

DIFFUSIONE DI MEZZI DIAGNOSTICI INNOVATIVI PER L'INDIVIDUAZIONE DI FLAVESCENZA DORATA E LEGNO NERO

Chiara Pagliarani, Simona Campolongo, Fabrizio Torchio,
Giorgio Gambino, Cristina Marzachi

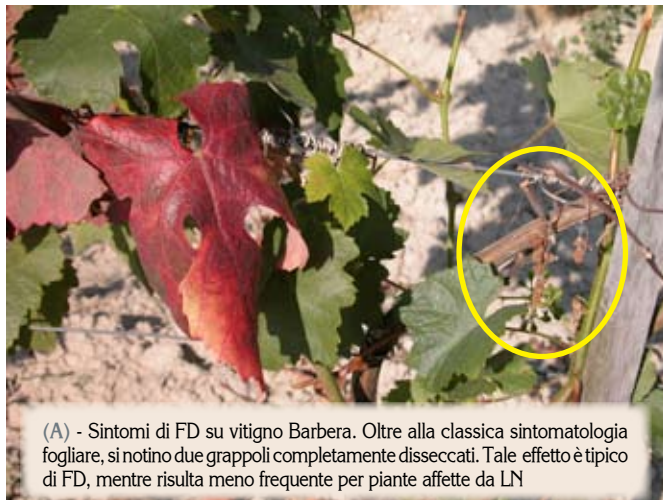
La flavescenza dorata (FD) (A) e il legno nero (LN) sono le patologie che, ad oggi, maggiormente minacciano le produzioni di numerose aree viticole del nostro Paese ed in modo particolare del Piemonte.

Entrambe le malattie sono causate da microrganismi simili ai batteri, comunemente conosciuti con il nome di fitoplasmi che, diffondendosi nel sistema vascolare della pianta ospite, provocano scompensi fisiologici e squilibri simili a quelli ormonali, come fenomeni di ingiallimento, arrossamento e fillodia, con effetti devastanti sulle rese produttive e qualitative delle piante colpite.

Vettori e diffusione

In vigneto la diffusione di FD e LN è dovuta alla presenza di insetti vettori, che ospitano il fitoplasma al loro interno e lo trasmettono alla pianta, durante la loro nutrizione, al tessuto floematico di quest'ultima, dove il microrganismo si insedia e prolifera velocemente. Questi insetti emittenti, appartenenti alla famiglia delle cicaline e delle psille, sono *Scaphoideus titanus* (Alma *et al.*, 1997) e *Hyalesthes obsoletus* (Sforza *et al.*, 1998), rispettivamente nel caso di FD e LN; sebbene la maggiore diffusione del LN a livello mondiale pare sia dovuta alla presenza di altri potenziali vettori (Weintraub e Bealand, 2006).

A differenza dell'infezione da LN, l'attacco da FD ha effetti epidemici ed incide direttamente sulla produzione, potendo portare ad una totale distruzione delle potenzialità produttive del vigneto nel giro di 3-4 anni. L'attacco da FD e LN interessa tutte le varietà di vite, sebbene alcuni vitigni, soprattutto il Barbera, risultino comunemente più



(A) - Sintomi di FD su vitigno Barbera. Oltre alla classica sintomatologia fogliare, si notano due grappoli completamente disseccati. Tale effetto è tipico di FD, mentre risulta meno frequente per piante affette da LN

colpiti da FD rispetto ad altri, come il Nebbiolo, dove si è riscontrata negli anni una minore sensibilità all'attacco di questo patogeno (Progetto VIPLASMI - Regione Piemonte, 2010).

Una decina di anni fa, è stato emanato a livello nazionale un decreto di lotta obbligatoria specifico per il contenimento della FD (D.M. 31/05/2000: "Misure per la lotta obbligatoria contro la Flavescenza dorata della vite"), recentemente aggiornato in Piemonte attraverso apposito decreto del 25 maggio 2011, n. 486 ("Aggiornamento dell'applicazione in Piemonte del Decreto Ministeriale del 31/05/2000"), e che prevede l'attuazione di tre misure fondamentali nelle zone focolaio e/o a rischio:

- ⇒ l'applicazione di trattamenti insetticidi contro l'insetto vettore, *S. titanus* (di cui il primo a partire dal termine della fioritura), che viene di norma programmata secondo quanto stabilito dai disciplinari e controllata ad opera dei Servizi Fitosanitari Regionali;
- ⇒ l'estirpo delle piante infette e, nei casi di infezione superiore al 30%, dell'intero vigneto;
- ⇒ l'attuazione di interventi mirati in vigneti in stato di abbandono, che spesso fungono da fonte di inoculo.

La presenza di vigneti abbandonati costituisce, infatti, un serio problema tecnico, in quanto questi appezzamenti possono facilmente diventare aree di rifugio e di moltiplicazione per l'insetto vettore.

Termoterapia

La diffusione di entrambe le patologie non è tuttavia soltanto riconducibile alla presenza di insetti vettori in vigneto, in quanto la moltiplicazione di materiale

da propagazione già infetto è una delle possibili cause dello sviluppo di queste fitoplasmi. Per questa ragione, negli ultimi anni si è diffusa in Piemonte la termoterapia in acqua calda a 52°C.

Si tratta di un trattamento preventivo che garantisce l'eliminazione dei fitoplasmi dal materiale di propagazione (Mannini e Marzachi, 2007) che, in aggiunta al controllo mirato del materiale vivaistico, dovrebbe garantire la sanità delle barbatelle messe in campo.

(B) - L'asporto tempestivo della parte infetta e la successiva capitozzatura della pianta favoriscono in parte la possibilità di un risanamento



Diagnosi

I sintomi da FD e LN, descritti in numerosi lavori del Settore Fitosanitario Regionale (Regione Piemonte, 2006 e 2008; Morone *et al.*, 2004 e 2006), consentono esclusivamente di capire se la pianta colpita è affetta o meno da fitoplasmosi; sebbene la comparsa di sintomatologie primaverili, come tipici casi di germogliamento stentato, siano maggiormente attribuibili a FD piuttosto che a LN.

L'esame visivo, se da un lato permette di escludere con buona probabilità la presenza di altri patogeni, come i virus, non è sufficiente da solo a ricondurre le alterazioni fenotipiche osservate a FD o LN. Capire con assoluta certezza quale delle due malattie interessi il proprio vigneto può essere molto importante, al fine di attuare con successo strategie appropriate per il contenimento della fitoplasmosi d'interesse, soprattutto nel caso in cui sia possibile applicare pratiche agronomiche che facilitino un recupero della normale condizione fisiologica, il cosiddetto fenomeno del risanamento o recovery (B). Sebbene possa verificarsi spontaneamente sia su viti colpite da FD o da LN, in quest'ultimo caso tale effetto risulta più frequente e inoltre, come da poco dimostrato, può essere ottenuto facilmente mediante capitozzatura (Credi *et al.*, 2011).

Nonostante i continui sforzi e l'efficiente intervento dei Servizi Fitosanitari Regionali, queste malattie si sono diffuse velocemente, principalmente a causa della natura intrinseca dei patogeni coinvolti. In particolare il caso della FD, dal 1998, anno in cui l'epidemia è esplosa in Piemonte, è diventato ancora più critico, e i dati più preoccupanti si sono avuti proprio in questi ultimi due anni.

Analisi molecolari

Le analisi molecolari, sviluppate nel corso degli anni, hanno reso possibile la distinzione dei fitoplasmi associati a FD e LN. Nonostante questo, la carenza di mezzi diagnostici precoci e rapidi capaci di fornire, oltre al dato accurato, anche uno screening tempestivo e soprattutto ad ampio spettro nelle zone colpite hanno in parte contribuito alla diffusione delle malattie.

Recentemente, sono state messe a punto nuove tecniche diagnostiche molecolari, che permettono di analizzare un numero significativamente elevato di campioni alla volta. Il contemporaneo impiego di metodi di preparazione del campione più rapidi e di saggi molecolari altamente sensibili, basati sulla real time RT-PCR (C) (Palmano *et al.*, 2007; Margaria *et al.*, 2007 e 2009), ha permesso di ridurre sensibilmente non soltanto i tempi, ma anche i costi della diagnosi, soprattutto

(D) - Suggerimenti per effettuare correttamente il campionamento del materiale per la diagnosi di FD e LN

Materiale da prelevare	Prelevare per ogni campione circa 15/20 foglie sintomatiche
Ricordare che	Al laboratorio è sufficiente un solo campione per effettuare sia la diagnosi di FD sia quella di LN
Conservazione	Una volta prelevati, è necessario conservare i campioni in sacchetti di plastica etichettati e posti all'interno di una borsa frigo fino al momento della consegna al laboratorio. In particolare, nel caso in cui la consegna al laboratorio venga fatta molte ore dopo il campionamento (ad es. campionamento al mattino e consegna nel tardo pomeriggio), è consigliabile mantenere i campioni in frigo

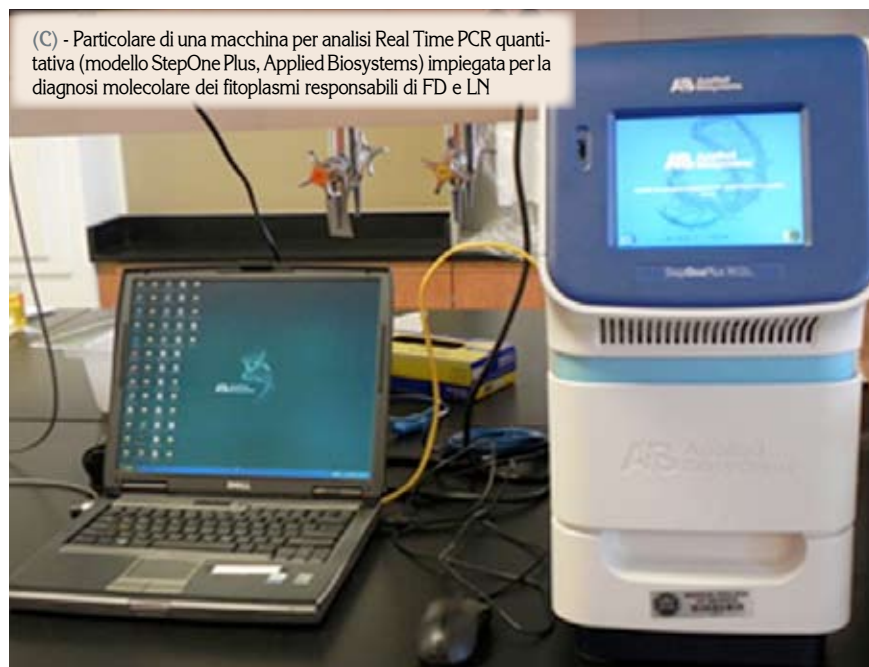
perché i due fitoplasmi responsabili di FD e LN possono essere rilevati in parallelo a partire da un unico estratto ottenuto da un campione di foglie.

Questo significa che, con un solo campionamento di materiale dalla pianta infetta (D) è possibile effettuare contemporaneamente entrambe le analisi, poiché non viene seguito un trattamento diverso per la preparazione del campione a seconda che si analizzino LN o FD, ma è a livello molecolare che si discrimina tra la presenza di un fitoplasma o l'altro.

Un grosso vantaggio, quindi, che rende queste metodiche particolarmente adatte all'applicazione su larga scala: dallo screening delle piante in vigneto alla valutazione del materiale da propagazione in vivaio.

L'utilizzo di simili tecnologie risulta molto utile quando l'epidemia di flavescenza non è in atto per avvalorare l'eventuale presenza di legno nero, oppure quando i sintomi, che solitamente permettono la diagnostica sintomatologica, sono espressi in maniera ambigua e quindi non utili ad esprimere un giudizio di riferibilità alla sindrome fitoplasmatica.

Chiara Pagliarani, Simona Campolongo,
Fabrizio Torchio
Gruppo Ricerche Avanzate Enologia
(GRAPE) srl
chiara.pagliarani@grapesrl.it
Giorgio Gambino, Cristina Marzachi
Istituto di Virologia Vegetale (IVV-CNR)



(C) - Particolare di una macchina per analisi Real Time PCR quantitativa (modello StepOne Plus, Applied Biosystems) impiegata per la diagnosi molecolare dei fitoplasmi responsabili di FD e LN