

Confronto tra gestione integrata, biologica e biodinamica in vigneto: caratteristiche quali-quantitative delle uve nel periodo 2012-2015

Roberto Zanzotti^{1*}, Enzo Mescalchin¹, Giorgio Nicolini², Tomás Román Villegas², Mario Malacarne²

¹ *Unità Agricoltura Biologica - Fondazione E. Mach, S. Michele all'Adige (TN)*

² *Unità Chimica Vitienologica & Agroalimentare - Fondazione E. Mach, S. Michele all'Adige (TN)*

Introduzione

Scopo della sperimentazione, tuttora in corso, è un confronto tra i sistemi di coltivazione integrato, biologico e biodinamico.

Materiali e metodi

La sperimentazione ha preso avvio nell'autunno 2011 in un vigneto (1,83 ha) della Fondazione E. Mach di San Michele all'Adige (Trento) messo a dimora nel 2009 e allevato a pergola semplice trentina (2,8 x 0,5 m). Il vigneto comprende due varietà Pinot bianco (cloni LB 16 e LB 18) e Riesling renano (cloni 198-10 GM e 239-25 GM) entrambi su portainnesto SO4. Il vigneto è diviso in parcelloni replicati nei quali nelle diverse tesi si riproducono le pratiche colturali proprie di ciascuna gestione in funzione dell'andamento stagionale e delle necessità contingenti. Nell'autunno 2011 sulla tesi biodinamica è stata eseguita la lavorazione dell'interfilare, la semina di un miscuglio per sovescio e l'aspersione del preparato 500. Dal 2012 sono state effettuate difesa e pratiche agronomiche diversificate nelle tre gestioni. Nelle parcelle a gestione integrata si esegue diserbo chimico del filare, sfalcio dell'erba sull'interfilare e concimazione minerale primaverile (40 unità di azoto/ha) con concime complesso 12-12-17. Si effettuano interventi di riduzione della compattezza del grappolo utilizzando acido gibberellico in fioritura. Vengono eseguite sfogliatura pneumatica e cimatura meccanica. La difesa è basata sull'utilizzo di prodotti fungicidi di sintesi talvolta in miscela con rame e zolfo. Nelle parcelle a gestione biologica per il controllo delle erbe sul filare si eseguono lavorazioni meccaniche mentre l'interfilare è sfalcato. Si esegue la sfogliatura pneumatica e

l'arrotolamento dei germogli sull'ultimo filo della pergola in alternativa alla cimatura. La difesa prevede l'utilizzo esclusivo di rame e zolfo. Nel 2014 è stato eseguito un intervento di concimazione organica (compostato di tralci di potatura e letame) per uniformare l'apporto di azoto distribuito nelle parcelle a gestione integrata. Nella gestione biodinamica si impiegano i preparati 500 e 501, si eseguono sovesci autunno-primaverili a filari alterni. La sfogliatura è stata sostituita con la rimozione manuale delle femminelle lungo la parte prossimale e mediana dei tralci. L'arrotolamento dei tralci, il controllo delle malerbe sul filare e la difesa fitosanitaria sono state eseguite con le stesse modalità della gestione biologica.

Alla vendemmia sono stati eseguiti rilievi per la valutazione della sanità delle uve, produzione, numero germogli e grappoli per ceppo. Riguardo gli aspetti sanitari per ogni anno considerato sono stati controllati 100 grappoli ripetuti per 5 volte/gestione mentre per i rapporti vegeto produttivi sono state campionate 60 viti/gestione. Per le analisi sui mosti sono stati prelevati 16 campioni di uva/gestione su ciascuno dei quali sono stati determinati con spettrometro IR zuccheri, acidità totale, pH, acido tartarico e malico, potassio e APA. Alla potatura è stato rilevato il legno prodotto e determinato l'indice di Ravaz. Sono presentati i dati aggregati delle annate 2012, 2013 e 2015. L'annata 2014 è stata esclusa dall'elaborazione a causa di una grave grandinata che ha compromesso la produzione. I dati sono stati elaborati utilizzando il software StatSoft, STATISTICA 9.1 applicando l'analisi ANOVA e test di Tukey ($p < 0,05$).

Risultati e discussione

In tabella 1 sono riportati i risultati vegeto-produttivi derivanti dalla media di 3 annate. La produzione di uva per ceppo è significativamente maggiore nella

*roberto.zanzotti@fmach.it

tesi biodinamica su Riesling. Nelle tesi biodinamiche la produzione di legno per ceppo è sempre minore rispetto alla gestione integrata. L'indice di Ravaz è maggiore nelle tesi biologiche e biodinamiche sia su Pinot bianco che su Riesling. La botrite risulta statisticamente maggiore per Pinot bianco nella tesi biodinamica rispetto alla integrata ma non differisce dalla gestione biologica. Su Riesling la tesi biodinamica è statisticamente maggiore rispetto alla gestione biologica e integrata.

In tabella 2 sono riportati i risultati delle analisi dei mosti. I livelli di APA manifestano differenze tra le tesi e si attestano in tutti i casi su valori bassi (Nicolini *et al.*, 2004; Mescalchin *et al.*, 2013). Su Pinot bianco la tesi integrata supera 100 mg, mentre quella biodinamica si ferma a 76 e quella biologica a 62. Su Riesling le differenze sono più contenute e si rileva significatività tra la tesi integrata (91 mg) e le tesi biodinamica e biologica (rispettivamente 68 e 63 mg).

Conclusioni

Si rileva un contenuto molto basso di azoto prontamente assimilabile in particolare nelle gestioni biologica e biodinamica. Il solo apporto della sostanza organica fornita dal sovescio autunnale a filari alterni si è dimostrato insufficiente a mantenere il vigore delle viti.

Bibliografia

- NICOLINI G., LARCHER R., VERSINI G., 2004. *Status of yeast assimilable nitrogen in Italian grape musts and effects of variety, ripening and vintage*. *Vitis* 43 (2): 89–96.
- MESCALCHIN E., ZANZOTTI R., BERTOLDI D., LARCHER R., MALACARNE M., NICOLINI G., ROMAN T., 2013. *Grape composition changes during conversion to organic and biodynamic cultivation*. 18th International Symposium of the Group of International Experts of Vitivinicultural Systems for CoOperation (GiESCO), 7th–11th July 2013.

Tab. 1 - Risultati vegeto produttivi (media delle annate 2012, 2013 e 2015) rilevati su 3 diverse gestioni per Pinot bianco e Riesling Renano. Lettere diverse indicano differenze significative per singola varietà secondo il test Tukey con $p < 0,05$.

Tab. 1 - *Effects of management on vegetative and productive parameters (means of 2012, 2013 and 2015) for Pinot blanc and Rhine Riesling. Means followed by different letters are significantly different for each cultivar according to Tukey test for $p < 0,05$.*

Parametri	Pinot bianco			Riesling Renano		
	Integrata	Biologica	Biodinamica	Integrata	Biologica	Biodinamica
Tralci/ceppo	11,8 a	11,2 ab	10,9 b	10,5 a	9,4 b	9,5 b
Grappoli/ceppo	14,8 ns	14,1 ns	14,0 ns	18,8 ns	17,6 ns	18,6 ns
Uva/ceppo (kg)	2,11 ns	2,28 ns	2,16 ns	1,87 b	1,88 b	2,07 a
Peso medio grappolo (g)	143 c	163 a	154 b	100 b	110 a	114 a
Grappoli/tralcio	1,26 ns	1,26 ns	1,30 ns	1,79 b	1,89 ab	1,95 a
Legno/ceppo (kg)	0,33 a	0,31 ab	0,28 b	0,36 a	0,31 b	0,31 b
Indice di Ravaz	7,1 b	8,6 a	9,1 a	5,7 c	6,9 b	7,7 a
Botrite grado di attacco (%)	0,81 b	1,09 ab	3,08 a	3,97 b	5,94 b	9,08 a

Tab. 2 - Composizione dei mosti (media delle annate 2012, 2013 e 2015) rilevata su 3 diverse gestioni per Pinot bianco e Riesling Renano. Lettere diverse indicano differenze significative per singola varietà secondo il test Tukey con $p < 0,05$.

Tab. 2 - *Effects of management on must parameters (means of 2012, 2013 and 2015) for Pinot blanc and Rhine Riesling. Means followed by different letters are significantly different for each cultivar according to Tukey test for $p < 0,05$.*

Parametri	Pinot bianco			Riesling Renano		
	Integrata	Biologica	Biodinamica	Integrata	Biologica	Biodinamica
Brix	20,6 ab	20,8 a	20,3 b	19,9 b	20,6 a	20,2 b
pH	3,28 a	3,25 b	3,22 b	3,12 a	3,09 b	3,09 b
Acidità totale (g/l)	5,13 ns	5,04 ns	5,02 ns	6,18 ns	6,26 ns	6,34 ns
Acido tartarico (g/l)	6,77 a	6,53 b	6,55 ab	6,83 ns	6,89 ns	6,96 ns
Acido malico (g/l)	2,08 a	2,06 ab	1,94 b	2,34 ns	2,24 ns	2,27 ns
Potassio (mg/l)	1556 a	1519 a	1442 b	1301 ns	1299 ns	1302 ns
APA (mg/l)	109 a	62 c	76 b	91 a	63 b	68 b

Vini di territorio sostenibili (VTS): applicazione su scala aziendale di un approccio integrato tra strategie di difesa e supporto dei DSS in Friuli Venezia Giulia

Giovanni Bigot^{1*}, Davide Mosetti¹, Michele Stecchina¹, Paolo Sivilotti², Lorenzo Bigot¹

¹ Perleuve S.r.l., Cormons (GO)

² Università degli Studi di Udine

Sustainable territorial wines (STW): field-scale application of DSS and best practices to manage plant defense in Friuli Venezia Giulia

Abstract. A four-year project was carried out in collaboration with winegrowers of the main wine-production areas of Friuli Venezia Giulia, applying the most updated knowledge concerning integrated and organic pest management. The sprayings were positioned based on indications of Vite.net® DSS while the assessment of diseases/pests in the fields was monitored with GPS tools and lately with the app 4GRAPES. The method allowed decreasing the number of sprayings by 3 and 2 in case of integrated and organic vineyard management, respectively, as compared with the baseline strategies usually applied by the winegrowers in the same area.

Key words: integrated pest management, organic pest management, sprayer efficacy, DSS, pesticide rates.

Introduzione

Nella direttiva 128/09/CE vengono inquadrati un insieme di azioni riguardanti l'utilizzo sostenibile dei pesticidi. Gli strumenti di cui oggi il viticoltore si può servire, hanno la possibilità di indirizzare le scelte verso prodotti fitosanitari con classe tossicologica più favorevole, di evidenziare con sicurezza i momenti di rischio per l'infezione di una data patologia, di stimare la copertura di una determinata sostanza attiva nel tempo. Vite.net® è un sistema di supporto alle decisioni (sviluppato da Horta S.r.l., www.horta-srl.com) progettato per aiutare l'agronomo che lavora in vigneto a prendere decisioni più informate e quindi più corrette (Salinari et al. 2012; Rossi et al. 2014). Gli out-

put di questi modelli, aggiornati di ora in ora, offrono informazioni su aspetti chiave della gestione del vigneto: la difesa dalle malattie fungine e dagli insetti, la protezione assicurata dall'ultimo trattamento effettuato, lo sviluppo della pianta, gli stress termici e idrici. Il corretto posizionamento dei trattamenti, infatti, consente un adeguato controllo della malattia. Inoltre, la possibilità di conoscere per tempo il momento in cui vi sarà un periodo infettivo permette di utilizzare fungicidi preventivi di copertura, con conseguente risparmio, minore impatto ambientale e minori rischi di insorgenza di ceppi resistenti. Così negli ultimi anni alcune aziende hanno aderito ad un progetto di difesa sostenibile, e nell'ambito del progetto Interreg VISO, si è voluto investigare come queste strategie potevano contenere lo sviluppo delle patologie della vite, con particolare riferimento alla peronospora (*Plasmopara viticola* Berk. e Curtis, Berk. e De Toni).

Materiali e metodi

Nelle stagioni 2012-15 sono state messe in campo diverse strategie di difesa sostenibile sia per aziende convenzionali che biologiche. Dal 2012 al 2015 le superfici interessate sono state 345, 611, 741 e 900 ha. Il metodo di lavoro ha previsto:

- un monitoraggio dettagliato di funghi/insetti tramite un database implementato su palmare GPS dotato di database dedicato per raccogliere dati di campo georiferiti, organizzati, completi ed ordinati. L'evoluzione del sistema di monitoraggio in campo è sfociata nello sviluppo dell'applicazione 4GRAPES programmata per essere utilizzata su qualsiasi dispositivo portatile disponibile sul mercato (Smartphone, Tablet, ecc.). Le informazioni raccolte vengono inviate ad un servizio di "cloud computing" in cui i dati vengono elaborati in tempo reale; in questa fase un sistema di controllo permette di valutare la precisione dei dati indicando i possibili errori;

* giovanni@perleuve.it

- l'utilizzazione del modello vite.net® per la valutazione delle infezioni di peronospora e oidio e dei voli delle tignole;
- il controllo operativo e funzionale degli atomizzatori utilizzando cartine idrosensibili posizionate in differenti parti della chioma; l'elaborazione dei risultati ha permesso di migliorare la distribuzione dei trattamenti selezionando gli ugelli e le condizioni operative più opportune.
- la selezione delle sostanze attive sulla base del rischio ambientale e dell'efficacia.

Sono state impostate tre linee di difesa, biologica, integrata ed integrata avanzata, dove l'ultima prevedeva delle ulteriori diminuzioni del numero di trattamenti e delle sostanze attive. Numero di interventi, dosi e miscele fitosanitarie sono stati definiti in base alla fase fenologica della vite, pressione dell'avversità, previsioni del modello e livello di rischio assunto dall'azienda. Nella difesa Biologica i criteri di scelta sono stati la limitazione al numero minimo possibile di trattamenti e la riduzione di rame metallo secondo fase fenologica della vite, pressione dell'avversità e previsioni del modello, con l'obiettivo di ottenere la massima efficacia. Gli interventi sono stati consigliati sempre prima delle piogge infettanti.

Sono stati sommati i danni da peronospora (intensità massima percentuale registrata in uno specifico vigneto durante la stagione) separati per azienda e riportati alla superficie del vigneto colpito. Il danno così calcolato è stato riferito all'intera superficie aziendale (compresa anche quella non colpita dall'avversità) per ottenere un'indicazione sul danno totale subito dai vigneti aziendali a causa di infezioni peronosporiche. I dati sono stati calcolati separatamente per foglie e grappoli. Il costo medio delle strategie è stato poi calcolato direttamente utilizzando i prezzi degli agrofarmaci come desunti dalle fatture di acquisto.

Risultati e discussione

L'implementazione del DSS vite.net® e degli altri

Tab. 1 - numero di trattamenti antiperonosporici messi a confronto con medie regionali nel periodo 2012-2015.

Tab. 1 - number of spraying interventions against downy mildew compared with the regional averages in the years 2012-15.

Conduzione	Numero trattamenti			
	2012	2013	2014	2015
Integrato Avanzato	10	11	12	10
Integrato	11	11	13	12
Media Integrato Consorzio	13	14	17	14
Biologico	14	14	14	12
Media Biologico Consorzio	15	15	20	17

strumenti previsti nel programma di viticoltura sostenibile, ha permesso di ridurre il numero di interventi in campo in entrambi i casi di difesa biologica o integrata. Nel dettaglio i trattamenti effettuati con le strategie proposte sono riportati in tabella 1: nel caso della difesa integrata si sono evitati da 2 a 4 trattamenti a seconda dell'annata, mentre nel caso della conduzione biologica i trattamenti evitati sono stati da 1 fino a 6 nel 2014, annata particolarmente difficile per la gestione della peronospora.

Nel caso della difesa biologica i quantitativi di rame ad ettaro applicati sono stati limitati tra 2,5 e 6 kg/ha, con il quantitativo più alto nel 2014.

L'efficacia dei metodi applicati per la gestione della difesa ha permesso di raggiungere ottimi livelli di efficacia contro peronospora (il danno da peronospora viene espresso come danno percentuale medio di tutte le foglie/grappoli esaminati). Nella difesa integrata i danni registrati sono stati inferiori al 2,5% su foglia e 1,4% su grappolo, mentre per quella biologica i danni registrati sono stati inferiori al 4,0% su foglia e 3,2% su grappolo, con i massimi relativi sempre all'annata 2014. Il risparmio per l'acquisto dei prodotti fitosanitari è risultato in media negli anni di 190 €/ha e 150 €/ha, rispettivamente per la difesa integrata e biologica, a confronto con le medie regionali.

Conclusioni

Le strategie sostenibili proposte hanno evidenziato l'importanza di utilizzare un DSS quale vite-net® ed un sistema di monitoraggio organizzato (4GRAPES) al fine di seguire lo sviluppo delle patologie e programmare accuratamente la difesa fito-sanitaria. Dai risultati ottenuti si intuisce chiaramente come sia possibile condurre una difesa rispettosa dell'ambiente, mirando gli interventi quando necessari ed utilizzando sostanze attive con una classificazione tossicologica più favorevole e a dosaggi corretti. Gli strumenti utilizzati hanno permesso di evidenziare quali sono le reali necessità di utilizzo del rame, a confronto con quanto previsto dalla normativa corrente, e cosa dovremmo mettere in campo in futuro qualora questi limiti dovessero scendere ulteriormente.

Bibliografia

- DIRETTIVA 2009/128/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 21 ottobre 2009.
- ROSSI V., SALINARI F., PONI S., CAFFI T., BETTATI T., 2014. *Addressing the implementation problem in agricultural decision support systems: the example of vite.net*. Computers and Electronics in Agriculture, 100: 88-99.
- SALINARI F., PONI S., ROSSI V., 2012. *Vite.net™, gestione del*

Flavescenza dorata in viticoltura integrata e biologica: perché e' ancora un problema?

Vally Forte¹, Nadia Bertazzon¹, Luisa Filippin¹, Walter Biasi², Elisa Angelini^{1*}

¹CREA-Centro Ricerca in Viticoltura, Conegliano (TV)

²Progetto Natura, studio associato, Santa Lucia di Piave (TV)

Flavescenze doree in integrated and organic viticulture: why is still a problem?

Abstract. In the past *Flavescence dorée* (FD) has been a very dangerous problem for the viticulture in North-East Italy. Today the disease is contained by the control of the vector, *Scaphoideus titanus* Ball, and the uprooting of infected grapevines; however serious epidemic still occurs mainly in organic wine farms, but not only. This work is aimed to highlight the critical points causing these outbreaks through the analysis of the phytosanitary management in three wine farms, integrated and organic, in the Veneto region. The multi-year work involved the application of correct insecticide treatments, the monitoring of the insect vector, the identification and uprooting of the infected grapevines. The infection incidence was drastically reduced as a result of the infected plant removal, which represented a very high investment in the first year, and thanks to the leafhopper monitoring, which allowed improving the insecticide management. It was noticed that longer periods are needed to obtain the results in organic farms compared to integrated ones. Wrong agricultural management, unknown exotic leafhopper occurrence and untreated or wild neighbouring grapevines could make it difficult to achieve the expected sanitary targets.

Key words: insecticides, management, *Scaphoideus titanus*, yellows disease.

Introduzione

La Flavescenza dorata (FD) è una malattia da giallumi della vite molto grave e di quarantena in Europa. E' causata da fitoplasmi del gruppo ribosomico

16SrV-C e D, trasmessi dalla cicalina *Scaphoideus titanus*. In passato la malattia ha causato gravi danni nel Nordest Italia, dove attualmente viene tenuta sotto controllo tramite l'utilizzo di insetticidi contro il vettore e l'estirpo delle piante sintomatiche. Ancora oggi, però, si manifestano pericolose situazioni epidemiche in vigneto, per lo più confinate a singole aziende. Il presente lavoro vuole mettere a fuoco le criticità delle singole realtà viticole con problemi diffusi di FD, al fine di comprenderne le cause e verificare l'efficacia delle correzioni apportate.

Materiali e metodi

Sono state prese in esame tre aziende vitivinicole, presenti in due distretti del Veneto ad alta vocazione viticola, il Prosecco DOCG (AZ1) ed il Lison-Pramaggiore DOC (AZ2 e AZ3), dove i trattamenti insetticidi sono obbligatori in presenza di *S. titanus*.

In ciascuna azienda sono state eseguite le analisi molecolari (Angelini et al. 2007) per individuare i fitoplasmi presenti e, dal 2013 al 2015, sono stati presi in esame alcuni aspetti gestionali: l'applicazione degli insetticidi, valutando efficacia del principio attivo, tempistica e numero di interventi (conteggiando le forme giovanili del vettore, secondo Lessio (2006), prima e dopo i trattamenti); l'estirpo delle piante con sintomi prima che fungessero da inoculo; la presenza di adulti della cicalina, mediante trappole cromotropiche gialle (20 cm x 24.5 cm) da luglio a settembre e sostituite ogni 15 giorni. Le cicaline sono state identificate tramite Biedermann e Niedringhaus (2004).

Risultati e discussione

Nell'AZ1, a conduzione biologica, nel 2012 sono stati segnalati gravi problemi di FD in due vigneti di cv Glera. L'incidenza della malattia era del 20% nel vigneto più infetto, dove l'anno precedente erano già

* elisa.angelini@crea.gov.it

state sostituite circa metà viti, e del 10% nell'altro vigneto. I trattamenti insetticidi erano stati svolti regolarmente ogni anno, ma senza efficacia, a causa, nel primo caso, della migrazione del vettore dal bordo esterno, dove cresceva una radura boschiva con viti inselvaticate, e, nel secondo caso, dell'eccessiva vigoria, che non permetteva una buona bagnatura fogliare. La situazione è stata affrontata estirpando le viti con sintomi, eliminando la radura boschiva e utilizzando insetticidi sistemici (questa parte dell'azienda è passata alla conduzione integrata). Dal 2013 è stato effettuato un monitoraggio anche sul resto dell'azienda, dove sono state riscontrate problematiche simili, ma meno gravi, in due zone: un terrazzamento, non raggiungibile da macchine trattatrici, dove i trattamenti venivano effettuati a distanza; ed un vigneto confinante con una siepe di *Thuja occidentalis* e ceppi di *Olea europaea*. Qui, però, in tre anni la situazione è migliorata in maniera lenta, mettendo in luce i limiti della gestione biologica soprattutto nel tenere sotto controllo la cicalina: infatti, anche se due trattamenti con piretro all'anno (eseguiti di notte e acidificando l'acqua) hanno effettivamente abbassato la popolazione rispettivamente da 5 a 0,2 e da 2,5 a 0,3 individui per vite, le trappole hanno continuato a catturare numerosi esemplari. Inoltre sono stati rinvenuti 3 esemplari di *S. titanus* su tuja e 11 su ulivo, dove l'insetto, stazionando per brevi periodi, sfugge ai trattamenti.

Nell'AZ2, a conduzione integrata, lo studio si è concentrato in due aree di cv Glera, dove erano presenti sia FD sia Legno nero (LN). L'applicazione di insetticidi a base di thiamethoxam, associata all'estirpo delle viti sintomatiche, ha risolto la situazione in 3 anni, riducendo notevolmente la popolazione del vettore. Tuttavia, è stata rilevata la migrazione della cicalina da vigneti confinanti.

Nell'AZ3 lo studio si è concentrato su alcune varietà altamente compromesse (cv Merlot, cv Pinot grigio e cv Chardonnay) attorno ad una zona focolaio contenente sia FD che LN. Nel 2013 il rilievo delle forme giovanili ha constatato la buona efficacia dei trattamenti con piretro, che hanno abbassato la popolazione da 1,13 a 0,3 esemplari per vite. In seguito la malattia è stata riscontrata anche su altri appezzamenti, dove l'eliminazione delle viti infette e del vettore, con l'uso di insetticidi sistemici, ha risolto il problema in tre anni. Il passaggio dalla coltivazione biologica all'integrata ha abbreviato i tempi necessari al raggiungimento degli obiettivi prefissati.

Oltre a 1114 *S. titanus*, le 298 trappole installate nelle tre aziende hanno catturato anche altre 31 specie di cicaline, per un totale di 1833 esemplari. Le specie maggiormente presenti sono state: *Acanalonia conica*

(63 individui), *Cixius wagneri* (61), *Dictyophara europaea* (47), *Hishimonus hamatus* (281), *Japananus hyalinus* (176), *Neotalitrus fenestratus* (443), *Orientus ishidae* (165), *Platymetopius major* (127) e *Stictocephala bisonia* (115). Alcune di esse sono da poco presenti in Italia, come *A. conica*, *J. hyalinus*, *O. ishidae* e *H. hamatus*; inoltre alcune sono riportate essere vettori di fitoplasmii (*D. europaea*) o potenziali (*C. wagneri*, *N. fenestratus*, *O. ishidae*) o affini a specie che lo sono (*H. hamatus*).

Conclusioni

Tre anni di osservazioni in tre aziende con problemi di FD hanno permesso di riconoscere i punti deboli che le hanno rese vulnerabili alla diffusione della malattia. È risultata fondamentale la corretta applicazione insetticida (tempistica e numero di trattamenti, tipo di prodotto, buona bagnatura fogliare). Inoltre il controllo delle forme giovanili del vettore (che nessuna azienda era in grado di fare) è stato determinante per migliorare la tempistica e verificare l'efficacia dei trattamenti. Tutti i prodotti utilizzati hanno abbassato la popolazione di *S. titanus*, ma in tempi molto più lunghi nel caso del piretro, meno efficace. La presenza di siepi di bordo e vigneti confinanti non trattati o abbandonati, dove *S. titanus* e altre cicaline potenziali vettori possono trovare rifugio, è risultato uno dei maggiori punti critici. Il monitoraggio delle viti richiede capacità di riconoscere i sintomi fin dalla loro primissima comparsa e manodopera preparata ad eseguire in tempi brevi l'estirpo. È emersa l'importanza di una conoscenza approfondita del vettore e della malattia per la corretta gestione. Perciò risulta indispensabile il supporto di consulenti preparati e partecipi in tutte le scelte dell'azienda, nonché il continuo confronto con Enti di ricerca presenti sul territorio, affinché il costante scambio di informazioni fornisca ai ricercatori ed ai tecnici gli elementi necessari a trovare le risposte utili per le aziende stesse.

Bibliografia

- ANGELINI E., BIANCHI GL., FILIPPIN L., MORASSUTTI C., BORGO M., 2007. A new TaqMan method for the identification of phytoplasmas associated with grapevine yellows by real-time PCR assay. *Journal of Microbiological Methods*, 68: 613-622.
- BIEDERMANN R., NIEDRINGHAUS R., 2004. Die Zikaden Deutschlands. *Bestimmungstabellen für alle Arten*. (Osnabrück), 409 pp.
- LESSIO F., 2006. *Cromotassia, capacità di spostamento ed influenza dell'agroecosistema vigneto sull'attività di volo di Scaphoideus titanus Ball con possibili applicazioni per il monitoraggio e per la difesa*. Tesi di dottorato, 98 pp.

Caratterizzazione della biodiversità viticola: tolleranza a peronospora (*Plasmopara viticola*) e analisi dell'espressione di geni codificanti per stilbene sintasi in specie e cultivar del genere *Vitis*

Massimo Muganu¹, Marco Paolocci¹, Annarita Paolacci², Mario Ciaffi^{2*}

¹ Dipartimento di Scienze Agrarie e Forestali (DAFNE), Università della Tuscia, Viterbo

² Dipartimento per la Innovazione nei Sistemi Biologici, Agroalimentari e Forestali (DIBAF), Università della Tuscia, Viterbo

Characterization of grapevine germplasm: resistance to downy mildew (*Plasmopara viticola*) and expression analysis of stilbene synthase genes in cultivars and species of *Vitis* genera

Abstract. The study of plant varieties with adaptive traits of tolerance to stress is a key strategy in improving the plant-environment interaction. Grapevine germplasm includes minor and local accessions whose agronomic characteristics and tolerance to biotic stress are still poorly known. Among the natural defense mechanisms, the production of stilbenic phytoalexins following infection with *Plasmopara viticola* has been described. Stilbene are low molecular weight compounds naturally present in many families of the vegetable kingdom including many species of the *Vitis* genera. The aims of this study were to characterize the level of tolerance to *P. viticola* in different species and varieties of the *Vitis* genera and to analyze, in the same genotypes, the expression of genes coding for stilbene synthase (STS), the key enzyme in the stilbene synthesis.

Key words: disease resistance, grape quality, local varieties, sustainable viticulture.

Introduzione

Lo studio di vitigni con caratteri adattativi di tolleranza a stress è una strategia chiave nel miglioramento dell'interazione pianta-ambiente di coltivazione. Negli ultimi anni numerose ricerche e collaborazioni scientifiche sono state finalizzate alla raccolta e conservazione di germoplasma di vite. Il germoplasma

viticolo include varietà minori o locali le cui caratteristiche viticole, enologiche e di tolleranza a stress biotici sono ancora poco conosciute (Paolocci et al. 2014). Tra i meccanismi di difesa naturali presenti nella vite è stata descritta, a seguito dell'infezione di *Plasmopara viticola*, la produzione di fitoalessine di natura stilbenica. Gli stilbeni sono composti a basso peso molecolare naturalmente presenti in molte famiglie del regno vegetale e in molte specie del genere *Vitis*, compresa *V. vinifera*. Sono presenti in maniera costitutiva negli organi legnosi della vite, compresi i semi, ma sono anche sintetizzati come fitoalessine in organi o tessuti erbacei della pianta in seguito a risposta indotta. Comprendono numerose sostanze: oltre al resveratrolo, con forme isomeriche cis e trans, sono stati descritti glucosidi del resveratrolo come piceide e resveratroloside (Mattivi et al., 2011) e numerose molecole derivate dalla sua polimerizzazione, tra cui le più importanti sono le viniferine (Gindro et al., 2003) e lo pterostilbene.

Obiettivi del lavoro sono la caratterizzazione dei livelli di tolleranza di varietà e specie appartenenti al genere *Vitis* a *P. viticola* e l'analisi, negli stessi genotipi, dell'espressione di geni codificanti per stilbene sintasi (STS), enzima chiave nella sintesi di stilbeni.

Materiali e metodi

Per quanto riguarda *V. vinifera* spp sativa sono state utilizzate le accessioni Aleatico n. VTG, Canaiolo n. CM VT1, Bellone b. VT5, Trebbiano g. RS VT6 e Trebbiano t. b. TR VTT, già descritte nell'Italian *Vitis* Database. A queste sono stati aggiunti l'ibrido Isabella edue biotipi di *V. vinifera* spp *sylvestris* rinvenuti negli areali dei Monti della Tolfa e dei Monti Cimini (Regione Lazio). Infine, la varietà suscettibile Chasselas e l'ibrido resistente Solaris sono stati impiegati come controlli. Sono state

* ciaffi@unitus.it

effettuate prove di infezione in ambiente controllato su piante in vaso utilizzando una soluzione inoculante contenente 1×10^5 zoosporangi/ml. L'incidenza della malattia è stata valutata come percentuale di foglie manifestanti sintomi, mentre la severità come percentuale di superficie sporulante. I dati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA).

Data la complessità della famiglia genica codificante per stilbenesintasi (STS) in vite (Vannozzi *et al.*, 2012), nel nostro studio per l'identificazione di sequenze geniche STS non ridondanti e accuratamente annotate, abbiamo utilizzato la banca dati NCBI. Le sequenze nucleotidiche di riferimento identificate che contenevano l'intera regione codificante dei geni STS sono state utilizzate per sintetizzare primers specifici per analizzare la loro espressione mediante PCR quantitativa real-time utilizzando RNA estratto dalle foglie campionate dai diversi genotipi considerati a 0, 16, 24, 48 h e 72 h dopo l'infezione.

Risultati e discussione

I risultati ottenuti hanno messo in evidenza differenze significative nella incidenza e severità dei sintomi tra i vitigni. Sia per l'incidenza che per la severità della malattia i valori più elevati sono stati evidenziati nelle accessioni a bacca nera Aleatico n. VTG e Canaiolo n. CM VT1 e nella accessione a bacca bianca Trebbiano t. b. TR VTT, che hanno evidenziato i livelli minori di tolleranza. Una minore suscettibilità alla malattia è stata invece rilevata in Bellone b. VT5, Trebbiano g. RS VT6 e in *V. vinifera* spp *sylvestris*. Il controllo Solaris ha evidenziato valori nulli sia di incidenza che di gravità. L'ibrido Isabella ha evidenziato livelli elevati di tolleranza a peronospora come in precedenti osservazioni (Brown *et al.*, 1999).

Mediante diverse strategie di ricerca effettuate nella banca dati NCBI sono state individuate nel genoma della vite 31 sequenze STS funzionali, due delle quali localizzate sul cromosoma 10 e le rimanenti 29 in due distinti "cluster" nella regione distale del cromosoma 16. Sulla base di analisi filogenetiche le 31 sequenze identificate sono state suddivise in tre gruppi: le due localizzate sul cromosoma 10 sono state assegnate al gruppo filogenetico A, 19, localizzate sul cromosoma 16 al gruppo B, e le rimanenti 10 sempre localizzate sul cromosoma 16, al gruppo C. Data la complessità della famiglia genica STS in vite e l'elevata omologia di sequenza evidenziata per molti dei suoi membri, è stato possibile disegnare primer specifici solo per 8 delle 31 sequenze STS identificate. Per i rimanenti 23 geni sono stati disegnati primer conservati tra sequenze molto simili al fine di analiz-

zare la loro espressione totale. I primer conservati disegnati amplificano da due a quattro sequenze molto simili.

Le analisi di espressione, condotte nei diversi genotipi di vite in seguito all'infezione di *P. viticola*, hanno evidenziato che le maggiori differenze nel livello di trascrizione dei geni STS sono rilevate soprattutto per alcuni membri appartenenti al gruppo B. Questi risultati sono in accordo con precedenti osservazioni secondo cui i geni STS appartenenti al gruppo B evidenziano il più elevato livello di induzione in risposta a diversi stress biotici ed abiotici (Vannozzi *et al.*, 2012). E' comunque importante sottolineare che alcuni geni STS sono regolati in maniera differenziale nei diversi genotipi in seguito all'infezione e che è possibile riscontrare significative differenze tra i vitigni tolleranti e quelli suscettibili sia nella quantità dei trascritti dei geni STS che nel loro profilo di espressione temporale.

Conclusioni

La disponibilità di vitigni o cloni selezionati tolleranti alle malattie fungine è diventata una strategia chiave in molte zone viticole. Lo studio delle caratteristiche morfologiche e delle basi genetiche che regolano la risposta della vite a stress con l'attivazione di meccanismi di difesa naturali, potrebbe consentire progressi significativi nello sfruttamento delle risorse genetiche e nell'uso della selezione assistita mirata al miglioramento della qualità delle uve e alla riduzione dei costi ambientali.

Lavoro svolto in parte con fondi FILAS, progetto MIGLIORA

Bibliografia

- BROWN M.V., MOORE J.N., FENN P., MCNEW R., 1999. *Comparison of leaf disk, greenhouse and field screening procedures for evaluation of grape seedlings for downy mildew resistance*. Hort science 34(2): 331-333.
- GINDRO K., PEZET R., VIRET O., 2003. *Histological study of the responses of two Vitis vinifera cultivars (resistant and susceptible) to Plasmopara viticola infections*. Plant Physiology and Biochemistry, 41: 846-853.
- MATTIVI F., VRHOSEK U., MALACARNE G., MASUERO D., ZULINI L., STEFANINI M., MOSER C., VELASCO R., GUELLA G., 2011. *Profiling of resveratrol oligomers, important stress metabolites, accumulating in the leaves of hybrid Vitis vinifera (Merzling x Terodelgo) genotypes infected with Plasmopara viticola*. J. Agricultural and Food Chemistry 59: 5364-5375.
- PAOLOCCI M., MUGANU M., ALONSO-VILLAVARDE, V., GINDRO K., 2014. *Leaf morphological characteristics and stilbene production differently affect downy mildew resistance of Vitis vinifera varieties grown in Italy*. Vitis 53: 155-161.
- VANNOZZI A., DRY I.B., FASOLI M., ZENONI S., LUCCHINI M., 2012. *Genome-wide analysis of the grapevine stilbene synthase multi-gene family: genomic organization and expression profiles upon biotic and abiotic stresses*. BMC Plant Biology, 12: 130.

Prove preliminari sull'applicazione del naso elettronico per la diagnosi precoce di *Plasmopara viticola*

Andrea Bellincontro*, Alessia Tomassini, Gabriele Chilosi, Andrea Vannini, Anna Maria Vettrano, Fabio Mencarelli

DIBAF, Università della Tuscia, Viterbo

Introduzione

Una delle voci di bilancio che maggiormente incide sui costi del settore vitivinicolo è la spesa sostenuta per la lotta alla peronospora della vite (*Plasmopara viticola*). Nonostante l'intenso uso di prodotti fitosanitari, i danni rilevabili sono decisamente significativi e, d'altro canto, l'elevato impiego di fitofarmaci contrasta con la tendenza della filiera vitivinicola a produrre vini salubri attraverso tecniche agronomiche e di trasformazione ecosostenibili. *Plasmopara viticola* è un patogeno biotrofo, dotato di strettissima affinità con l'acqua, che può dar luogo a danneggiamenti a carico di tutte le parti vegetative della pianta: germogli, foglie e grappoli. Le infezioni di tipo primario (sessuale) sono seguite da cicli secondari (asessuali) e, comunemente, i due cicli possono sovrapporsi nel corso della stagione. È dimostrato che la germinazione delle oospore è scalare durante la stagione vegetativa e l'inoculo derivante dalle oospore è molto virulento e può permanere nel vigneto per più anni (Caffi et al., 2009). La presenza di un patogeno è spesso associabile al rilascio di marcatori volatili (VOCs), derivabili dal metabolismo dello stesso o da una risposta da parte della pianta allo stress biotico subito (Jansen et al., 2009). Il naso elettronico ed i sensori ad esso abbinati hanno una loro funzionalità applicativa come mezzi di rilevazione analitica, relativamente rapida e non-distruttiva, della presenza di composti aromatici (Baietto et al., 2013). Abbinati a tecniche chemiometriche, possono diventare degli strumenti di rilevazione, possibilmente in stadio precoce, dell'infezione, basati sulla rilevazione degli stessi VOCs.

Materiali e metodi

L'identificazione dei VOCs prodotti durante il processo infettivo di *Plasmopara v.* è stata eseguita al GC-MS secondo un metodo in SPME in spazio di

testa ottenuto all'interno di barattoli in vetro opportunamente dotati di setti perforabili. Sono state impiegate foglie prelevate da plantule di *Vitis v.* var. Grechetto (clone G109) allevate in cella climatica ed inoculate con *Plasmopara v.* in momenti diversi: 1) 3 giorni prima delle acquisizioni (inoculo 3gg); 2) una settimana prima delle acquisizioni (inoculo 7gg). Il medesimo spazio di testa è stato contestualmente analizzato mediante un naso artificiale (E-Nose), della tipologia QMB (Quartz Micro-Balance sensors), opportunamente adattando il protocollo riportato in Santonico et al. (2010). Dalle determinazioni GC-MS sono stati desunti alcuni markers volatili non caratterizzati quantitativamente, ma valutati in forma di abbondanza relativa; differenti tempi di accumulo in spazio di testa hanno costituito una significativa variabile sperimentale. Risposta gascromatografica e dati ottenuti dalle misure E-nose sono stati valutati statisticamente in pattern recognition via analisi delle componenti principali (PCA).

Risultati e discussione

Le analisi gascromatografiche hanno evidenziato la presenza di alcuni VOCs che sembrano essere associabili alla presenza di *Plasmopara v.*: l'etilbenzene, più sensibile in foglie inoculate da 7gg e l'acido 2-amino-6-metilbenzoico, senza tuttavia differenze significative tra campioni inoculati e controllo (tab. 1), così come il 2,2-dimetildecano che si presentava molto concentrato nell'inoculo 3gg, mentre praticamente scompariva in campione inoculato 7gg, attestandosi su concentrazioni più basse di quanto osservabile in controllo. Il 6-nitro-triciclo [10.2.2.2(5,8)]octadeca-5,7,12,14,15,17 esano era presente in foglie ad entrambi gli stadi di inoculo (dato non mostrato), sebbene a sostanzialmente basse concentrazioni. Altro composto marcante, particolarmente in foglie inoculate da 3gg, si è rivelato essere il 12,3 D-limonene (tab. 1), VOC che ha manifestato un incremento nel rilascio da parte delle foglie attaccate

* bellin@unitus.it

in stadio giovane di inoculo (3gg), rispetto a quanto osservabile sul controllo costituito da foglie esenti dal fungo. E' nota l'azione dei volatili ascrivibili alla categoria terpenoidi come messaggeri di eventi stressanti (biotici ed abiotici) a carico delle piante (Morath *et al.*, 2012) e si ipotizza, quindi, una risposta istantanea della foglia all'attacco della spora, combinata ad un rilascio del volatile a seguito dello stress da ferita imputabile al distacco fogliare. Le misure al naso artificiale, effettuate sui medesimi spazi di testa analizzati al GC-MS previa normalizzazione e autoscaling del dato, sono state sottoposte alla PCA; i pattern volatili ne risultano discriminati e clusterizzati come differenti tra loro (fig. 1A). Si evidenzia, per altro, una sovrapposibilità con la segregazione campionaria derivante dalle acquisizioni al GC-MS (fig. B). I risultati ottenuti dimostrano la capacità discriminativa delle metalloporfirine costituenti i sensori del nose, tra campioni di controllo e a differente stadio di inoculo, in relazione a VOCs specifici aventi possibile carattere di markers della presenza di *Plasmopara*. Allo stato attuale, è in sede di sperimentazione la trasferibilità dei metodi in pianta, direttamente in situ, con l'obiettivo di rendere i sensori in grado di rilevare la presenza, in stadio precoce, dell'infezione.

Conclusioni

Sono stati rilevati composti volatili a cui è potenzialmente attribuibile il ruolo di marcatori di *Plasmopara v.* anche in stadio precoce di inoculo. I sensori di un naso artificiale di nuova generazione per dimensioni e maneggevolezza di impiego, sono in grado di detectare le molecole aromatiche rilasciate in tali contesti e possono diventare strumenti funzionali all'individuazione della presenza di un potenziale rischio di inoculo.

Bibliografia

- CAFFI T., ROSSI V., BUGIANI R., SPANNA F., FLAMINI L., COSSU A., NIGRO C., 2009. *A model predicting primary infections of Plasmopara viticola in different grapevine-growing areas of Italy.* J. Plant Pathol. 91: 535–548.
- JANSEN R.M.C., MIEBACH M., KLEIST E., VAN HENTEN E.J., WILDT J., 2009. *Release of lipoxygenase products and monoterpenes by tomato plants as an indicator of Botrytis cinerea-induced stress.* Plant Biol. 11: 859-868.
- BLASIOLI S., BIONDI E., BRASCHI I., MAZZUCCHI U., BAZZI C., GESSA C.E., 2010. *Electronic nose as an innovative tool for the diagnosis of grapevine crown gall.* Anal. Chim. Acta 672: 20–24.
- SANTONICO M., BELLINCONTRO A., DE SANTIS D., DI NATALE C., MENCARELLI F., 2010. *Electronic Nose to study postharvest dehydration of wine grapes.* Food Chem. 121(3): 789-796.
- MORATH S.U., HUNG R., BENNETT J.W., 2012. *Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential.* Fungal Biol. Rev. 26: 73-83.

Tab. 1 - Principali VOCs presenti nei profili dei campioni fogliari analizzati al GC-MS e riportati come abbondanza relativa. (T.A. = tempo di accumulo in spazio di testa; T.E. = tempo esposizione fibra).

Tab. 1 - Main VOCs detected by GC-MS in the head space of leaf samples and reported as relative abundance. (T.A. = accumulation time in head space; T.E. = time of fiber exposition).

Parametri	Controllo			Inoculato 3gg			Inoculato 7gg		
	1 + 1	2 + 1	5 + 1	1 + 1	2 + 1	5 + 1	1 + 1	2 + 1	5 + 1
Etilbenzene	0	0	0	55938	8361	0	90812	0	0
Acido 2-Amino-6-metilbenzoico	38336	0	0	42908	0	0	54083	0	0
2,2-Dimetildecano	54566	58787	47606	286248	296574	170798	13130	9090	57225
D-Limonene	71547	84015	101616	155087	158178	127697	0	0	0

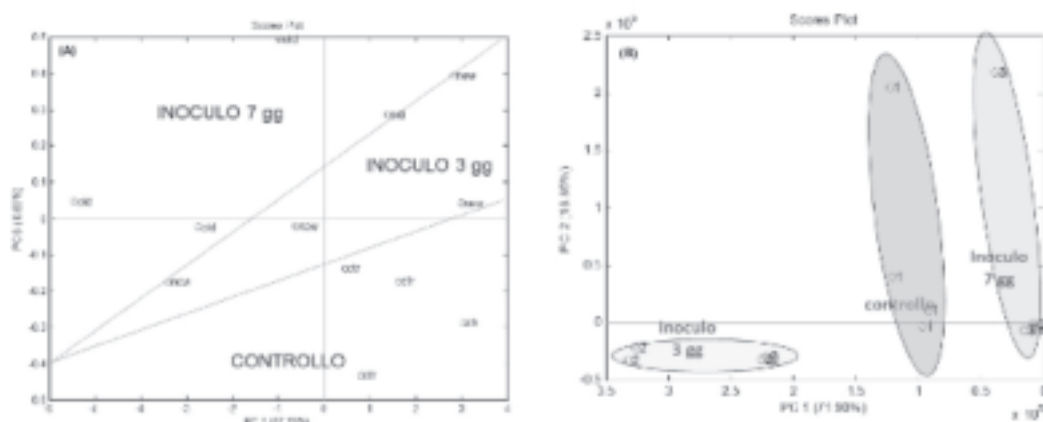


Fig. 1 - Score plots delle PCA delle misure all'E-nose (A) e dei VOCs al GC-MS (B). Controllo=ctr; inoculo 3 gg=new; inoculo 7 gg=old.
Fig. 1 - PCA score plots calculated on E-nose detections (A) and on VOCs detected by GC-MS (B). Control = ctr; inoculum at 3 days=new; inoculum at 7 days = old.

Caratterizzazione della biodiversità viticola: risposta di specie e cultivar del genere *Vitis* ad infezioni di oidio (*Erysiphe necator* Schwein) in ambiente controllato

Massimo Muganu^{1*}, Marco Paolocci¹, Antonio Penati¹, Virginia Alonso-Villaverde², Katia Gindro³

¹ Dipartimento di Scienze Agrarie e Forestali (DAFNE), Università della Tuscia, Viterbo

² Misión Biológica de Galicia (CSIC), Pontevedra (Spagna)

³ Swiss Federal Research Station Agroscope Changins-Wädenswil ACW, Nyon (Svizzera)

Characterization of grapevine germplasm: response of species and cultivars of the genus *Vitis* to powdery mildew (*Erysiphe necator* Schwein) infections in controlled environment

Key words: disease resistance, grape quality, grapevine, sustainable viticulture.

Introduzione

La caratterizzazione della tolleranza alle malattie all'interno del germoplasma di vite è un metodo utile nelle strategie di selezione e nei programmi di ibridazione per l'ottenimento di cloni e di nuove varietà meno suscettibili e al miglioramento della sostenibilità delle produzioni vitivinicole. L'oidio (agente causale *Erysiphe necator* Schwein) è una delle più dannose malattie fungine della vite. In Europa le infezioni sono in aumento a causa dei cambiamenti climatici, della riduzione della variabilità genetica e dello sviluppo di ceppi di *E. necator* resistenti ai pesticidi (Staud, 1997, Savocchia *et al.*, 2004). Per quanto riguarda *Vitis vinifera* è stata evidenziata una bassa resistenza all'oidio, legata alla mancata coevoluzione e all'impiego della propagazione agamica (Hoffman *et al.*, 2008), ma un diverso livello di tolleranza è stato osservato in varietà di *V. vinifera* (Gaforio *et al.*, 2011). Lo scopo del presente lavoro è stato quello di valutare la risposta di alcune varietà, ibridi e specie del genere *Vitis* ad infezioni di *E. necator*.

Materiale e metodi

In prove condotte nel 2011 e 2012 sono state utilizzate le accessioni di *V. vinifera* ssp *sativa*: Aleatico VTG, Canaiolo n. CM VT1, Bellone b. VT5, Trebbiano g. RS VT6 e Trebbiano t. b. TR VTT, descritte attualmente nell'Italian Vitis Database. Su queste sono state condotte osservazioni sulla tolleranza ad oidio in ambiente naturale, mediante rilievi condotti in un vigneto sperimentale dell'Università della Tuscia (42°25'21"N; 12°04'45"E). Su cinque piante per ciascuna accessione, innestate su 420A, potate a Guyot con distanze di 3 m × 1.5 m, e orientamento nord-sud, è stato determinato il grado di resistenza in base al descrittore OIV n° 455 (OIV, 2009). Inoltre sono state determinate l'incidenza e la gravità delle infezioni sul grappolo. Successivamente, sono state condotte prove di tolleranza su dischi fogliari prelevati da giovani foglie di piante in vaso di due anni propagate per talea. In queste prove, condotte in ambiente controllato, oltre alle accessioni di *V. vinifera* ssp *sativa* prima elencate, sono stati impiegati l'ibrido Isabella e due biotipi di *V. vinifera* ssp *sylvestris* rinvenuti negli areali dei Monti della Tolfa e dei Monti Cimini (Regione Lazio), precedentemente caratterizzati mediante marcatori microsatellite. Come controlli sono state utilizzate la varietà suscettibile Chasselas e l'ibrido tollerante Solaris. Mediante microscopia ottica per ogni genotipo è stata determinata la percentuale di dischi fogliari infettati e lo sviluppo del micelio e degli sporangiofori (Staud, 1997). Inoltre sono state effettuate osservazioni mediante microscopia a fluorescenza con lo scopo di individuare differenze tra i vitigni nello sviluppo del patogeno nelle prime fasi di infezione. I dati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA).

* muganu@unitus.it

Risultati e discussione

La risposta ad oidio valutata in condizioni naturali ha mostrato differenze tra le varietà di *V. vinifera* ssp *sativa* selezionate. I valori del descrittore OIV rilevati in Trebbiano g. RS VT6, Trebbiano t. b. TR VTT e Bellone VT5, indicano una maggiore tolleranza alla malattia rispetto ai valori determinati in Aleatico n. VTG e Canaiolo n. CM VT1. I valori di severità della malattia determinati nel grappolo, hanno confermato l'esito delle osservazioni fogliari, con il livello di infezione significativamente più alto in Aleatico n. VTG. Le prove condotte in ambiente controllato hanno mostrato differenze significative tra le diverse varietà e specie saggiate (fig. 1). Trebbiano g. RS VT6 e Trebbiano t. b. TR VTT hanno confermato una significativa maggiore tolleranza rispetto a Aleatico n. VTG e Canaiolo n. CM VT1. Per quanto riguarda Bellone b. VT5 si è evidenziato un comportamento intermedio. Relativamente a *V. vinifera* ssp *sylvestris* i risultati evidenziano un buon livello di tolleranza in entrambe le accessioni testate, che è risultata senza differenze significative rispetto sia al controllo Solaris che alla varietà Isabella. Le osservazioni al microscopio a fluorescenza hanno rivelato differenze significative tra i vitigni in particolare durante la fase iniziale del processo di infezione. La percentuale di germinazione dei conidi è stata più bassa in Bellone b. VT5 e Trebbiano g. RS VT6 rispetto alle altre varietà. La percentuale minore di conidi con un appressorio funzionale a 48 ore dall'inoculo è stata evidenziata in Trebbiano g. RS VT6 insieme a Bellone b. VT5 e Solaris, mentre quella di conidi con un'ifa secondaria

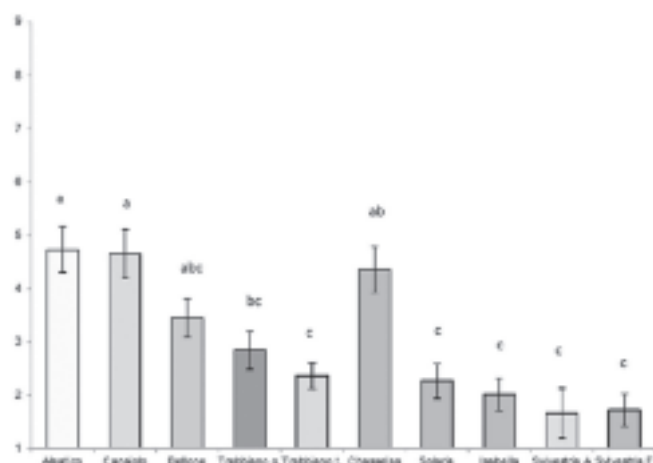


Fig. 1 - Livelli di infezione da oidio (Staudt, 1997). Le barre indicano l'errore standard. Lettere diverse indicano differenze significative secondo il test di Tukey ($p \leq 0.05$).

Fig. 1 - Powdery mildew infection (Staudt, 1997). Bars represent standard error. Different letters indicate significant differences according to Tukey's test ($p \leq 0.05$).

sviluppata non ha mostrato differenze significative tra le varietà, anche se i valori assoluti più alti sono stati osservati in Aleatico n. VTG e i più bassi in Trebbiano g. RS VT6.

Gli indici più elevati di tolleranza sono stati osservati in Trebbiano g. RS VT6 e Bellone b. VT5 durante la fase iniziale di infezione, facendo presumere differenze nella risposta all'infezione tra varietà durante la fase iniziale di attacco patogeno.

Conclusioni

La riduzione della piattaforma ampelografica in molte zone viticole può causare l'aumento dell'incidenza e gravità di alcune malattie. In questo contesto, la caratterizzazione dei meccanismi di resistenza ad agenti patogeni di germoplasma viticolo locale permette un ampliamento della piattaforma varietale ed un miglioramento dell'interazione pianta/ambiente di coltivazione. In questo studio la valutazione della resistenza all'oidio in condizioni naturali e controllate ha mostrato differenze significative tra i genotipi studiati. Le varietà a bacca bianca hanno mostrato una minore suscettibilità alla malattia rispetto alle varietà a bacca rossa Aleatico n. VTG e Canaiolo n. CM VT1. Riguardo alle accessioni di *V. vinifera* ssp *sylvestris* i risultati hanno mostrato un livello di tolleranza paragonabile a quello dei controlli Solaris e Isabella. Il differente comportamento tra i genotipi studiati porta ad assumere differenze nei meccanismi di difesa, specialmente nella fase iniziale dell'infezione, aprendo la strada ad un approfondimento sulle difese naturali presenti nei genotipi saggiati.

Bibliografia

- GAFORIO L., GARCIA-MUNOZ S., CABELLO, F., MUNOZ-ORGANERO G., 2011. Evaluation of susceptibility to powdery mildew (*Erysiphe necator*) in *Vitis vinifera* varieties. *Vitis* 50: 123-126.
- HOFFMANN S., DI GASPERO G., KOVACS L., HOWARD S., KISS E., GALBACS Z., TESTOLIN R., KOZMA P., 2008. Resistance to *Erysiphe necator* in the grapevine "Kishmish vatkana" is controlled by a single locus through restriction of hyphal growth. *Theor applied genetics* 116: 427-438.
- OIV (Office International de la Vigne et du Vin, Paris). 2009. *Codes des caractères descriptifs des variétés et espèces de Vitis*.
- SAVOCCHIA S., STUMMER B.E., WICKS T.J., VAN HEEWICK R., SCORR E.S., 2004. Reduced sensitivity of *Uncinula necator* to sterol demethylation inhibiting fungicides in southern Australian vineyards. *Australian Plant Pathology* 33, 465-473.
- STAUDT G., 1997. Evaluation of resistance to grapevine powdery mildew (*Uncinula necator* (SCHW.) Burr., anamorph *Oidium tuckeri* BERK.) in accessions of *Vitis* species. *Vitis* 36: 151-154.

Il germoplasma di vite Georgiano: possibile fonte di resistenza a malattie associate a fitoplasmi?

Fabio Quaglino^{1*}, David Maghradze², Paola Casati¹, Osvaldo Failla¹, Piero Attilio Bianco¹

¹ Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali, Produzione, Territorio, Agroenergia, Università di Milano

² Istituto di Orticoltura, Viticoltura ed Enologia, Università Agraria della Georgia, Tbilisi

Is the Georgian grapevine germplasm a possible source of resistance against diseases associated with phytoplasmas?

Abstract. Preliminary survey highlighted that bois noir disease, associated with ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’, affects grapevine varieties in Georgia (South Caucasus). In this study, further research was carried out to investigate the bois noir symptom severity in international and Georgian native varieties. Identification and characterization of phytoplasmas was performed by analysis of *16S rRNA*, *vmp1* and *stamp* gene sequences. During field surveys, moderate/mild and severe symptoms were observed on Georgian grapevine varieties and international cultivars, respectively. Molecular characterization of ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’ revealed the presence of 11 genetically distinct types. Ten of such types were described here for the first time. Phylogenetic analyses of *vmp1* and *stamp* gene concatenated nucleotide sequences indicated that ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’ strains in Georgia are associated mainly with the bindweed-related bois noir host system. Moreover, the presence of the same strains in grapevine cultivars showing a range of symptom intensity suggested a different susceptibility of Georgian local varieties to bois noir. Further studies are in progress to evaluate this important topic in the perspective of improving breeding programs for the production of novel grapevine cultivars resistant to phytoplasma diseases.

Key words: MLST, PCR, phylogeny, stolbur, *Vitis vinifera*.

Introduzione

Il Legno nero (LN) è una malattia appartenente al complesso dei giallumi della vite (GY), responsabile

di forti perdite produttive in Europa e nel bacino del Mediterraneo. LN è causato da fitoplasmi della specie ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’ (CaPsol), trasmessi a vite da *Hyalesthes obsoletus* Signoret, un cixiide polifago che vive preferenzialmente su ortica e, convolvolo (Quaglino *et al.*, 2013). A causa di questa complessità biologica, è molto difficile progettare strategie efficaci per il contenimento di LN. Uno degli approcci più innovativi si basa sulla selezione di varietà resistenti da impiegare in programmi di *breeding*. A questo riguardo, il germoplasma di vite Georgiano, composto da oltre 500 cultivars, è di grande interesse. Studi recenti hanno evidenziato che varietà di vite selezionate nei centri di domesticazione, come la Georgia, mostrano una possibile resistenza a patogeni (Imazio *et al.*, 2013). In uno studio preliminare, CaPsol è stato rilevato in vite in Georgia (Quaglino *et al.*, 2014).

In questo lavoro sono state condotte attività di campo e di laboratorio per studiare (i) l’intensità dei sintomi tipici di GY su varietà di vite internazionali e autoctone in Georgia e (ii) la variabilità genetica tra i ceppi di CaPsol identificati.

Materiali e metodi

Nel settembre 2013 monitoraggi in vigneti e collezioni georgiani sono stati condotti per valutare la presenza e l’intensità dei sintomi associati a GY su varietà sia internazionali (4) sia autoctone (27). Le varietà sono state classificate in gruppo I (sintomi lievi), II (moderati) e III (gravi). Il DNA, estratto da campioni fogliari raccolti da 81 piante di vite e da 6 di convolvolo, è stato utilizzato per l’identificazione e la caratterizzazione molecolare dei fitoplasmi mediante (i) amplificazione specifica (PCR), (ii) restrizione enzimatica (RFLP) e (iii) analisi delle sequenze nucleotidiche dei geni *16S rRNA*, *vmp1* e *stamp*. L’analisi (iii) è stata effettuata su 15 ceppi di CaPsol selezionati sulla base dei profili RFLP del gene *vmp1*.

* fabio.quaglino@unimi.it

L'associazione tra i profili RFLP del gene *vmp1* e l'intensità dei sintomi osservati è stata valutata con il test del χ^2 (SPSS).

L'analisi filogenetica, condotta con il software MEGA 6, è stata effettuata sulle sequenze nucleotidiche concatenate dei geni *vmp1* e *stamp*, ottenute in questo lavoro e disponibili in Banca Dati (NCBI).

Risultati e discussione

L'analisi PCR/RFLP del gene *16S rRNA* ha permesso di rilevare CaPsol in 55 piante di vite su 81 e nei convolvoli esaminati, confermando la diffusione di LN in Georgia. L'analisi RFLP del gene *vmp1*, condotta su 49 prodotti PCR (43 da vite e 6 da convolvolo), ha generato 6 profili distinti: 3 noti (V1, V14, V15) e tre (und1, und2 e und3) descritti per la prima volta. V1, V14 e und2 sono risultati prevalenti, confermando la presenza di V14 in Europa orientale e sottolineando l'inaspettata diffusione di V1 (rilevato soprattutto in Chardonnay), finora riportato in Italia, Francia e Germania (Foissac *et al.*, 2013). Questa evidenza suggerisce la probabile introduzione di V1 in Georgia mediante l'importazione di materiale di propagazione infetto.

Nei monitoraggi è stato possibile osservare sintomi lievi/moderati sulla maggior parte delle varietà georgiane e sintomi intensi sulle varietà internazionali. Questo dato assume maggior interesse considerando che i profili V1, V14 e und2 sono stati identificati con distribuzione significativamente differente ($\chi^2 = 16.671$; d.f. = 10; $P = 0.029$) in varietà che mostravano sintomi gravi, moderati e lievi.

L'analisi delle sequenze nucleotidiche dei geni *vmp1* e *stamp* ha consentito di identificare 11 ceppi di CaPsol in Georgia, 10 descritti per la prima volta.

L'analisi filogenetica ha evidenziato la presenza di

5 raggruppamenti (*clusters*): 4 (*vmp/stamp*-1, -2, -3, -5) contenenti ceppi di CaPsol associati a convolvolo, e 1 (*vmp/stamp*-4) a ortica. La maggior parte dei ceppi georgiani (13 su 14) è risultata raggruppata in *clusters* associati a convolvolo.

Conclusioni

I risultati di questo lavoro hanno evidenziato che i ceppi di CaPsol, identificati in Georgia, costituiscono una popolazione unica, associata prevalentemente a convolvolo. Inoltre, la presenza degli stessi ceppi di CaPsol in varietà di vite autoctone (sintomi lievi) e internazionali (sintomi intensi) ha suggerito che le varietà native georgiane siano meno suscettibili a LN. Ulteriori studi sono in atto per valutare questo aspetto nella prospettiva di migliorare i programmi di *breeding* per la costituzione di nuove varietà di vite tolleranti o resistenti alle fitoplasmosi.

Bibliografia

- FOISSAC X., CARLE P., FABRE A., SALAR P., DANET J.-L., STOLBUR-EUROMED CONSORTIUM, 2013. '*Candidatus Phytoplasma solani*' genome project and genetic diversity in the Euro-Mediterranean basin. In: E. Torres, A. Laviña, A. Batlle eds., Proceedings of the 3rd European Bois Noir Workshop, Barcelona (Spain): 11-13.
- IMAZIO S., MAGHRADZE D., DE LORENZIS G., BACILIERI R., LAUCOU V., THIS P., SCIENZA A., FAILLA O., 2013. *From the cradle of grapevine domestication: molecular overview and description of Georgian grapevine (Vitis vinifera L.) germplasm*. Tree Genetics and Genomes, 9: 641-658.
- QUAGLINO F., MAGHRADZE D., CHKHAIDZE N., FAILLA O., CASATI P., BIANCO P.A., 2014. *First report of 'Candidatus Phytoplasma solani' and 'Candidatus Phytoplasma convolvuli' associated with grapevine bois noir and bindweed yellows, respectively, in Georgia*. Plant Disease, 98: 1151.
- QUAGLINO F., ZHAO Y., CASATI P., BULGARI D., BIANCO P.A., WEI W., DAVIS R.E., 2013. '*Candidatus Phytoplasma solani*', a novel taxon associated with stolbur and bois noir related diseases of plants. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 63: 2879-2894.