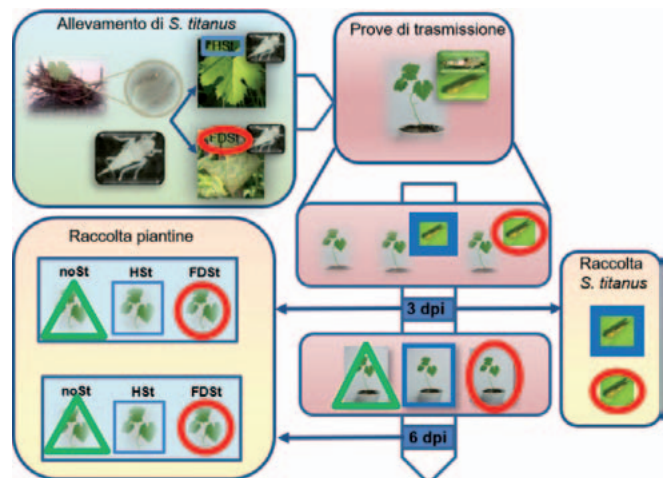
nel corso dell'interazione trofica specie-specifica che coinvolge il fitoplasma della FD, la vite e il vettore *S. titanus*. A tale scopo, sono stati investigati i meccanismi coinvolti nella suscettibilità e nella resistenza alla FD di Chardonnay, particolarmente suscettibile, e T. friulano, parzialmente resistente, prendendo in considerazione i profili di espressione genica, ottenuti tramite la tecnica del RNA-Seq, di piantine micropropagate delle due varietà che erano state esposte a vettore infettivo, a vettore sano o mantenute in assenza di vettore (C).

In generale, le piante possiedono due tipi principali di strategia di difesa: meccanismi passivi o

preesistenti, che coinvolgono barriere strutturali, quali cuticole spesse o riserve di composti antimicrobici, e meccanismi di difesa attivi, che vengono indotti in seguito al superamento delle barriere strutturali da parte dei patogeni.

La presenza di meccanismi di difesa passivi è stata studiata mediante la comparazione di piante non infette cresciute e mantenute in condizioni controllate identiche. L'analisi comparativa dei profili dei trascritti costitutivi ha rivelato che Chardonnay e T. friulano possiedono una *background* genetico molto diverso, riguardante soprattutto molti geni coinvolti in vie del metabolismo secondario. Vari geni, potenzialmente associati con meccanismi di difesa delle piante contro stress biotici e abiotici, hanno mostrato un livello di espressione più elevato in T. friulano, suggerendo per questa varietà il possibile coinvolgimento di strategie di difesa costitutive contro *S. titanus* e/o il fitoplasma della FD.

L'attivazione di meccanismi di difesa attivi indotti dall'infestazione di *S. titanus* sani o infetti è stata comparata nelle due varietà con diversa suscettibilità alla FD. T. friulano e Chardonnay hanno mostrato delle ampie differenze nell'ampiezza e nella tipologia dei cambiamenti trascrizionali indotti dall'infezione. In particolare, l'infezione da FD ha causato nella varietà parzialmente resistente rapidi e ampi cambiamenti dei trascritti che portano all'erezione di difese attive sin dalle prime fasi di infezione, basate soprattutto sul rimodellamento della parete cellulare. All'opposto, la risposta della varietà suscettibile



(C) - Diagramma illustrante l'allevamento e l'infezione di *S. titanus* (HSt: sani; FDSt: infettivi) in condizioni controllate e le prove di trasmissione. Vengono indicate le fasi di raccolta per l'analisi delle piantine e degli insetti durante l'esperimento (dpi: giorni post-infezione).

è stata caratterizzata da un'attivazione ritardata di strategie di difesa, consistenti principalmente nell'induzione della sintesi di fitolessine, tipica reazione di difesa riportata per ospiti suscettibili.

Il piano sperimentale utilizzato in questo studio che includeva tre trattamenti (vettore infettivo, vettore sano e assenza di vettore) ha permesso di indagare per la prima volta la modulazione dell'espressione genica della vite elicitata dalla puntura di *S. titanus* infetti e sani e poi, in aggiunta, l'effetto indotto dal fitoplasma della FD nei primi stadi di infezione, permettendo quindi la dissezione dell'interazione pianta-patogeno-vettore a livello molecolare. In sintesi, in Chardonnay, a tre giorni dall'infezione, sono avvenuti ampi cambiamenti dei trascritti in risposta all'insetto sano, mentre la risposta di difesa a *S. titanus* infetto, risultante dall'interazione tra pianta-patogeno-insetto, è apparsa molto più limitata. In particolare, la chiara attivazione di diverse vie di trasduzione del segnale, osservata in risposta all'insetto sano, mediate dal calcio e da ormoni come l'acido jasmonico, non è più stata osservata dopo l'infezione di *S. titanus* infetti. Ciò significa che nella varietà suscettibile il fitoplasma della FD induce un'inibizione della via di difesa mediata dall'acido jasmonico, ga-



(D) - Pianta di vite sintomatica della varietà Chardonnay piantata nel vigneto sperimentale ad Alba (CN), presso l'Azienda Agricola Rigo.

rantendosi in questo modo il successo nell'infezione (D).

### Incroci di cultivar suscettibili e resistenti

Perseguendo l'obiettivo di individuare i tratti genetici che permettono a varietà come il T. friulano di essere meno suscettibile, ovvero i geni di resistenza, è stato utilizzato un approccio classico tramite incrocio di una varietà molto suscettibile, come Chardonnay, con una parzialmente resistente, cioè T. friulano. Nel 2011 è quindi partito un programma di incroci tradizionali, che ha portato nel giro di qualche anno alla produzione di circa 700 piantine, ognuna derivata da un seme, che costituisce un individuo unico e diverso

da tutti gli altri. Le piantine sono state coltivate prima in vaso e successivamente in campo, quindi innestate e moltiplicate in vivaio al fine di ottenere almeno 20 barbatelle per semenzale. Infatti, per scoprire i tratti genetici associati (QTL, *quantitative trait loci*) alla resistenza su una popolazione da incrocio vanno identificate due serie di dati fondamentali: quelli fenotipici, cioè il grado di resistenza alla malattia di ciascun individuo, che si ottiene cercando di infettare le viti, e quelli genetici, ottenuti tramite sequenziamento del genoma delle diverse piante della progenie. Le barbatelle ottenute sono

state perciò piantate in vigneti sperimentali soggetti alla presenza della malattia, in cui vengono valutate anno per anno sia la capacità di infettarsi che la capacità di risanare di ogni individuo della progenie. Il primo vigneto sperimentale, piantato a giugno 2018 e costituito da 600 piante, è ospitato presso l'Azienda Agricola Rigo ad Alba (CN), mentre il secondo vigneto, piantato a giugno 2021, presso la Scuola Enologica "G.B. Cerletti" di Conegliano (TV), comprende più di 4000 piante (E).

### Osservazione dei sintomi in campo sui nuovi incroci

Il fitoplasma responsabile della malattia della FD, come gli altri fitoplasmi, non è coltivabile in laboratorio, ma so-



(E) - I vigneti sperimentali: a sinistra il vigneto piantato ad Alba (CN) presso l'Azienda Agricola Rigo, un anno dopo l'impianto del 2018; a destra il vigneto appena piantato a Conegliano (TV) presso la scuola enologica "G.B. Cerletti" (2021).

pravvive solamente all'interno di un ospite come il suo vettore, *S. titanus*, o una pianta come la vite. Per queste ragioni l'infezione delle viti in vigneto è stata effettuata in modo sperimentale controllato: il fitoplasma è stato inoculato tramite il suo vettore, che è stato lasciato prima nutrire su viti infette in condizioni controllate, quindi spostato all'interno di gabbie entomologiche predisposte sulle piante oggetto della sperimentazione, al fine di sottoporle ad infezione controllata (F). I sintomi della malattia in vigneto, che corrispondono alle capacità di reazione alla ma-



(F) - Infezione sperimentale in vigneto presso Alba (CN), ottenuto tramite il posizionamento di gabbie entomologiche contenenti il vettore e posizionati su tralci da infettare.

lattia di ciascun individuo, vengono osservati e registrati annualmente ceppo per ceppo, per analizzare e quantificare il comportamento dei diversi individui in relazione alla resistenza/suscettibilità a FD, e produrre quindi una precisa "scala" di suscettibilità/resistenza a FD. Ad oggi solo una parte della popolazione, cioè le viti piantate in Piemonte, è stata infettata per valutarne la suscettibilità, per i restanti individui i lavori sono in corso.

### Caratterizzazione genetica dei nuovi incroci

Il passo ulteriore per l'identificazione dei geni associati alla resistenza alla FD in vite passa per la ricerca dei tratti genetici associati a tale caratteristica nei diversi individui della progenie deriva-

ta da Chardonnay e T. friulano tramite metodiche molecolari fini (GBS, *genotyping by sequencing*). Una parte della popolazione, costituita da 184 individui, è stata analizzata geneticamente mediante la tecnica del GBS al fine di evidenziare i polimorfismi genetici (SNPs) presenti nel genoma della popolazione e nei relativi parentali. Tali polimorfismi hanno permesso per il momento di ottenere una mappa genetica, strumento alla base del "QTL mapping", ovvero l'individuazione all'interno del genoma dei tratti genetici responsabili del nostro carattere d'interesse. Una volta ottenuti, i dati genotipici e fenotipici (rilevati in vigneto) saranno integrati in una mappa genetica per circoscrivere i tratti cromosomici contenenti i geni di interesse per la resistenza alla FD. Questo lavoro sarà facilitato anche dall'unione di questi ultimi dati di mappa con i risultati descritti in precedenza e relativi ai geni differenzialmente espressi nelle due varietà.

### Studi su cloni con diversa suscettibilità alla FD

Nei vari anni di osservazioni in vigneto è stata rilevata una differenza di suscettibilità importante anche fra cloni della stessa varietà. In particolare, si è notato che un clone di Chardonnay, varietà in genere molto suscettibile, si ammalava in misura molto minore rispetto al resto del vigneto, costituito da un clone diverso di Chardonnay. Per indagare tale fenomeno, sempre con l'obiettivo di capire la ragione molecolare delle differenze di suscettibilità alla FD, è in corso una collaborazione con il CREA Genomica e Bioinformatica di Fiorenzuola d'Arda (PC), che prevede un altro tipo di approccio molecolare su tre cloni di Chardonnay che presentano una diversa suscettibilità alla FD (due cloni sono più suscettibili e uno lo è meno). Il confronto del genoma tra cloni presenta meno differenze rispetto a quello tra varietà diverse, e per questo motivo è stato indagato mediante un sequenziamento completo dei tre cloni presi in considerazione utilizzando una piattaforma Pacbio®, una delle più accurate e complete tecniche di sequenziamento oggi in commercio. Gli studi sono

tuttora in corso, e speriamo ci possano svelare qualcosa di importante.

### Prospettive

Le informazioni contenute nei tratti genetici associati alla resistenza possono permetterci innanzitutto di selezionare varietà e cloni che meglio sopportano l'attacco della malattia, e quindi di ridurre il numero di trattamenti fitosanitari che è necessario eseguire nella lotta al vettore. Conoscere quali sono le funzioni di tali geni ci permetterà inoltre di capire a fondo quali sono i meccanismi molecolari e metabolici che la pianta più resistente mette in atto per contrastare il patogeno, e quindi si può pensare di abbinare o sviluppare induttori di resistenza capaci di attivare tali vie anche nelle piante più suscettibili. Infine, in futuro potrebbe essere possibile implementare tali caratteri di resistenza nelle cultivar di interesse tramite incroci tradizionali, come già si sta facendo per peronospora ed oidio che sono le malattie fungine più importanti delle viti, oppure tramite le nuove metodiche di cisgenesi, già utilizzate per altre colture agrarie nel mondo, e che sembrano essere tecniche molto promettenti.

A lungo termine, infatti, lo scopo della ricerca scientifica in agraria resta sempre quello di avere ricadute sociali ed economiche, quali in questo caso la diminuzione dei danni causata dalla FD, la diminuzione dell'impatto degli insetticidi, e il conseguente aumento della sostenibilità economica e ambientale, a vantaggio di tutta la società.

#### Ringraziamenti

Le attività di ricerca sintetizzate nel presente articolo sono state possibili grazie al finanziamento di diversi progetti scientifici ed anche di soggetti privati, in particolare: progetto quadriennale GIA.VI del MIPAAF, progetto biennale RESPAT del CREA, progetto triennale ESPLORA del MIPAAF, supporto tecnico di VITIVER (associazione dei vivaisti viticoli veronesi), Azienda Rigo - Alba (CN), progetto quadriennale Europeo H2020 TROPICSAFE, Scuola Enologica G.B. Cerletti di Conegliano (TV). Si ringraziano tutti coloro che hanno partecipato agli studi nel corso degli anni: Letizia Aiello, Paolo Bagnaresi, Irene Bazzo, Elena Belgeri, Diego Bellotto, Michele Borgo, Costanza Cacioli, Luigi Cattiveilli, Manna Crespan, Nunzio D'Agostino, Lorena Dalla Cia, Antonella Esposito, Luisa Filippin, Vally Forte, Samuele Guadagnino, Davide Guerra, Elisabetta Mazzucotelli, Daniele Migliaro, Cinzia Montemurro, Michela Panzeri, Enzo Patriarca, Giuseppe Perini, Fiorenza Santellani, Marzia Signorotto, Alberto Spada, Francesca Taranto.

Elisa Angelini, Nadia Bertazzon, Sofia Casarini

CREA - Centro di Ricerca per la Viticoltura e l'Enologia Conegliano (TV).  
elisa.angelini@crea.gov.it