LA FLAVESCENZA DORATA DELLA VITE

INTRODUZIONE ALLA MALATTIA

In Italia la **Flavescenza dorata (FD) ed il suo insetto vettore *Scaphoides titanus* Ball.** rappresentano una delle principali minacce alla viticoltura, malgrado siano a tutt'oggi ancora prevalentemente confinati nelle aree viticole delle regioni settentrionali. La FD è una malattia epidemica nella vite, di quarantena nella Comunità Europea, scoperta alla fine degli anni 1950 in Francia, ora presente in buona parte dell'Europa. In Italia è ampiamente e capillarmente diffusa nelle regioni del Centro-Nord, generalmente fino alla latitudine della Toscana, mentre il suo vettore è già presente in popolazioni stabili dal Nord fino alle regioni del Centro Italia (es. Lazio) e nei rilievi delle regioni meridionali (Abruzzo, Campania e Basilicata). Nel 2011 la contemporanea presenza di FD (ceppo D) e del suo vettore è stata segnalata in diversi vigneti localizzati nell'Isola di Ischia che rappresenta ad oggi la segnalazione più a sud di questa malattia. In Europa al momento il vettore è presente nell'Europa centro meridionale, dal Portogallo alla Romania, escludendo la penisola greca, mentre la malattia è stata identificata negli stessi Paesi, eccetto quelli più orientali. È comunque in continua espansione.
La malattia è provocata dal fitoplasma '*Candidatus* Phytoplasma vitis' (gruppo ribosomico 16SrV-C e -D) e, dal punto di vista dei sintomi, non è distinguibile da altri "giallumi" provocati da differenti fitoplasmi ma non trasmessi dall'insetto *Scaphoideus titanus*, cicalina di origine americana, molto diffuso nei vigneti. È, infatti, la combinazione del binomio '*Ca.* P. vitis' e *S. titanus* a rendere la malattia così dannosa e grave da essere considerata ancora una malattia da quarantena malgrado la sua diffusa presenza sul territorio italiano e dell'UE.
La diffusione della malattia è prevalentemente a carico del vettore e può avvenire sia in pieno campo che in vivaio ma può anche essere trasmessa per innesto attraverso l'impiego di marze e/o portainnesti infetti. Tuttavia, la percentuale di attecchimento degli innesti eseguiti con materiali prelevati da piante infette risulta generalmente bassa e questa modalità di trasmissione sembra essere meno importante.
In vigneto la FD causa perdite di produzione molto importanti, con disseccamento delle infiorescenze e dei grappoli, decadimento qualitativo dei vini, deperimento dei tralci e dell'intera pianta, e può portare a morte le viti nel giro di pochi anni se non vengono adottate strategie di lotta adeguate. La prima presenza accertata in Italia risale ai primi anni '90. Nel periodo a cavallo fra gli anni '90 e i primi del 2000 ha causato epidemie e danni nei vigneti delle regioni colpite, conquistando ogni anno nuovi territori con pesanti ricadute su intere regioni viticole, non solo in Italia ma anche all'estero.

Figura 1. Flavescenza dorata: a sinistra vigneto con danni, foto 2020, varietà Glera; a destra: grappolo disseccato dalla malattia.

Grazie agli studi e alle ricerche svolte in quegli anni in ambito soprattutto francese ed italiano, e alla successiva introduzione della lotta obbligatoria (in Veneto nel 1998, In Europa ed Italia nel 2000), la malattia è entrata in una fase di rallentamento epidemico ed è stata per diversi anni sotto controllo. con strategie di lotta consolidate. Difficoltà maggiori sono emerse nei vigneti in conduzione biologica, dove i viticoltori hanno dovuto accettare un costante livello di perdita produttiva e di sostituzione annuale di piante.
Si evidenzia che, tranne gravi casi dovuti spesso ad imperizia o mancanza di conoscenza da parte del viticoltore, la malattia ha mostrato successivamente un assestamento per un lungo periodo, con tassi di infezione inferiori all'1% all'anno. Dal 2018-2019 la situazione si è modificata per cause ancora non del tutto chiarite con recrudescenze della malattia anche in zone già colpite da tempo, sia in Italia che all'estero, per le quali si ritiene siano implicati i cambiamenti climatici in atto per la loro influenza sia sul ciclo del vettore e del patogeno e che per vari stress vegetativi delle piante, cui vanno aggiunte, peraltro, anche trasformazioni delle strategie agronomiche e di difesa.

FD in Italia è una malattia ancora sottoposta a quarantena, con obbligo di lotta secondo il decreto ministeriale nº 32442 del 31 maggio 2000 (Direttiva 2000/29/CE del Consiglio, e successive modifiche).
Le misure della lotta prevedono, una volta accertata la presenza della malattia, l'eliminazione delle piante infette ed il controllo per gli anni successivi. Nel caso di contemporanea presenza del vettore *S. titanus* si predispongono trattamenti con insetticidi specifici contro il vettore (da 1 a 4 trattamenti l'anno). Fondamentale è il monitoraggio di campo per il controllo dell'insorgenza di sintomi e della presenza del vettore, e sull'impianto di materiale vegetale sano. Le strategie di lotta agronomica includono l'eliminazione immediata delle piante infette, fonti di inoculo della malattia, che in Italia è obbligatoria nelle aree focolaio o di nuovo insediamento, mentre nelle zone dove la malattia è ormai endemica può essere obbligatoria o consigliata, in dipendenza dei regolamenti regionali.
Vista l'impossibilità di cura, la prevenzione riveste un ruolo fondamentale. Tra le misure di prevenzione l'impiego di materiale di moltiplicazione sano. È poi fondamentale la disponibilità di protocolli diagnostici affidabili, rapidi ed in grado di consentire una diagnosi precoce del patogeno, in modo da poter intervenire rapidamente e in maniera efficace. Anche la sterilizzazione del materiale vivaistico tramite immersione in acqua, in vasca termostatata a 55 °C per 45 minuti, sembra avere un effetto nella prevenzione della diffusione della malattia tramite il materiale di propagazione.

(CREA VE)

1) Ricerca di base ed applicata

Studiare le basi genetiche della resistenza a FD nelle varietà di vite resistenti per mettere a punto nel medio e lungo termine strategie di lotta in vigneto più sostenibili, basate su:

- Utilizzo di varietà di vite rese più resistenti alla ampelopatia, che non richiedono trattamenti insetticidi specifici per questa malattia;
- Attivazione delle difese intrinseche della vite, tramite trattamenti o stimolo di secrezione di sostanze naturali, che vadano ad integrare gli approcci di lotta più classici.

È evidente che la stretta dipendenza dagli insetticidi nella lotta a questa malattia non è più attuale al giorno d'oggi, sia dal punto di vista della sostenibilità ambientale che nei confronti dell'accettazione sociale del rischio connesso all'uso di prodotti fitosanitari con un possibile impatto sulla salute dell'operatore e del cittadino. In tale direzione vanno infatti da alcuni anni le politiche europee ed italiane, che fra le altre novità hanno bandito dall'uso una serie di prodotti insetticidi molto efficaci in vigneto, ma connessi con la salute degli insetti impollinatori e con una certa azione di interferenza ormonale nell'uomo, specialmente in età evolutiva.

Studi ed osservazioni eseguiti negli anni da vari Autori su collezioni ampelografiche e su campi di confronto hanno dimostrato come la percentuale di viti colpite e la gravità dell'attacco sulla singola pianta siano molto variabili da una varietà all'altra. Queste osservazioni epidemiologiche suggeriscono l'esistenza di fattori genetici che influenzano **la suscettibilità e la resistenza** a questi patogeni nella vite, ma, fatto ancor più importante, indicano che queste potenzialità sono insite nel patrimonio genetico di alcune varietà di *Vitis vinifera* tuttora coltivati per le loro caratteristiche qualitative ed organolettiche. Le osservazioni raccolte finora ci indicano che i meccanismi di resistenza della vite potrebbero essere legati sia alla capacità di alcune varietà di "compartimentare" e quindi bloccare il patogeno durante le prime fasi dell'infezione, impedendogli quindi di infettare la pianta intera, ma potrebbero essere anche legate al comportamento dell'insetto vettore nei confronti delle diverse varietà, che per le loro caratteristiche intrinseche potrebbero essere più o meno appetibili ed attrattive per l'insetto stesso. Nonostante recentemente siano state condotte alcune ricerche su base genomica e proteomica, non sono stati ancora individuati **geni candidati** potenzialmente correlati ai fenomeni di resistenza a FD.
La disponibilità della sequenza del genoma della vite e lo sviluppo di metodologie molecolari sempre più potenti aumentano enormemente la possibilità di localizzare i geni coinvolti nell'espressione dei caratteri della resistenza a FD, per poi utilizzarli per una difesa più sostenibile in vigneto. Tra questi, l'attivazione di vie di difesa mediate da ormoni, quali l'acido salicilico, l'acido jasmonico e l'etilene, risulta spesso fondamentale nel bloccare gli attacchi da parte di microrganismi patogeni. Nel caso dei fitoplasmi la via di difesa mediata dall'acido jasmonico sembra avere un ruolo cruciale nella protezione nei confronti di sintomi di giallumi in vite. L'**attivazione delle difese** mediate dall'acido jasmonico è stata osservata nel corso del risanamento spontaneo di viti che avevano sintomi di giallumi. Inoltre, è stato dimostrato che durante il processo di infezione della pianta i fitoplasmi rilasciano molecole, chiamate effettori, che vanno a silenziare in modo specifico l'espressione di alcuni geni della via del jasmonato. Recentemente, da studi di trascrittomica del CREA-VE è emerso che in varietà di vite molto suscettibili ai giallumi, già nelle primissime fasi di infezione, il fitoplasma induce un'inibizione della via di difesa dell'acido jasmonico, garantendosi in questo modo il successo nell'infezione. Al contrario, questo evento non è stato osservato in varietà meno suscettibili nei confronti della malattia.

Progetti in corso presso il CREA VE:

a) Ricerca dei geni della resistenza a FD nel genoma della vite

Dal 2011 al 2015 il CREA-VE di Conegliano (TV), tramite progetti finanziati dal CREA (RESPAT, ESPLORA) ed in collaborazione con il CREA-GB (Fiorenzuola, PC) ha eseguito ricerche volte ad identificare i meccanismi molecolari responsabili della resistenza a FD, paragonando due varietà diversamente suscettibili alla malattia, Chardonnay e Tocai friulano. In pratica, è stato verificato quali geni si "accendono" e quali si "spengono" durante l'infezione. In particolare, sembra che nella varietà suscettibile, il fitoplasma della FD induca un'inibizione (sottoespressione) delle vie di difesa nello Chardonay, garantendosi in questo modo il successo nell'infezione.

b) Incroci fra varietà di vite suscettibili e resistenti per identificare le regioni del DNA associate alla resistenza a FD

Fra il 2011 ed il 2017 è quindi partito un programma di incroci tradizionali fra una varietà sensibile (Chardonnay) e due varietà parzialmente resistenti a flavescenza dorata (Tocai friulano e Moscato bianco). Sono state prodotte due popolazioni di circa 600 "figli" ciascuna, in cui ogni piantina è derivata da un seme e costituisce un individuo unico e diverso da tutti gli altri. Tramite il progetto europeo H2020 TROPICSAFE (2018-2021) sono stati ricostruiti le mappe dei cromosomi dei due genitori (coll. con Università di Bari, Napoli e CNR). È stato inoltre creato un primo vigneto sperimentale in Piemonte, con la collaborazione di un viticoltore disponibile e della Coldiretti locale, dove la sintomatologia è sotto osservazione da 2 anni.

Altri "figli" di Tocai friulano x Chardonnay verranno piantati in primavera 2021 nei vigneti sperimentali della Scuola Enologica Superiore ISISS Cerletti di Conegliano (TV). Qui il lavoro in vigneto sarà seguito dagli studenti supportati dai ricercatori del CREA-VE. Il progetto è stato inquadrato nell'ambito di una proposta al MIPAAF nel bando BIO nel febbraio 2021.

c) Sequenziamento del genoma di due cloni di Chardonnay resistenti (parzialmente)

Un altro approccio in corso, sempre finanziato dal progetto europeo TROPICSAFE (2018-2021), e svolto in collaborazione con il CREA-GB di Fiorenzuola (PC) parte da un'osservazione di campo che ha identificato due cloni dello stesso vitigno (Chardonnay) con suscettibilità alquanto diversa alla malattia. In questo progetto sono confrontate differenze sui cromosomi tra due cloni quasi identici

d) Uso di elicitori naturali delle vie di difesa della vite nella lotta a FD

Dal confronto molecolare precedente fra Tocai e Chardonnay era emerso, fra gli altri risultati, che la via di difesa mediata dallo jasmonato sembrava avere un ruolo cruciale nella protezione nei confronti di sintomi di giallumi in vite. Sulla base di questa informazione è nato il progetto regionale MIDIFENDO (2019-2022), che prevede l'utilizzo di composti organici volatili microbici (mVOC) capaci di attivare la via dello jasmonato, con lo scopo di indurre nella vite le vie di difesa necessarie per proteggersi contro l'infezione del fitoplasma responsabile di FD.

e) Altri progetti minori

Il CREA-VE, con la collaborazione della Istituto Cerletti e di un viticoltore piemontese, pianterà nella primavera 2021 una collezione, replicata nei due siti, di 41 varietà di vite già registrate selezionate per la loro opposta suscettibilità a FD (24 replicati ciascuno). Questi vigneti sperimentali serviranno per ulteriori studi sulla resistenza a FD e per la verifica dei meccanismi di resistenza, che potrebbero anche essere diversi in alcune varietà. Inoltre, sono in corso ulteriori studi trascrittomici e metabolomici su piante di Tocai friulano e Chardonnay per individuare le vie di difesa attivate nelle diverse porzioni malate e sane di vite, in collaborazione anche con l'Università di Padova.

(CREA-DC)

Il CREA-DC (da marzo 2021 Istituto Nazionale di Riferimento per la Protezione delle Piante), con le due sedi di Roma e Firenze, è da molti anni coinvolto nelle problematiche legate ai giallumi della vite causati da fitoplasmi (in particolare, Flavescenza dorata e Legno nero), con studi epidemiologici rivolti sia ai Fitoplasmi che agli Insetti vettori e soprattutto con ricerche finalizzate all'avanzamento delle tecniche diagnostiche, alla validazione delle metodiche e alla caratterizzazione molecolare.

a) Di seguito un elenco sintetico di attività e ambiti di ricerca per quanto attiene la diagnostica.
   - verifica delle caratteristiche di performance dei metodi di diagnosi secondo standard europei (EPPO PM 7/98 (4)) attraverso Test Performance Study (TPS) che coinvolgono diversi laboratori e consentono di individuare i migliori test disponibili per la diagnosi di un dato organismo;
   - verifica del livello di affidabilità diagnostica di laboratori attraverso l'organizzazione/partecipazione a Proficiency Test (PT) in cui ciascun laboratorio partecipante è chiamato ad analizzare, con il suo metodo di routine, un panel di campioni anonimi infetti o meno da un organismo target.
     - partecipazione al TPS europeo per la validazione di protocolli di diagnosi, organizzato nell'ambito del progetto europeo EUPHRESCO-GRAFDEPI; i metodi validati in occasione di questo TPS sono stati poi inseriti nello Standard EPPO PM 7/79 (2);
     - partecipazione al PT per la diagnosi di FD organizzato dall'ANSES, risultando laboratorio conforme;
     - organizzazione del TPS nazionale per la validazione di protocolli di diagnosi di FD, nell'ambito del progetto finalizzato ASPROPI;

- in qualità di Laboratorio Nazionale di Riferimento per le malattie delle piante causate da virus, viroidi e fitoplasmi, il CREA-DC nel 2019, ha partecipato al PT per la diagnosi di FD organizzato dall'*European Reference Laboratories for pest of plants (EuRL) - Consortium Virology* (di cui lo stesso CREA-DC è membro), risultando anche in questo caso laboratorio conforme;
- è attualmente coinvolto nell'Euphresco project 2020-A-344: *'Development of efficient methods and identification of barcodes for discriminating Grapevine flavescence dorée sensu-stricto from other related phytoplasmas and investigation of potential correlation between taxonomic identity and grapevine, alders and hazelnut plant hosts'* che ha fra le sue attività l'organizzazione di un TPS per la validazione di metodi per la diagnosi specifica dei fitoplasmi agenti di FD sviluppati nell'ambito del progetto a cui il CREA-DC prenderà parte;
- dispone di un metodo ufficiale per la diagnosi di FD accreditato da Accredia secondo la norma ISO17025.

La recente nomina del CREA-DC quale Istituto Nazionale di Riferimento e di Laboratorio Nazionale di Riferimento per le malattie delle piante causate da virus, viroidi e fitoplasmi, unitamente al ruolo di membro del EuRL- Consortium Virology, determinerà un sempre maggiore coinvolgimento del CREA-DC nelle iniziative finalizzate a:

- delineare ed organizzare la rete Nazionale dei Laboratori Ufficiali prevista dalla vigente normativa fitosanitaria;
- promuovere l'accreditamento dei laboratori secondo la norma ISO17025 (requisito indispensabile per la designazione di laboratorio ufficiale) attraverso l'organizzazione di PT per organismi specifici, fra cui, FD;
- fornire supporto tecnico-scientifico ai laboratori facenti parte della rete nazionale, con particolare riguardo ai materiali di riferimento ed hai protocolli di diagnosi;
- promuovere la validazione di protocolli di diagnosi attraverso l'organizzazione di TPS a livello nazionale ed europeo.

Con riferimento alle attività di ricerca e sperimentazione del CREA-DC si elencano inoltre in modo sintetico i principali ambiti di impegno:

- Ricerche sulle potenzialità di Insetti di recente introduzione in Italia che hanno fra i loro ospiti anche la vite ad agire quali nuovi vettori di Flavescenza dorata (es. Cimice asiatica).
- Ricerche per interferire sulla comunicazione intraspecifica del vettore *Scaphoideus titanus.*
- Trattamenti endoterapici finalizzati ad impedire la trasmissione del fitoplasma tramite il suo vettore.

RICADUTE PRATICHE E PROSPETTIVE FUTURE CON RIFERIMENTO ALLE RICERCHE E ALLE ATTIVITA' ISTITUZIONALI PORTATE AVANTI DAI CENTRI CREA

Gli avanzamenti nelle tecniche diagnostiche e l'implementazione di una adeguata rete laboratoristica ufficiale metteranno a disposizione del sistema agricolo uno strumento fondamentale per qualsiasi strategia preventiva o curativa nei riguardi di Flavescenza dorata.

La scoperta dei meccanismi associati alla resistenza a FD, oltre ad indubbi risultati importanti per la comunità scientifica relativi ad una migliore comprensione di alcuni meccanismi ospite-patogeno, porterà ad innegabili benefici tecnici, sociali ed economici, in linea con la più recente programmazione delle politiche agricole europee. Infatti, con tali conoscenze si potranno attuare in futuro strategie di prevenzione e di lotta contro la flavescenza dorata ed altre malattie da fitoplasmi impensabili con il *know-how* attuale, quali l'elicitazione delle difese naturali della vite, il silenziamento dei caratteri associati alla suscettibilità, l'introduzione dei caratteri di resistenza nelle varietà di interesse tramite incrocio classico o tecnologie di evoluzione assistita (TEA).

Grazie a ciò, si otterranno una diminuzione dei danni relativi alla mancata produzione e alla morte delle viti, una ulteriore valorizzazione anche economica degli sforzi dei viticoltori, una diminuzione dell'impatto dei fitofarmaci sull'ambiente, sugli operatori, sulle produzioni vitivinicole e sui consumatori, e quindi un aumento della sostenibilità della viticoltura a livello economico, ambientale e sociale.
Analogamente un più efficace contrasto del vettore con sistemi a basso impatto ambientale che evitino la dispersione di biocidi nell'ambiente dovrà anch'esso dare un contributo al contenimento di questa malattia della vite.
Il problema va però affrontato ora, utilizzando tutti i diversi approcci a nostra disposizione, sia tradizionali che innovativi, ed unendo gli sforzi degli enti di ricerca, dei tecnici e dei viticoltori, degli enti governativi locali e nazionali, e delle politiche agricole e sociali.

Documento preparato da:

(CREA-VE) Elisa Angelini, Vally Forte, Riccardo Velasco.
Email: riccardo.velasco@crea.gov.it
(CREA-DC) Francesco Faggioli, Luca Ferretti, Elisabetta Gargani, Pio Federico Roversi
Email: piofederico.roversi@crea.gov.it