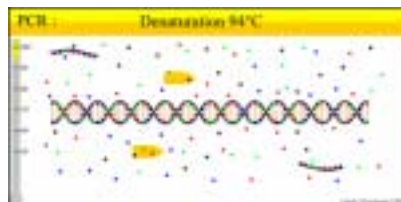
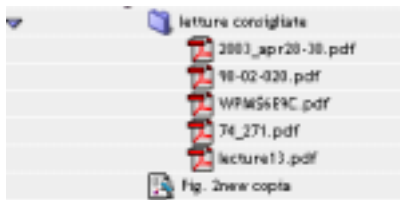


AGENTI PATOGENI DELLA VITE

BATTERI
FITOPLASMI
VIRUS

Antonio Carapelli
Dip. Biologia Evolutiva
Università di Siena
carapelli@unisi.it
0577/234417

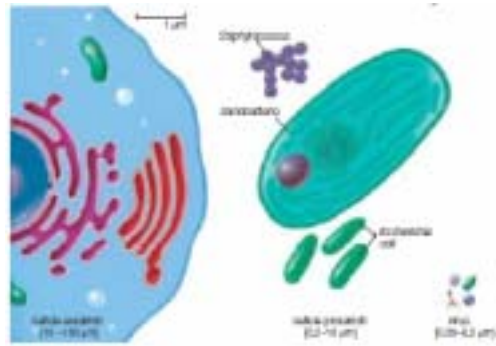
Materiale di approfondimento



- AGENTI DI MALATTIE INFETTIVE:
 - I più comuni agenti di malattie infettive delle piante si trovano tra **virus, batteri, fitoplasmi e funghi**.
- MODIFICAZIONI CROMATICHE:
 - **Clorosi e giallumi** - parziale o totale scomparsa della clorofilla;
 - **Disposizione a mosaico** - piccole macchie irregolari;
 - **Variegature** - macchie grandi irregolari;
 - **Striature** - macchie strette ed allungate;
 - **Melanosi** - imbrunimento
- NECROSI ED ALTERAZIONI DEGENERATIVE:
- La necrosi dei tessuti è l'esito finale di molte malattie;
- Essa dà luogo alla formazione di macchie isolate o confluenti
- Malattie necrotiche danno luogo a picchiettature, macchiettature e maculature;
- La morte cellulare può essere preceduta dal disfacimento delle pareti cellulari che dà luogo a marciumi di vario tipo.

Procarioti

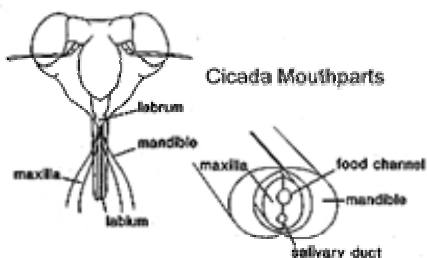
- **3,5 miliardi di anni fa**
- **1676 Anton van Leeuwenhoek**
- **A vita libera**
 - **Autotrofi**
 - **Saprofiti**
- **Simbiosi**
 - **Parassiti**
 - **Simbiosi mutualistica**

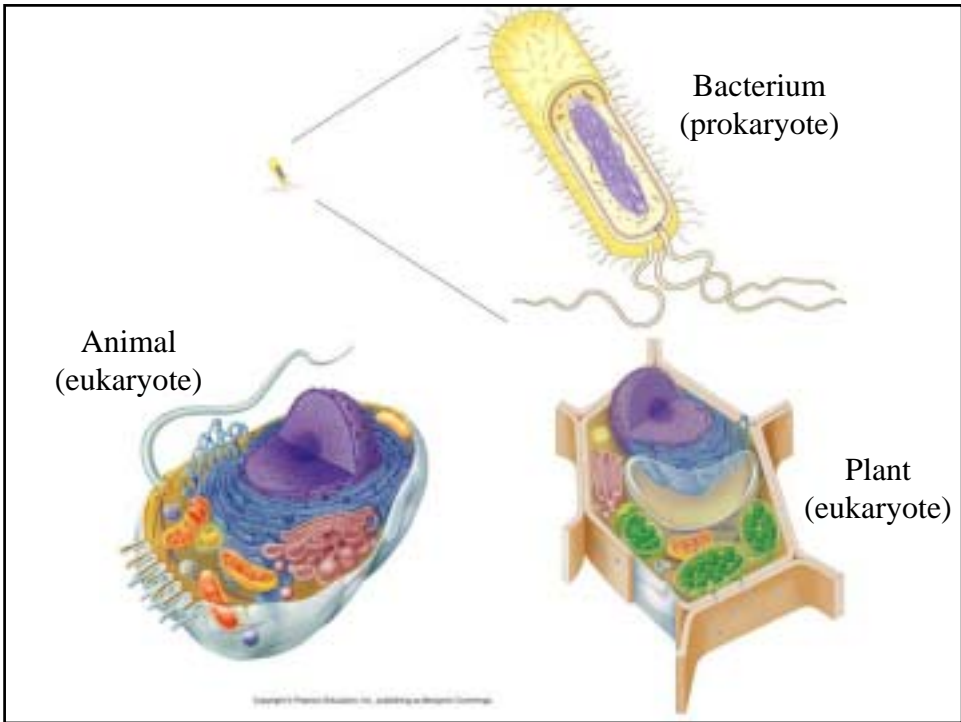
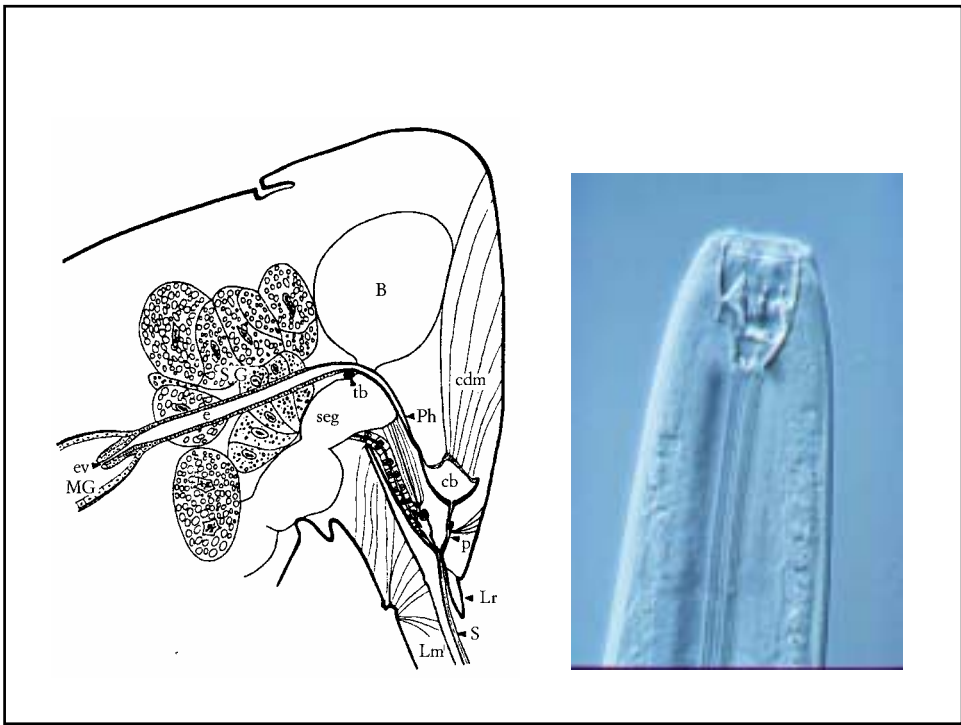


- Un **virus** rappresenta una entità submicroscopica potenzialmente patogena e costituita da un solo tipo di acido nucleico (DNA o RNA) e da un complesso di proteine (questi due componenti assieme vengono detti virioni)

Modelli di trasmissione

- Il processo di trasmissione associato all'alimentazione
- si compone di diverse fasi: periodo di acquisizione, periodo di latenza, periodo di inoculazione, periodo di digiuno
 - ✓ Non-persistente
 - ✓ Persistente
 - ✓ Semi-persistente
 - ✓ dipendente
- Il virus aderisce al canale alimentare dello stiletto durante la suzione e se ne stacca durante i rigurgiti

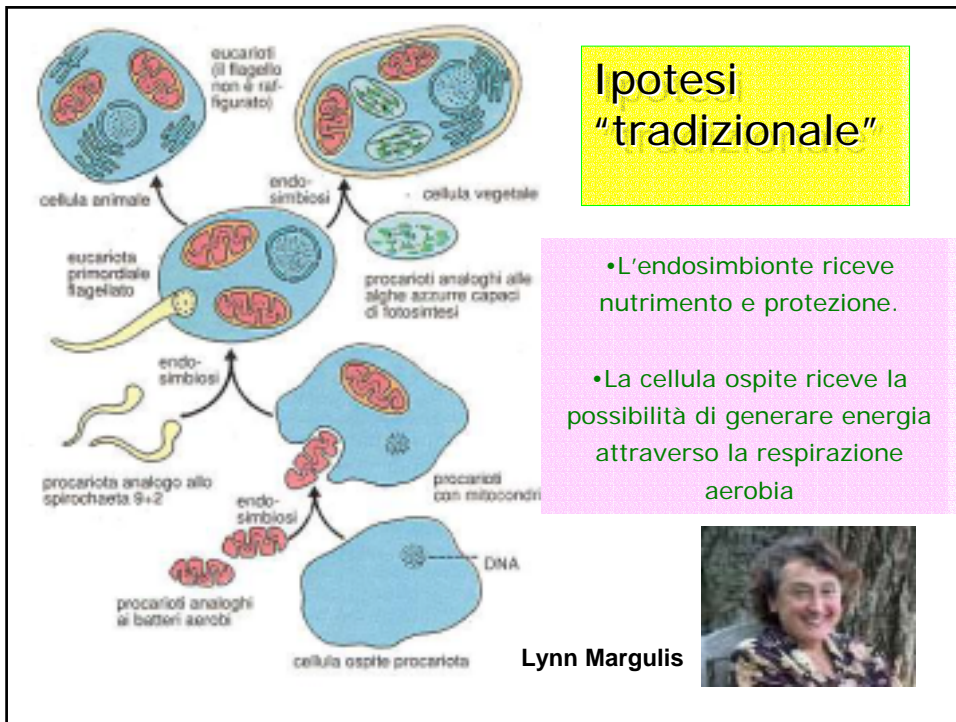




QuickTime™ e un decompressore TIFF (Non compresso) sono necessari per visualizzare quest'immagine.

I PRIMI ESSERI VIVENTI

La vita apparve molto presto sul nostro pianeta; le più antiche tracce di vita conosciute risalgono a 3.8 ~ 4 miliardi di anni fa e sono gli antenati degli attuali batteri, organismi unicellulari (composti da una sola cellula) molto semplici e primitivi in grado di svolgere le attività fondamentali attribuite agli esseri viventi, cioè nutrirsi e riprodursi.

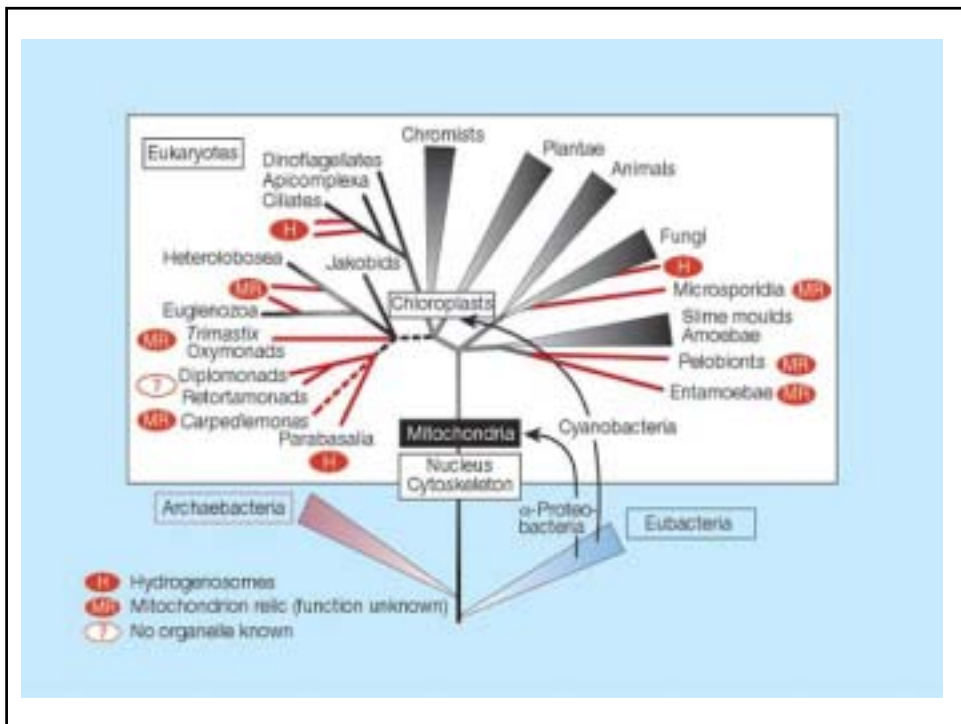


Ipotesi "tradizionale"

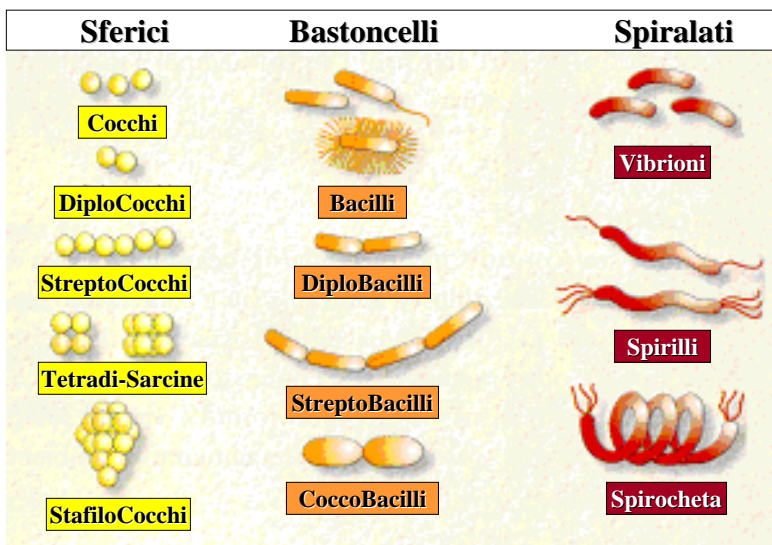
- L'endosimbionte riceve nutrimento e protezione.
- La cellula ospite riceve la possibilità di generare energia attraverso la respirazione aerobia

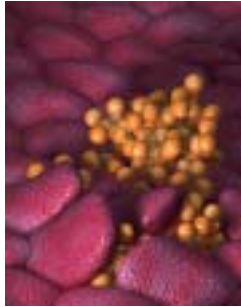
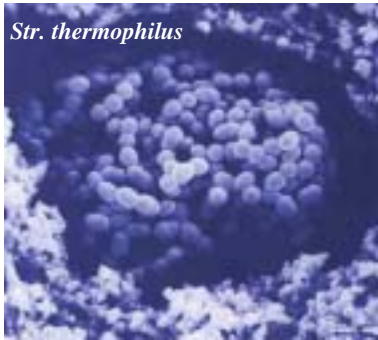


Lynn Margulis

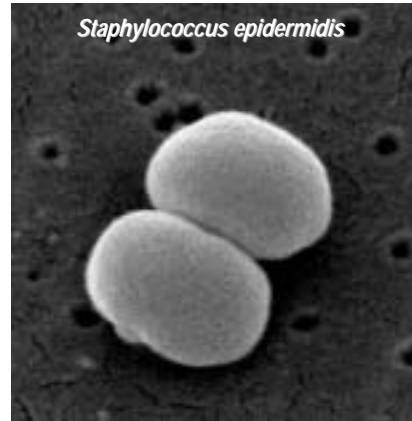


La cellula dei procarioti

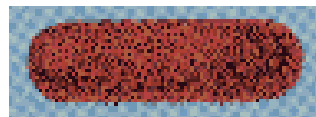




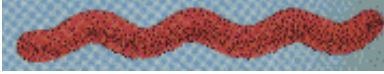
Cocchi



Bacilli



Spirilli - Spirocheta



Spirocheta:
Leptospira



Spirantes Rich.

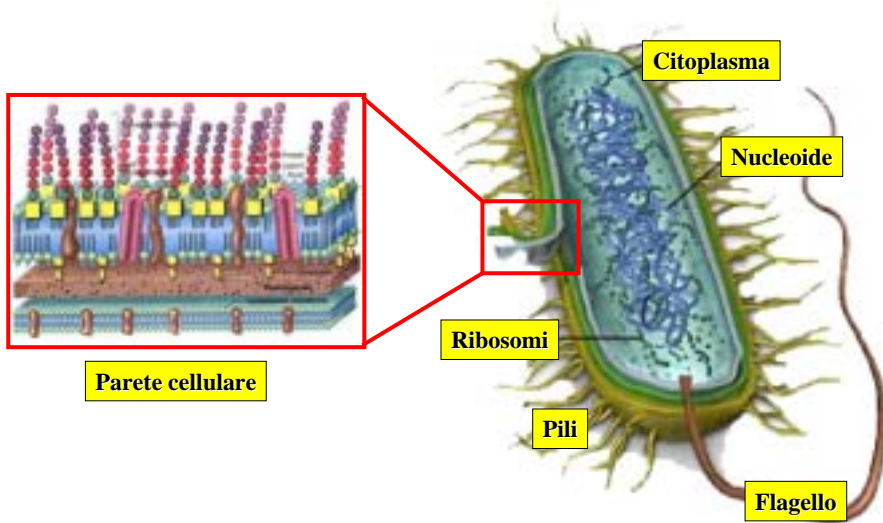


Vibrioni



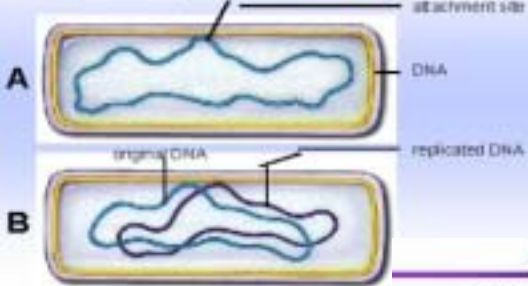
Vibrio cholerae

La cellula dei procarioti



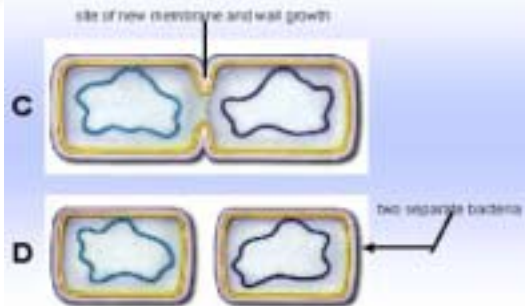
Bacterial Reproduction

The primary mode of reproduction in bacteria is through the process of bacterial fission.



Scissione Binaria

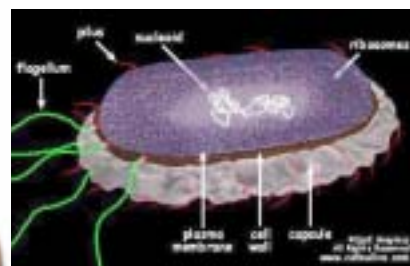
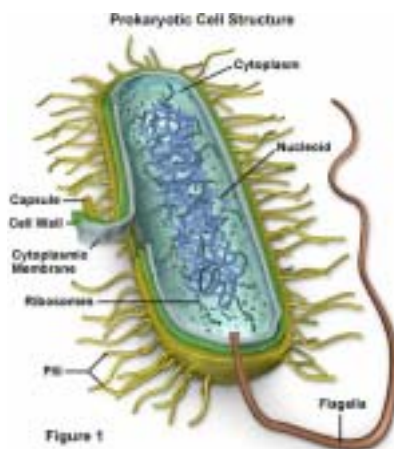
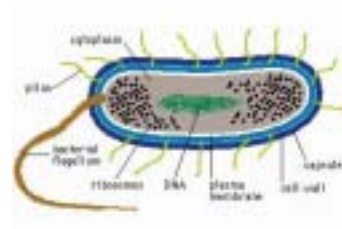
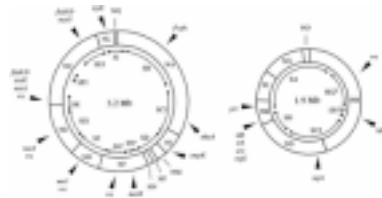
Bacterial Reproduction





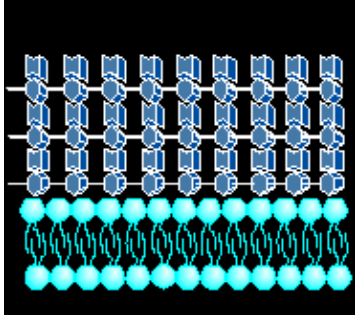
Generalità sui batteri

- Procarioti
- Unicellulari
- Gram + Gram -
- Genoma circolare
- Genoma
- Plasmidi



GRAM+

Lo strato fosfolipidico che ricopre la membrana cellulare della maggior parte dei Gram+ è ricoperto da uno strato di peptidoglicano



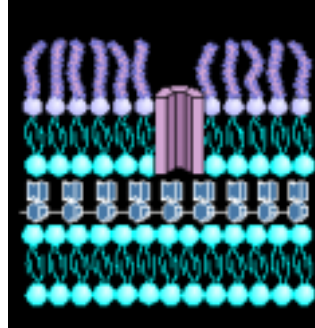
fosfolipidi



peptidoglicano

GRAM-

I batteri Gram- sono circondati da 2 membrane: quella esterna è liposaccaridica, quella interna è composta da peptidoglicano



lipopolisaccaride



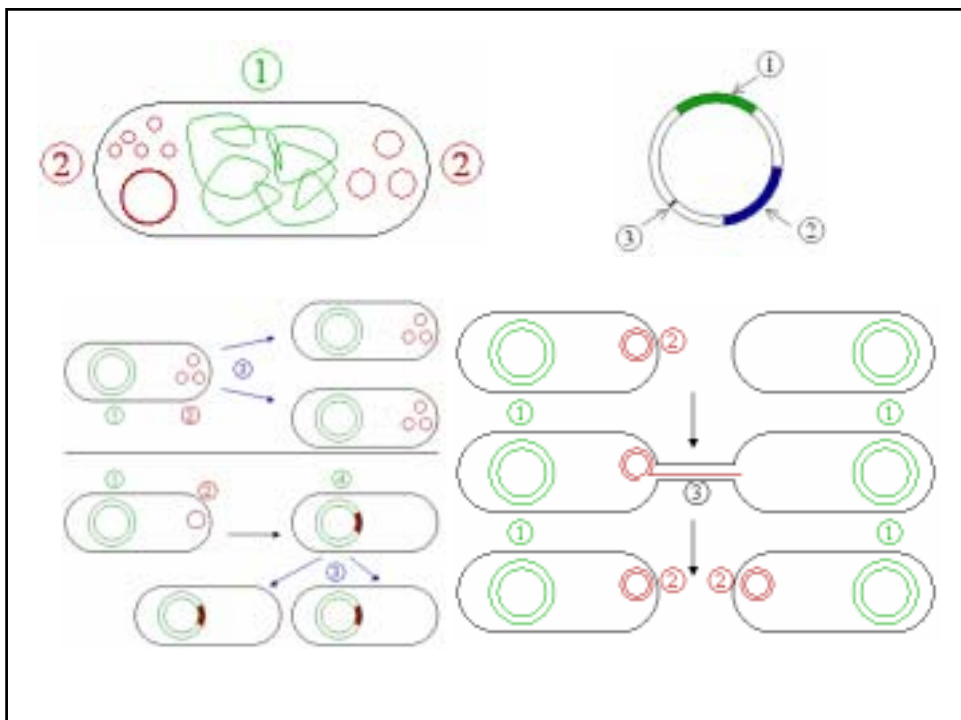
porine

La cellula

- La cellula è l'unità strutturale di tutti i viventi. Esistono diverse tipologie di cellule, sia dal punto di vista morfologico (come sono fatte) che fisiologico (come svolgono le loro funzioni vitali).
- Si distinguono due tipi di cellule: la procariote e la eucariote.

La cellula

- Nei procarioti (dal greco "pro" e "karion", che vuol dire *prima del nucleo*) esiste un unico filamento circolare di DNA, associato a proteine, libero nel citoplasma. I procarioti hanno dimensioni generalmente comprese tra 0,1 e 10 μm .



Habitat dei batteri fitopatogeni

- Sono presenti in tutti gli ambienti in comunità con altri microrganismi (specialmente funghi).
- I batteri possono stabilire con la pianta due tipi di rapporto: di **endofitia** o di **epifitia**.

endofitia

Generalmente saprofiti
Possono generare malattie,
ma talvolta sono utili alla
pianta

Tipica dei batteri fitopatogeni
Stabiliscono con l'ospite (la pianta)
un rapporto di parassitismo
invadendo i tessuti
Si moltiplicano negli spazi
intercellulari e/o nei vasi xilematici

epifitia

Capaci di vivere sulla superficie delle piante
La patogenicità è generalmente dipendente dalla
Quantità di batteri presente su foglie, fiori o radici

BATTERI patogeni

 Tumore Batterico o Rogna

 Mal Nero

 Malattia di Pierce (PD=Pierce disease)

Tumore Batterico o Rogna

Agrobacterium tumefaciens

Tumore Batterico o Rogna (*Agrobacterium tumefaciens*)



Il agente patogeno responsabile di questa malattia è il batterio *Agrobacterium tumefaciens*. I sintomi sono visibili soprattutto sulla parte bassa del tronco e sul colletto, raramente su tralci e radici. Essi consistono in proliferazioni anomale (iperplasie) di dimensioni variabili, dette "tumori", o "galle". Inizialmente sono molli, in seguito si induriscono e lignificano. Si estendono assumendo una forma corrugata "rogna".

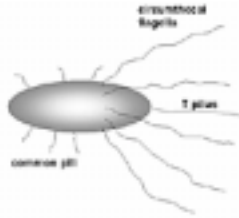
In seguito all'infezione la pianta produce germogli molto ridotti e nei casi più gravi muore.

Il batterio, che vive nel terreno raggruppato in colonie, penetra all'interno della pianta attraverso ferite (tagli accidentali, vendemmia, potatura, punture di insetti), quindi si diffonde dando inizio al processo d'infezione.

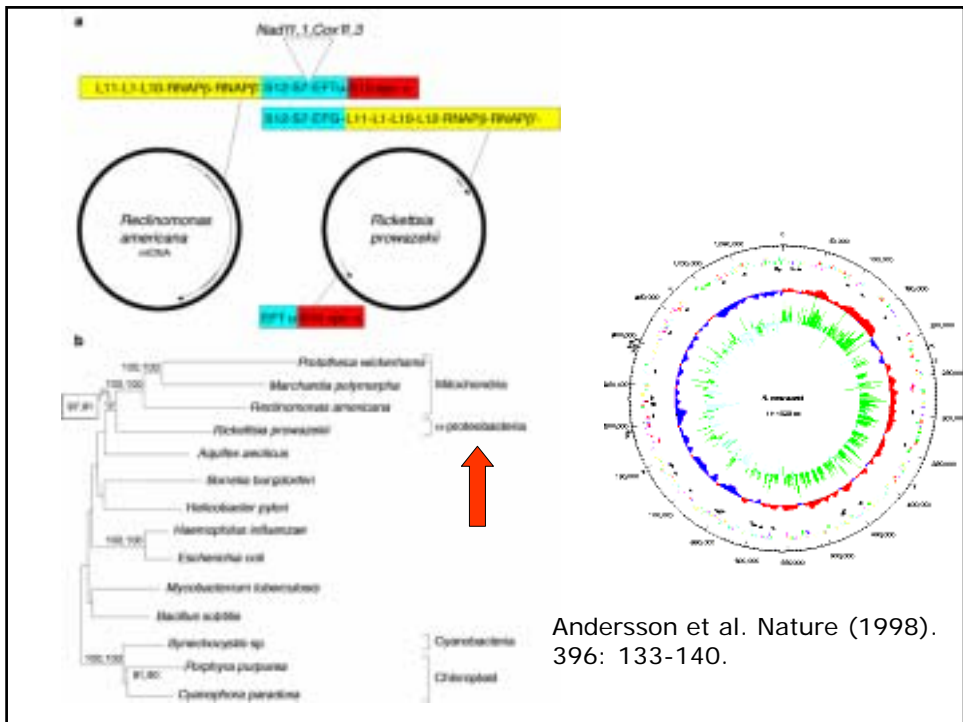
Una volta instaurata l'infezione, le cellule colpite proliferano abnormemente fino a formare le galle. L'infezione localizzata può aggravarsi qualora il batterio riesca ad introdursi nel sistema vascolare e a diffondere in tutta la pianta. Alla fine del ciclo infettivo il batterio fuoriesce, sempre tramite ferite dei tessuti della pianta, e va nel terreno per spostarsi sulle piante vicine.



Agrobacterium tumefaciens causa masse tumorali (**crown gall**) in un gran numero di dicotiledoni, in special modo negli esponenti della famiglia Rosidae (melo, pero, pesco, mandorlo, ecc.). Un ceppo specifico, chiamato varietà **biovar 3**, causa la "rogna della vite".



- *Agrobacterium tumefaciens*
- Gram-negativo
- Fam. Rhizobiaceae; sottoclasse α -2 dei **Proteobacteria**
- Aerobico
- Bacilliforme (1 x 3 nm)
- Temp ideale: 25-28°C
- Senza endospore
- Mobile grazie alla presenza di 1-6 flagelli peritrichi
- Cosmopolita
- Attirato per chemiotassi dalle ferite vegetali



Andersson et al. Nature (1998). 396: 133-140.

Classificazione tradizionale (Manual systematic Bacteriology, 1984)

A. tumefaciens crown gall biovars 1, 2, 3

A. radiobacter non-patogeno biovars 1, 2

A. rhizogenes "hairy root" biovar 2

A. rubi galle in *Rubus*

Analisi filogenetiche basate su allosimi e sequenze di DNA non confermano il raggruppamento in base alle categorie patogene

(Ophel & Kerr, 1993) proposero una nuova specie (*A. vitis*) per il biovar 3



基因工程作物在植物保護之應用

鍾國雄 · 1998年10月15日

一、前言

植物與動物 (plant-animal interactions) 的相互作用 (mutualism) 和寄生 (parasitism) 是自然界中普遍存在的現象。植物與動物之間的相互作用可以分為共生 (mutualism) 和寄生 (parasitism) 兩種。共生是指植物和動物之間相互受益的關係，而寄生則是指植物和動物之間一方受益而另一方受損的關係。

植物與動物之間的相互作用在農業生產中具有重要的意義。例如，植物與昆蟲之間的相互作用可以導致植物的生長受阻和產量減少。因此，研究植物與動物之間的相互作用對於提高農業生產力具有重要的意義。

植物與動物之間的相互作用在農業生產中具有重要的意義。例如，植物與昆蟲之間的相互作用可以導致植物的生長受阻和產量減少。因此，研究植物與動物之間的相互作用對於提高農業生產力具有重要的意義。

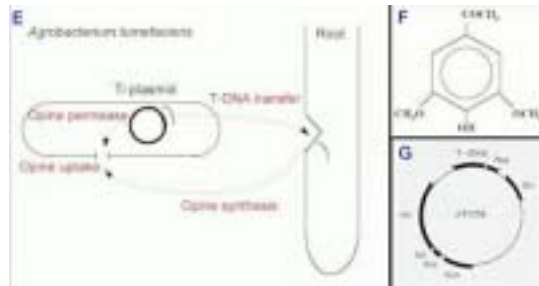
二、基因工程作物是抗蟲之選擇

植物與動物之間的相互作用在農業生產中具有重要的意義。例如，植物與昆蟲之間的相互作用可以導致植物的生長受阻和產量減少。因此，研究植物與動物之間的相互作用對於提高農業生產力具有重要的意義。

I tumori rallentano la normale circolazione della linfa causando un deperimento generale della pianta. Tumori nuovi di *A. tumefaciens* si formano nel corso della stagione vegetativa a partire da quelli vecchi

biovar 3 è un ceppo patogeno che non si è diffuso nel mondo per un processo spontaneo, ma per a causa della manipolazione (potatura ed innesto) e del trasporto delle viti da parte dell'uomo. In condizioni naturali le cellule mobili di *A. tumefaciens* vengono attratte da ferite della vite attraverso un meccanismo chemiotattico

- 📖 Il richiamo chemiotattico avviene a causa del rilascio da parte della pianta di zuccheri ed altri componenti delle radici.
- 📖 I ceppi batterici che contengono il plasmide *Ti* (fig. G) “rispondono” in maniera più energica dal momento che sono in grado di riconoscere il composto fenolico (acetosiringone, fig. F).
- 📖 Una delle funzioni del plasmide *Ti* è quella di sintetizzare dei recettori chemiotattici addizionali che vengono inseriti nella membrana batterica che permettono al batterio di riconoscere dei siti di permeabilità nella vite (ferite, lacerazioni, ecc.)



- 📖 L'*Agrobacterium* può essere definito un saprofito abituale della rizosfera
- 📖 Solamente una piccola quantità di ceppi batterici è potenzialmente patogena, in quanto possiede il plasmide *Ti*.
- 📖 Quando l'*Agrobacterium* viene isolato dalla superficie delle radici delle piante, la maggior parte dei ceppi (90%) non è patogeno, anche quando l'isolamento viene effettuato a partire da piante colpite dal tumore.
- 📖 La strategia del batterio segue una logica ben precisa:
 - ▢ si localizza in gran numero nelle immediate vicinanze delle radici perché rappresentano dei potenziali siti di ingresso;
 - ▢ Reagisce velocemente alla presenza di ferite



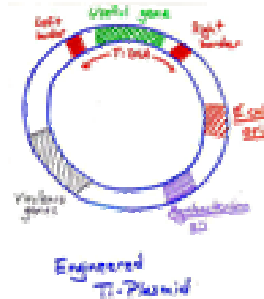
- *A. tumefaciens*
- Può essere identificato attraverso campioni provenienti direttamente dalle galle, oppure dal suolo e dall'acqua.
- Il migliore isolamento lo si ottiene da tessuto bianco-giallastro di una giovane galla in via di formazione



- ☞ La galla deve essere lavata in varichina al 20% e risciacquata diverse volte in acqua sterile
- ☞ Il tessuto della galla deve poi essere sezionato in piccoli frammenti
- ☞ Questi ultimi vengono poi raccolti in appositi tubi contenenti acqua sterile od opportuni tamponi
- ☞ I campioni vengono vortexati e lasciati a riposare per 30 min.
- ☞ A questo punto usando un bastoncino inoculatore si piastrano i batteri in Medium 1A e si lasciano crescere o/t a 25-27°C

Plasmide *Ti* (Tumor inducing)

- 📄 L'identificazione di *A. tumefaciens* in un preparato non è necessariamente legata alla presenza della malattia della galla. Solamente le cellule batteriche contenenti il plasmide fitopatogeno *Ti* possono causare il tumore.
- 📄 I ceppi di *A. tumefaciens* mancanti del plasmide vivono nella rizosfera batterica senza causare patologie
- 📄 200Kb di DNA circolare a doppia elica



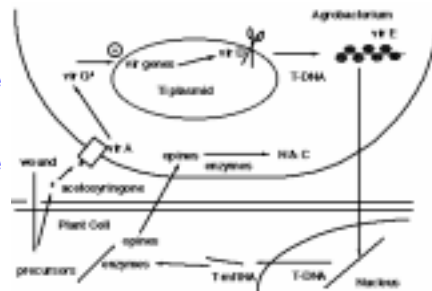
Genomes Agrobacterium tumefaciens str. C58 (U. Washington) plasmid Ti

Ordered segments from the contig entry [AG000880](#) (contig:AG000880)

Description	Length (bp)	Sequence		Protein
		Protein	HitID	
1 Agrobacterium tumefaciens str. C58 Ti plasmid, section 1 of 21	10,229	AG000880	AG000810	6 FACTA ORF1
2 Agrobacterium tumefaciens str. C58 Ti plasmid, section 2 of 21	10,377	AG000880	AG000810	7 FACTA ORF2
3 Agrobacterium tumefaciens str. C58 Ti plasmid, section 3 of 21	11,143	AG000880	AG000820	9 FACTA ORF3
4 Agrobacterium tumefaciens str. C58 Ti plasmid, section 4 of 21	8,888	AG000880	AG000821	7 FACTA ORF4
5 Agrobacterium tumefaciens str. C58 Ti plasmid, section 5 of 21	11,303	AG000880	AG000822	14 FACTA ORF5
6 Agrobacterium tumefaciens str. C58 Ti plasmid, section 6 of 21	10,773	AG000880	AG000823	7 FACTA ORF6
7 Agrobacterium tumefaciens str. C58 Ti plasmid, section 7 of 21	11,143	AG000880	AG000824	12 FACTA ORF7
8 Agrobacterium tumefaciens str. C58 Ti plasmid, section 8 of 21	10,490	AG000880	AG000825	9 FACTA ORF8
9 Agrobacterium tumefaciens str. C58 Ti plasmid, section 9 of 21	11,803	AG000880	AG000826	9 FACTA ORF9
10 Agrobacterium tumefaciens str. C58 Ti plasmid, section 10 of 21	12,350	AG000880	AG000827	18 FACTA ORF10
11 Agrobacterium tumefaciens str. C58 Ti plasmid, section 11 of 21	11,293	AG000880	AG000828	9 FACTA ORF11
12 Agrobacterium tumefaciens str. C58 Ti plasmid, section 12 of 21	11,127	AG000880	AG000829	18 FACTA ORF12
13 Agrobacterium tumefaciens str. C58 Ti plasmid, section 13 of 21	10,137	AG000880	AG000830	13 FACTA ORF13
14 Agrobacterium tumefaciens str. C58 Ti plasmid, section 14 of 21	10,367	AG000880	AG000831	18 FACTA ORF14
15 Agrobacterium tumefaciens str. C58 Ti plasmid, section 15 of 21	8,349	AG000880	AG000832	6 FACTA ORF15

Dalle ferite della pianta, causate ad esempio durante la potatura, vengono rilasciati dei segnali chimici (wound signals) quali dimetoxyl phenol ed aceto siringone. Questi stimolano geni virulenti del plasmide come *virA*, a produrre istidina-chinasi (VirA), la quale fosforila il regolatore VirG.

VirG attiva gli altri geni virulenti (*virE* e *virD*) i quali sono responsabili del trasferimento del T-DNA nel genoma nucleare della pianta.



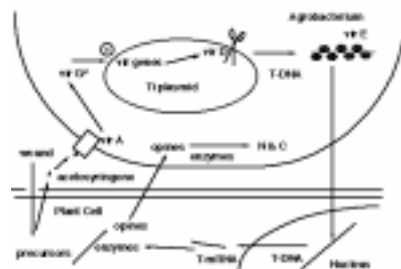
VirD taglia, linearizzandolo, il plasmide.

VirE stabilizza il filamento singolo del plasmide che si inserirà nel genoma della pianta.

La percezione delle sostanze fenoliche prodotte dalla vite in seguito alle ferite realizzata mediante la produzione di VirA, arresta la mobilità di *A. tumefaciens*.

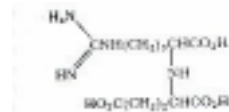
Altri geni batterici (*chv*, *att*) sono coinvolti nell'evoluzione della virulenza, producendo il pilo T ed altre sostanze che mediano l'adesione delle cellule batteriche con quelle della pianta.

Il T-DNA è veicolato nel genoma della pianta sotto forma di singolo filamento legato alla proteina VirD2



- 📄 Il T-DNA è integrato nel genoma vegetale dove viene espresso dall'apparato trascrizionale della pianta.
- 📄 **Il T-DNA induce la pianta a produrre una galla all'interno della quale i batteri possono vivere.**
- 📄 Il prodotto dei geni di T-DNA catalizza la formazione di auxine, citochine ed opine.
- 📄 Crescita anormale delle cellule vegetali, alterazione della loro divisione.
- 📄 Le opine prodotte dall'ospite vengono utilizzate come risorsa alimentare per il batteri.

Nopaline



- 📄 Ceppi differenti di *A. tumefaciens* producono opine diverse
- 📄 Per i ceppi che producono nopaline esiste una strategia di controllo del batterio, scoperta da A. Kerr negli anni 70.
- 📄 Questa strategia prevede l'introduzione di competitori innocui dei ceppi patogeni.
- 📄 *A. radiobacter* (strain K84) previene la malattia, producendo una batteriocina che svolge una funzione antagonista nei confronti di *A. tumefaciens*, quando viene aggiunta alla ferita in rapporto 1:1 rispetto al ceppo patogeno (*A. tumefaciens*).
- 📄 K84 è distribuito in piastre di agar che vengono sciolte in acqua e vengono poi usate per "contaminare" con un ceppo non patogeno le piante di vite prima della semina, a titolo preventivo

Controllo biologico

- 📄 Il controllo della malattia può essere effettuato nei seguenti modi:
- 📄 Utilizzare materiale di propagazione sano (talee da piante madri controllate)
- 📄 Evitare la formazione di lesioni o ferite sulla pianta, che come detto, costituiscono la via d'ingresso del patogeno. In ogni caso è bene far cicatrizzare l'eventuale ferita.
- 📄 Eliminare le piante infette (bruciandole).
- 📄 Effettuare la rotazione degli appezzamenti.
- 📄 Evitare ristagni d'acqua.
- 📄 Acidificazione del terreno con zolfo o concimi acidi (pratica che sfavorisce il batterio, non lo elimina).
- 📄 Utilizzo di sostanze antibiotiche attive contro il batterio.
- 📄 Rame

Controllo biologico

- 📄 Il controllo della malattia non può essere effettuato attraverso "l'asportazione chirurgica".
- 📄 Un rimedio "tradizionale", la cui efficacia è però limitata, consiste nell'applicazione sulla massa tumorale, o sulle superfici di taglio, di una emulsione di idrocarburi aromatici
 - 📄 (es: Bacticin: m-cresolo, 0.4%; olio di paraffina, 60%; trietanolamina, 6%; acido stearico, 3%)
- 📄 Questi composti sono capaci di penetrare i tessuti tumorali devitalizzando i batteri e le cellule trasformate, ma lasciando indisturbate le cellule normali.

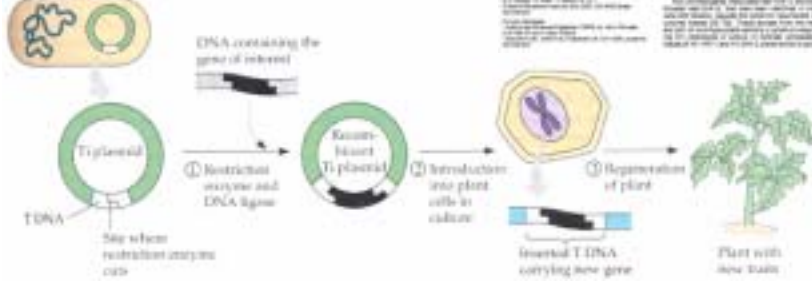
Agrobacterium-mediated transformation of tobacco plants carrying a fire gene of *Tylosis* origin and the *hpt* allele as marker gene

Abstract The Agrobacterium-mediated transformation of tobacco plants carrying a fire gene of *Tylosis* origin and the *hpt* allele as marker gene was studied. The fire gene was cloned from the *Tylosis* genome and inserted into a *Tylosis* Ti plasmid. The *hpt* allele was also cloned from the *Tylosis* genome and inserted into the same Ti plasmid. The resulting Ti plasmid was used for the transformation of tobacco plants. The transformed plants were regenerated and analyzed for the presence of the fire gene and the *hpt* allele. The results showed that the fire gene and the *hpt* allele were successfully transformed into tobacco plants. The transformed plants showed a high level of transformation efficiency. The fire gene was expressed in the transformed plants, and the *hpt* allele was used as a marker gene. The results indicate that the Agrobacterium-mediated transformation of tobacco plants carrying a fire gene of *Tylosis* origin and the *hpt* allele as marker gene is a highly efficient and reliable method.

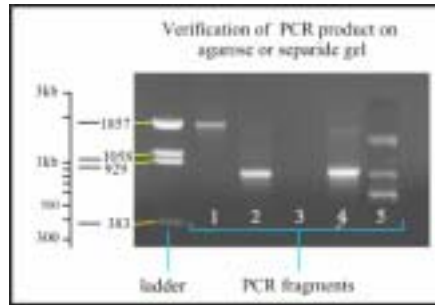
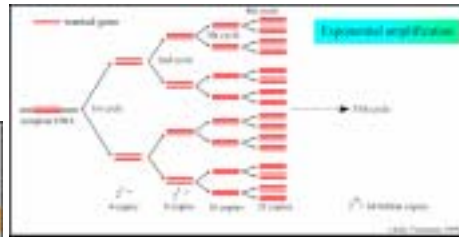
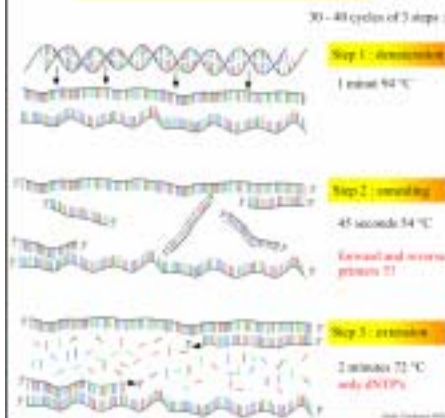
Introduction
The fire gene is a natural defense gene of *Tylosis* that confers resistance to fire. The fire gene was cloned from the *Tylosis* genome and inserted into a *Tylosis* Ti plasmid. The *hpt* allele was also cloned from the *Tylosis* genome and inserted into the same Ti plasmid. The resulting Ti plasmid was used for the transformation of tobacco plants. The transformed plants were regenerated and analyzed for the presence of the fire gene and the *hpt* allele. The results showed that the fire gene and the *hpt* allele were successfully transformed into tobacco plants. The transformed plants showed a high level of transformation efficiency. The fire gene was expressed in the transformed plants, and the *hpt* allele was used as a marker gene. The results indicate that the Agrobacterium-mediated transformation of tobacco plants carrying a fire gene of *Tylosis* origin and the *hpt* allele as marker gene is a highly efficient and reliable method.



Agrobacterium *fastidiosus*



PCR: Polymerase Chain Reaction

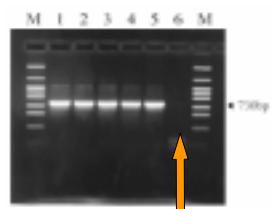


I primers universali C1 e C2 vengono utilizzati per amplificare una regione di 730bp che circonda un frammento compreso tra i geni del plasmide *virC2* e *virC1*



```

100:  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG
105:  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG
110:  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG
115:  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG
120:  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG
125:  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG
130:  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG
135:  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG
140:  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG
145:  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG
150:  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG
155:  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG
160:  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG
165:  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG
170:  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG
175:  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG
180:  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG
185:  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG
190:  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG
195:  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG
200:  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG  GGGGGGGG
    
```



Ceppo non contenente *Ti* utilizzato come controllo negativo

“Mal Nero”

Xylophilus ampelinus



- ☞ Necrosi della vite causata da una infezione batterica segnalata per la prima volta in Sicilia (1879) ed attribuita a *Bacillus vitivorus*
- ☞ Successivamente (1969) la malattia fu associata ad un altro batterio *Xanthomonas ampelina*.
- ☞ Recentemente uno studio di tassonomia molecolare ha dimostrato che il mal nero è da attribuire ad un nuovo β -Proteobacteria chiamato *Xylophilus ampelinus* (Willems et al. 1987)

- ☞ La batteriosi da *X. Ampelina* provoca un progressivo deperimento della pianta, interessando tutti gli "organi aerei"
- ☞ Fin dalla ripresa vegetativa si possono osservare annerimenti o disseccamenti delle gemme e dei germogli con comparsa su questi ultimi di spaccature longitudinali.
- ☞ Durante il periodo estivo sono visibili lesioni cancerose sui tralci
- ☞ Sulle foglie si osservano inizialmente piccole maculature che poi evolvono in aree necrotiche generalmente circondate da un alone giallastro. Queste regioni disseccano ai margini del lembo fogliare
- ☞ Sui grappoli si nota un annerimento della infiorescenza e disseccamento della parte distale



- 📄 La diffusione della malattia avviene principalmente a causa dell'utilizzo di marze contaminate con il batterio durante gli innesti
- 📄 *X. ampelinus* può sopravvivere a lungo nelle strutture vascolari della vite
- 📄 La trasmissione del batterio avviene prevalentemente durante la potatura, soprattutto quando questa viene effettuata alla ripresa vegetativa
- 📄 L'infezione può avvenire anche nelle fasi di germogliamento ad opera di cellule batteriche trasportate da vento e pioggia
- 📄 I batteri penetrano nei tessuti sottoepidermici in corrispondenza di necrosi e spaccature corticali



Distribuzione della malattia

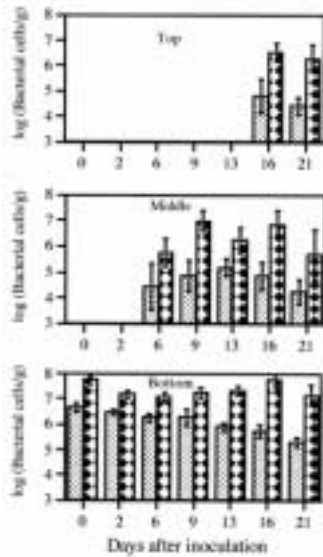
↘ Italia	mal nero
↘ Francia	maladie d'Oléron
↘ Grecia	tsilik marasi
↘ Spagna	necrosi batteriana
↘ Sud Africa	vlamsiekte
↘ US	bacterial blight

- L'epidemia batterica rilevata in Francia tra il 1993 ed il 1997, venne attribuita a cambiamenti nelle strategie di coltivazione
 - ✦ Uso di macchine da potatura e da taglio per la raccolta dei grappoli
- La gravità dell'epidemia può variare di anno in anno, con alcuni casi (Grecia) in cui si è avuta una completa sparizione della malattia

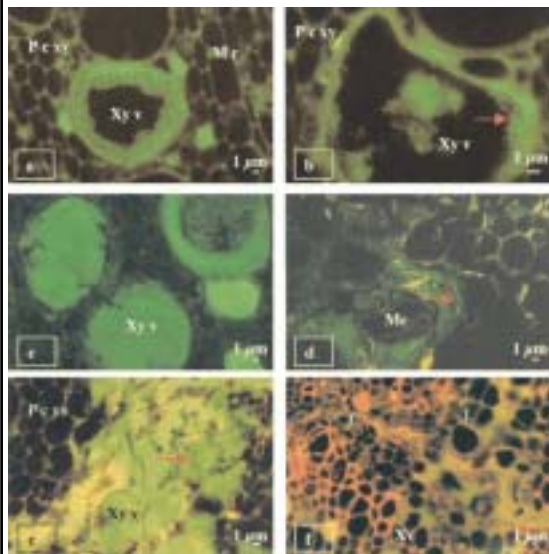
- Non è chiaro quale sia il meccanismo di virulenza del batterio all'interno dei tessuti dell'ospite
- Grall & Manceau 2003 marcarono alcuni ceppi di *X. Ampelinus* con *gfp* (green fluorescent pigment, pUT-*gfp*) per permettere la loro osservazione nel sistema vascolare delle piante
- I ceppi marcati furono nebulizzati su radici, foglie e rami di vite

GFP Bunny





- Colonization of plantlets of *V. vinifera* cv. Ugni blanc by *X. ampelinus* mutant strain 2098::gfp 2 in stems and leaves after inoculation by spraying onto vegetative organs. The bottom parts of the plants correspond to the organs that had developed at the time of inoculation, the middle parts correspond to organs newly developed 3 days after inoculation, and the top parts correspond to organs developed later than 13 days after the time of inoculation.



Xy v, xylem vessel; P c xy, parenchymal cells of the xylem; M r, medullar rays; Me, medulla; L, liber; C, cambium; Xv, xylem vessels.

- FIG. 6. Micrographs of transversal stem slices of *V. vinifera* cv. Ugni blanc showing the location of *X. ampelinus* strain 2098::gfp 2 in the stem tissues under UV light. The transverse slices were 5 μ m thick. The bacterial cytoplasm fluoresces in green. (a) Xylem vessels with bacteria aggregated along the walls in the sixth internode 18 days after inoculation. Bacteria were found among parenchymal cells of the xylem and among the medullar rays. (b) The same xylem vessel a little lower in the internode. A few aggregates of bacterial cells are seen in the middle of the vessel and along the walls. Bacterial cells are easily visible (arrow). (c) Five xylem vessels full of bacteria in the fifth internode 80 days after inoculation. (d) Medulla cells invaded by the bacteria and consequently disorganized (arrow), in the top part of the sixth internode 22 days after inoculation. (e) A xylem bundle totally invaded by the bacteria,

How to succeed in parasitic life without sex? Asking *Leishmania*

Kathleen Irvine and Juan-Claudio Estrella

Leishmania parasites reproduce asexually in the sandfly vector, but they also have a sexual phase in the mammalian host. The parasite's life cycle is a complex interplay of asexual and sexual reproduction, and understanding how it succeeds in parasitic life without sex is a key question in parasitology.

Leishmania parasites reproduce asexually in the sandfly vector, but they also have a sexual phase in the mammalian host. The parasite's life cycle is a complex interplay of asexual and sexual reproduction, and understanding how it succeeds in parasitic life without sex is a key question in parasitology.

Leishmania parasites reproduce asexually in the sandfly vector, but they also have a sexual phase in the mammalian host. The parasite's life cycle is a complex interplay of asexual and sexual reproduction, and understanding how it succeeds in parasitic life without sex is a key question in parasitology.

Leishmania parasites reproduce asexually in the sandfly vector, but they also have a sexual phase in the mammalian host. The parasite's life cycle is a complex interplay of asexual and sexual reproduction, and understanding how it succeeds in parasitic life without sex is a key question in parasitology.

Leishmania parasites reproduce asexually in the sandfly vector, but they also have a sexual phase in the mammalian host. The parasite's life cycle is a complex interplay of asexual and sexual reproduction, and understanding how it succeeds in parasitic life without sex is a key question in parasitology.

Leishmania parasites reproduce asexually in the sandfly vector, but they also have a sexual phase in the mammalian host. The parasite's life cycle is a complex interplay of asexual and sexual reproduction, and understanding how it succeeds in parasitic life without sex is a key question in parasitology.

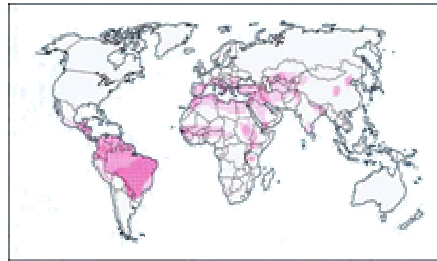


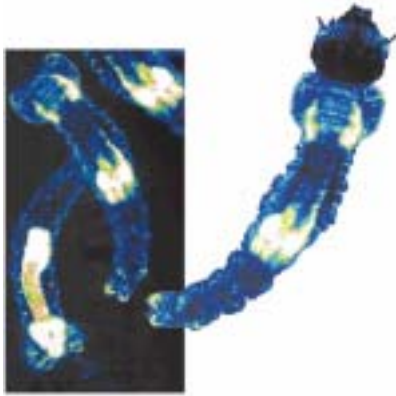
Fig. 4.2. Distribuzione geografica su scala mondiale delle diverse forme di leishmaniosi. Le aree di endemicità della leishmaniosi cutanea, della forma cutanomucosa e di quella viscerale sono indicate, rispettivamente, dal tracciato color magenta orizzontale, verticale ed obliquo.



Anopheles stephensi



- Uno dei principali vettori della malaria nelle regioni urbane della penisola indiana
- Attraverso un sistema di trasformazione genetica potrebbero essere rilasciati nell'ambiente alcuni ceppi dell'insetto vettore incapaci di trasmettere il parassita

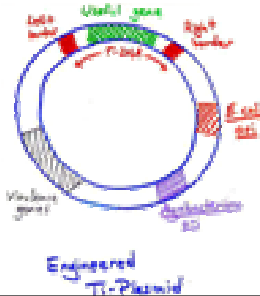


Stable germline transformation of the malaria mosquito *Anopheles stephensi*

Rebecca Callaway^{1,2}, Tony Blair^{1,2}, Thomas E. Conrath^{1,2}, David B. Clark^{1,2}, Christopher Landolt^{1,2}, Felix G. Salje^{1,2} & Bruce Strand^{1,2}

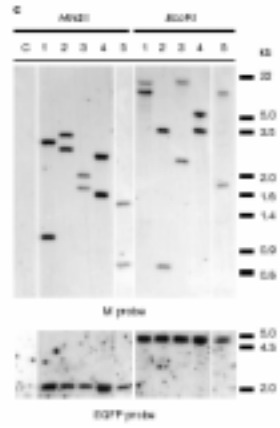
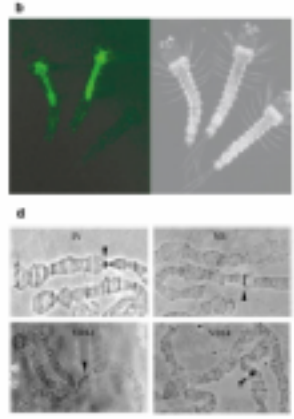
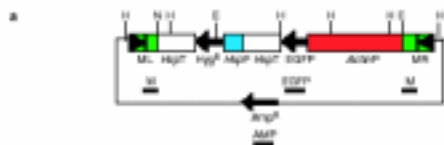
¹Department of Entomology, Washington State University, Pullman, WA, USA; ²Washington State University, Mosquitoes and Malaria Research Center, Pullman, WA, USA

Genetic and genomic information on malaria vectors has expanded substantially during the last decades. However, further progress is impeded by the lack of germline transformation, a key technology fundamental to the study of mosquito biology. The development of germline transformation techniques has provided, in a clear case, a long list of beneficial information on genes involved in subgenomic, tissue-specific, immediate-early, sex, seasonal/regional, behavioral and larval traits. The recent development of methods for germline

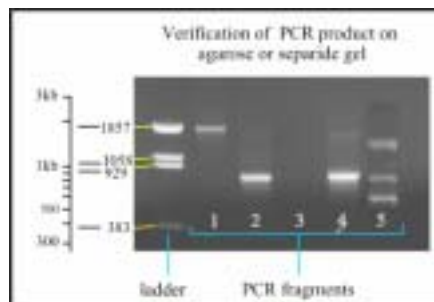
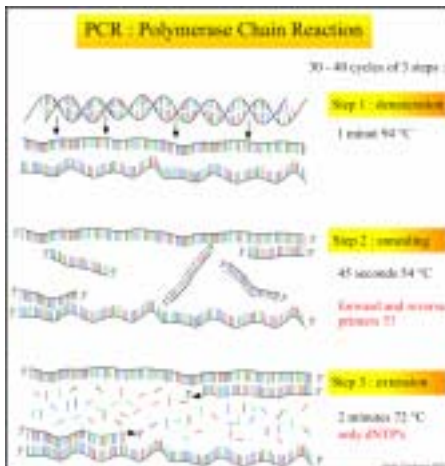


- Fluorescenza di larva transgenica di *A. stephensi*.

gfp (green fluorescent pigment, pUT-*gfp*)



- Le cellule batteriche si sviluppano nei vasi linfatici dando origine ad aggregati o biofilms
- La moltiplicazione dei batteri è più veloce rispetto alla sua progressione nella pianta. Questo causa l'occlusione di alcuni nodi e la distruzione di intere porzioni del sistema vascolare della vite
- L'identificazione del batterio è complicata dal fatto che i sintomi dell'infezione sono sovrapponibili con quelli di altri patogeni come nel caso del fungo *Phomopsis viticola*
- *X. ampelinus* cresce lentamente nei più comuni terreni di coltura
- L'identificazione basata sull'utilizzo di anticorpi monoclonali non è attuabile di routine a causa della bassa sensibilità e dell'incompatibilità con la rilevazione di infezioni latenti



subtractive hybridization

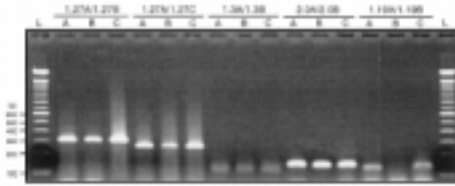


Figure 4. PCR amplification of *X. ampelinus* strains C78P 041 (A), *X. ampelinus* strain C78P 200 (B), *X. ampelinus* strain C78P 208 (C), *X. ampelinus* strain 1.276.1.276 (D), 1.276.1.276 (E), 1.276.1.276 (F), 1.276.1.276 (G), 1.276.1.276 (H), 1.276.1.276 (I), and 1.276.1.276 (J) by using the primer set 1.276.1.276-F and 1.276.1.276-R. Lane A is the DNA ladder (Pharmacia LKB).

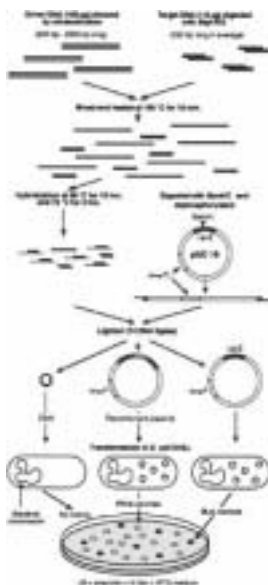
- 5 coppie di primers specifiche per *X. ampelinus* hanno amplificato frammenti di grandezza nota in diversi ceppi del batterio
- Questo approccio permette grazie al solo esperimento di PCR di identificare la presenza di questo batterio patogeno da un preparato sospetto di vite

subtractive hybridization

Tecnica di biologia molecolare, basata sulla PCR, per esplorare delle differenze strutturali esistenti tra genomi di due batteri affini

Usando come DNA driver alcune specie batteriche affini a *X. ampelinus*, appartenenti al genere *Acidovorax*, è stato possibile clonare una porzione di riferimento del DNA della specie in esame

Sono state sintetizzate delle sonde e dei primers "specie specifici" da usare per l'identificazione diretta di *X. ampelinus*



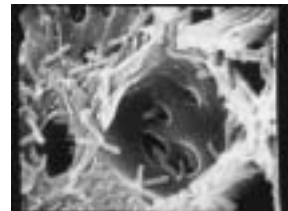
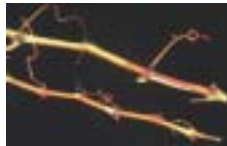
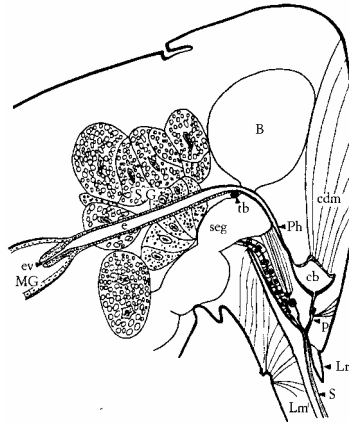
Malattia di Pierce (PD=Pierce disease)

Xylella fastidiosa

Xylella fastidiosa

- ✚ Gram -
- ✚ Localizzato nello xilema di alcune piante quali: trifoglio, agrumi ed anche nella vite
- ✚ Tipico dell'America dell'Ovest (California) in zone umide e dalle temperature miti
- ✚ Viene trasmesso attraverso la puntura di diversi insetti vettori omotteri, appartenenti alla famiglia Cicadellidae, sottofamiglia Cercopidae
- ✚ In Europa è presente solo a livello di segnalazione.
- ✚ In Italia è stata importata con il materiale di moltiplicazione delle uve da tavola (Americane).

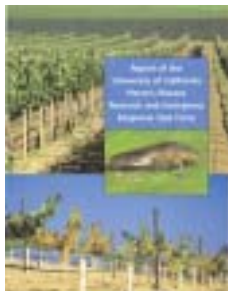
Apparato boccale di un omottero



In primavera, durante il risveglio vegetativo, causa occlusioni del sistema vascolare della pianta, con conseguente ingiallimento delle foglie e necrosi diffusa. Porta alla morte della pianta nel giro di 2 anni



- ↘ Riduzione del vigore vegetativo
- ↘ Accorciamento degli internodi
- ↘ Necrosi del margine fogliare
- ↘ Disseccamento di rami e foglie



- ↘ Nell'estate del 1999 più di 300 acri di vitigni vicino a Temecula vennero uccisi a causa della malattia di Pierce (PD)
- ↘ PD è causata dal batterio *Xylella fastidiosa* il quale occlude lo xilema delle piante inibendo il processo di assunzione di acqua e nutrienti.
- ↘ In California la malattia è stata per la prima volta segnalata nel 1880 quando distrusse più di 40,000 acri di giovani vitigni vicino a Los Angeles. Da quel momento in poi si sono susseguite annate di stasi seguite da altre dove la malattia ha raggiunto un'alta incidenza.

Insetto vettore e principali zone a rischio



blue-green
sharpshooter
(BGSS)



- ✧ La dispersione della PD in California è essenzialmente legata all'areale di distribuzione dell'insetto vettore.
- ✧ La più alta incidenza è stata osservata in prossimità di corsi d'acqua e dei terreni irrigati.
- ✧ Il principale insetto vettore è il **blue-green sharpshooter (BGSS)**.
- ✧ A partire dal 1994 più di 1000 acri di vitigni infetti sono stati eliminati e sostituiti con un costo aggiuntivo di 30 milioni di dollari



- ✧ L'areale di distribuzione dell'epidemia batterica è comunque sovrapponibile con quello dell'insetto vettore.
- ✧ Per limitare il diffondersi della malattia i viticoltori devono ridurre il numero di cicadellidi presenti nell'ambiente.

- ✧ Gli adulti del BGSS hanno una generazione di vita annuale. Alcuni adulti possono comunque rilasciare uova in uno stadio di vita precoce dando origine ad una seconda generazione annuale parzialmente sovrapposta con la prima
- ✧ Al termine della stagione riproduttiva alcuni adulti riescono a sopravvivere durante i mesi invernali, per poi rilasciare le uova nella primavera successiva.
- ✧ BGSS mantengono per tutta la vita nel loro apparato boccale il batterio responsabile della PD (*X. fastidiosa*)

- ❑ Alcuni studi condotti delle Università Californiane hanno rilevato che il trattamento delle viti con opportuni insetticidi permette la riduzione del numero degli insetti vettori e di conseguenza la limitazione della PD
- ❑ I fanghi di kaolina inibiscono la deposizione delle uova dei cicadellidi nelle piante
- ❑ Nebulizzati di piretroidi, organofosfati, carbammati ed imidoaclopridi hanno la capacità di uccidere un gran numero di insetti svernanti
- ❑ Il controllo dei cicadellidi deve comunque essere effettuato isolando i vitigni da altre coltivazioni come quelle di agrumi e mandorli, che possono ospitare l'insetto vettore e fungere da serbatoio per il batterio parassita



- ❑ Alcuni entomologi stanno sperimentando il rilascio nell'ambiente di parassitoidi, quale l'imenottero *Gonotocerus triguttatus*, che depongono le loro uova all'interno delle uova dei cicadellidi
- ❑ In particolare sono state introdotte vespe messicane e texane, capaci (contrariamente a quelle autoctone californiane) di deporre uova in coincidenza con l'ovideposizione dei cicadellidi
- ❑ È stato osservato che gli sharpshooters posseggono delle preferenze ambientali: prediligono ambienti riparati dalla luce solare e non svernano ad altitudini inferiori ai 500 piedi perché la nebbia che si forma in queste zone rende le temperature invernali più rigide



- Sono stati sperimentati degli incroci dei vitigni locali con varietà di chardonnay e cabernet sauvignon resistenti a *X. fastidiosa*
- E' stato sperimentato l'utilizzo di batteri endofitici per degradare la cosiddetta "xanthan gum" una sostanza prodotta da *X. fastidiosa* capace di occludere i vasi linfatici di *Vitis vinicola*
- Alcuni ricercatori brasiliani hanno sequenziato l'intero genoma del batterio nel tentativo di identificare i geni responsabili della adesione della cellula di *X. fastidiosa* con lo xilema della pianta



The image shows a screenshot of a web browser displaying a scientific article from the journal Nature. The article title is "The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*". The text is partially legible, showing the beginning of the abstract and the start of the main text. The browser's address bar shows the URL: <http://www.nature.com/news/2014/04/23/51011a>. The article is dated 23 April 2014.



This image shows a close-up of a green grape. A small, white, fuzzy growth, characteristic of the bacterium *Xylella fastidiosa*, is visible on the surface of the grape. A small inset image shows a cluster of grapes with similar growths.



This diagram illustrates the internal structure of a grapevine stem. It shows the xylem (water-conducting tissue) and the phloem (nutrient-conducting tissue). The diagram is color-coded to show different parts of the stem, including the vascular bundles and the surrounding cortex.



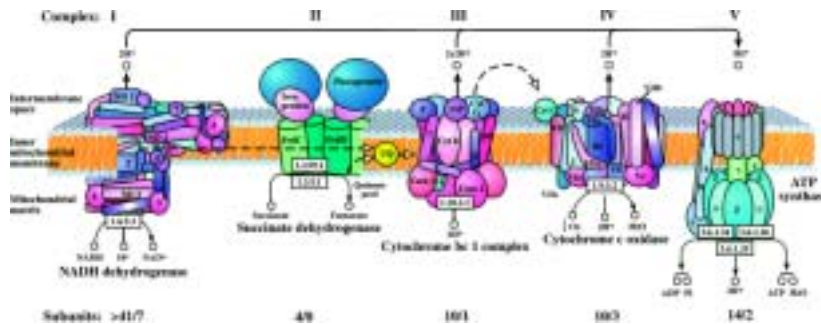
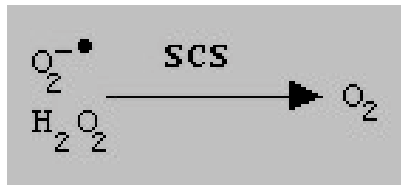
ROS (reactive oxygen species)

$O_2^{\cdot-}$ anione superossido

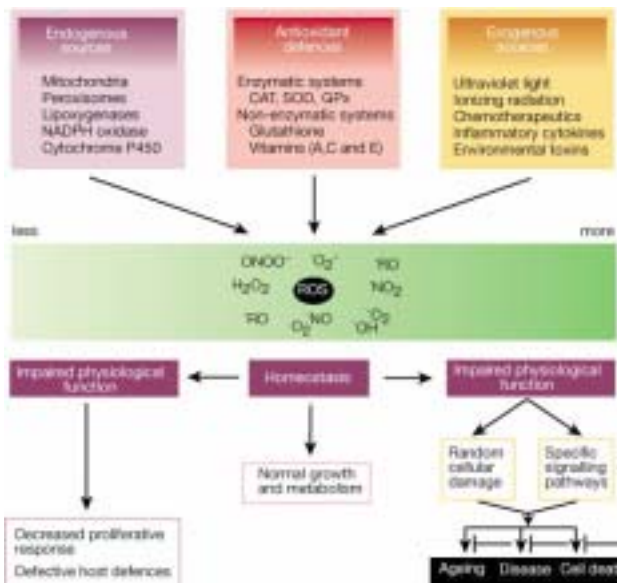
OH^{\cdot} radicale idrossilico

H_2O_2 perossido di idrogeno

Ossidanti, stress ossidativi ed invecchiamento



Gli elettroni di NADH e FADH₂, prodotti durante il ciclo dell'acido citrico, fluiscono lungo l'ETC e sono accoppiati con un gradiente di protoni che viene utilizzato per la produzione di ATP



The bugs from Brazil

A... [text continues]



Need to compare 'tree plant pathogen'

... [text continues]

new feature

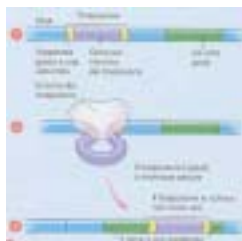
A springboard to success

... [text continues]




- ❑ La sequenza dell'intero genoma di *Xylella fastidiosa* potrebbe permettere l'eradicazione della malattia dando modo ai ricercatori di intervenire nei processi metabolici essenziali del batterio.
- ❑ Esistono un centinaio di geni di *X. fastidiosa* che regolano il processo di adesione del parassita alla cavità boccale del vettore ed alle cellule dello xilema. Rimuovendo tali geni si impedirebbe di fatto la diffusione del parassita dall'ospite alla pianta.

- ✓ Alcuni ricercatori dell'Università della Florida hanno usato un trasposone per inserire un gene del baco da seta (silkworm) che codifica per una proteina chiamata cecropina che è capace di legarsi alle membrane cellulari e di lisarle. Sembra che *X. Fastidiosa* sia molto più sensibile alla proteina rispetto alle cellule vegetali ed animali



Nuovo insetto vettore!!!



Glassy-Winged sharpshooter (GWSS)

- Presente in California dal 1990:
- Più grande e vorace del BGSS
- Migliore volatore
- Si nutre anche di tessuti vegetali “vecchi” risultando più efficace nel trasmettere la malattia di Pierce



Ragioni per temere la PD nel Vecchio Continente



Philaenus spumarius

- The spread of this disease occurs through the movement of infected propagation material and xylem-feeding insects. The spittle bug (*Philaenus spumarius*) which is present in New Zealand is a known vector of Pierce's disease. The major American vectors, for example the glassy-winged sharpshooter, do not occur in New Zealand or Australia.
- Campi di erba medica possono ospitare il batterio
- Vivaismo
- Ricerche preliminari hanno dimostrato che Chardonnay, Pinot Nero, Merlot e Barbera sono vitigni molto sensibili alla PD

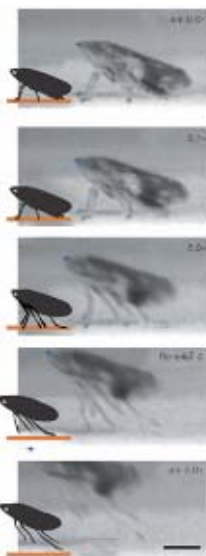
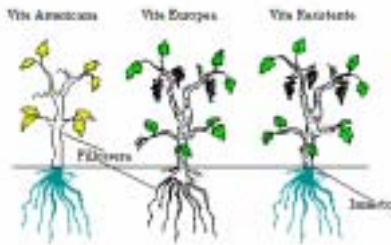
Fillossera



Marza
Piede porta innesto

autoctona
americana

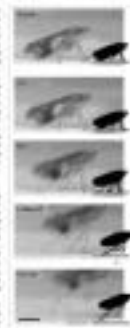
“...la soluzione al problema, fu trovata con uno stratagemma che è probabilmente anche il primo esempio di lotta biologica della storia dell'umanità: innestare sulle radici delle viti americane, resistenti all'insetto, le vite europea che possiede una costituzione delle foglie non gradita alla fillossera”



Froghopper insects leap to new heights

Amphibious flying insects probably chose to fly to the top of the world's tallest trees

They do not just jump, they leap. The froghopper is a unique insect that can jump up to 100 times its body length. This ability is due to its unique jumping mechanism, which involves a complex sequence of movements. The froghopper's jumping mechanism is a result of its unique anatomy, which includes a large, powerful hind leg and a specialized jumping organ called the tymbal. The froghopper's jumping mechanism is a result of its unique anatomy, which includes a large, powerful hind leg and a specialized jumping organ called the tymbal. The froghopper's jumping mechanism is a result of its unique anatomy, which includes a large, powerful hind leg and a specialized jumping organ called the tymbal.



The froghopper's jumping mechanism is a result of its unique anatomy, which includes a large, powerful hind leg and a specialized jumping organ called the tymbal. The froghopper's jumping mechanism is a result of its unique anatomy, which includes a large, powerful hind leg and a specialized jumping organ called the tymbal. The froghopper's jumping mechanism is a result of its unique anatomy, which includes a large, powerful hind leg and a specialized jumping organ called the tymbal.

FITOPLASMI

- La Flavescenza Dorata (Giallume)
 - Legno Nero

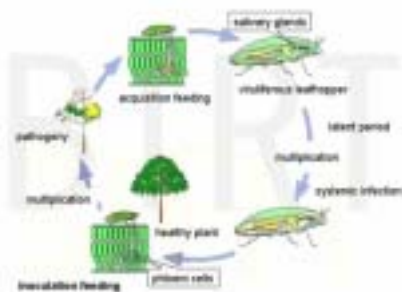
La Flavescenza Dorata

Il Legno Nero

?



Generalità sui fitoplasmi



- Sono dei procarioti che mancano del rivestimento della membrana cellulare
- Sono in grado di sintetizzare i costituenti necessari per la replica del loro DNA
- Vengono inseriti nella Classe *Mollicutes* (Agrios, 1997).
- Vengono associati a numerose malattie delle piante

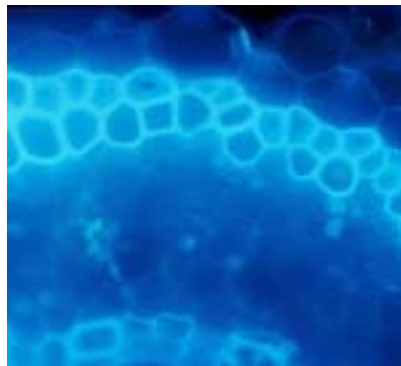
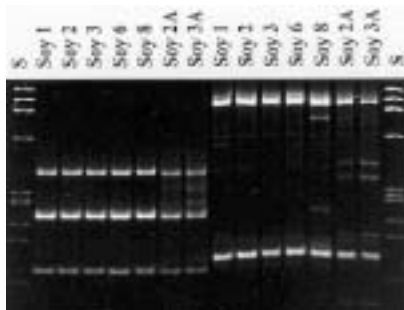
- Posseggono un cromosoma di 680-1600Kb
- Vivono in liquidi ad alta pressione osmotica
- Sono parassiti obbligati
- Sono poco conosciuti perché non si riesce ad allevarli in coltura
- Diverse malattie delle piante (fitoplasmosi) sono state associate a questi procarioti
- Le tetracicline sono gli unici antibiotici efficaci contro i fitoplasmii



The screenshot shows a search for "phytoplasma" on the NCBI website. The search results list four complete genome sequences of phytoplasmas, each with its accession number and a brief description:

- 1. [JF930393](#): *Candidatus phytoplasma*, complete genome (gi19936486) [282,805,903] [1378]
- 2. [JF930392](#): *Aster yellows phytoplasma plasmid pHT57*, complete sequence (gi18248953) [842,803,951] [15911]
- 3. [JF930391](#): *Phytoplasma sp. strain Klen Kera plasmid pFIE*, complete sequence (gi18956703) [802,900] [15191]
- 4. [JF930390](#): *Tomato yellow leaf-roll virus phytoplasma plasmid pHT58*, complete sequence (gi19144239) [804,822] [17101]

Nonostante queste difficoltà sono stati completamente sequenziati 4 genomi di fitoplasmii



Gli "Spots" Fluorescent
rappresentano porzioni di
floema tissutale parassitato
da fitoplasmi phytoplasmas.



- Lo *Scaphoideus titanus* è un insetto appartenente all'ordine Rhynchota, sottordine Homoptera, famiglia Cicadellidae.
- Originario del nord America (Stati Uniti e Canada) è stato introdotto accidentalmente in Europa (Francia) negli anni '60.
- In Italia è stato individuato per la prima volta in Liguria nel 1963, ora è molto diffuso in quasi tutte le regioni viticole settentrionali al di sopra della Toscana, soprattutto Liguria, Lombardia (Valtellina esclusa), Veneto, Piemonte, Val d'Aosta, Friuli Venezia-Giulia, Emilia Romagna, alcune aree del Trentino.

- Extraction of Phytoplasm DNA From LeafHoppers** Solutions as for Carrot Extraction with the exception of :Extraction Buffer For 100 ml 2% CTAB 4 g CTAB 100 mM Tris-HCl pH 8.0 10 ml 1M Tris-HCl pH 8.0 20 mM EDTA 4 ml 0.5M EDTA pH 8.0 1.4M NaCl 8.2 g Bring to 100 ml with ultrapure water**Extraction procedure**1.Place a single leafhopper in a 1.5 ml tube 2.Add 200 µl of extraction buffer at 60 ° C and 2 µl of 0.5 M DTT ,and grind with a motorized micro pestle until completely macerated, incubate at 60 ° C for 15-30 minutes. 3.Add 200 µl of chloroform: Isoamylalcohol and mix by inversion, centrifuge for 15 min at 9000 rpm. 4.Carefully remove the aqueous layer and place in a clean 1.5 ml tube, add 400 µl of cold absolute (100%) ethanol and incubate at -20 ° C for 2 hours (overnight is good too) 5.After incubation centrifuge for 15 min at 14 000 rpm 6.Carefully decant the supernatant and wash the pellet with 70 % ethanol, incubate for 15 min at room temperature, and centrifuge for 15 min at 14 000 rpm. 7.Remove all traces of ethanol and air dry, after drying dissolve the pellet in 20 µl of TE and store at -20 ° C. 8. Use 2 µl of the sample for a 25 µl PCR.

- La Flavescenza dorata rappresenta oggi la malattia probabilmente più temuta nei vigneti del nord Italia, in quanto è quella che ha avuto maggior diffusione.
- Oggi questa malattia è diffusa nella Francia centro meridionale, in Corsica, nel nord Italia e nel nord della Spagna.
- La Flavescenza dorata appartiene al complesso dei giallumi della vite (tra i quali è compreso anche il Legnonero, o Bois noir), inclusi in un raggruppamento più ampio che è quello dei Giallumi dell'olmo.
- Il cicadellide *Scaphoideus titanus* è stato segnalato anche nella provincia di Massa Carrara (1998), sebbene i vigneti della zona non presentassero i sintomi della flavescenza dorata.

Le piante colpite da FD manifestano i primi sintomi l'anno successivo rispetto a quando è avvenuta l'infezione da parte dello **S. titanus**. L'espressione dei sintomi varia in funzione della sensibilità varietale; ci sono vitigni più o meno sensibili alla malattia, che manifestano in maniera più o meno evidente i sintomi. **Varietà molto sensibili sono: Chardonnay, Pinot grigio, Barbera, Trebbiano, Sangiovese, Cabernet franc, Garganega.** L'espressione dei sintomi, inoltre, ha un andamento molto irregolare sulla stessa pianta; può variare da tralcio a tralcio, ed anche da un anno a quello successivo. Raramente la pianta infetta muore; **la FD porta ad un graduale deperimento della pianta ed alla compromissione quantitativa e qualitativa della produzione.** I primi sintomi, lievi, compaiono a fine primavera, inizio estate. Con l'avanzare della stagione si rendono sempre più manifesti, fino a raggiungere la loro massima espressione in tarda estate, autunno.

Germogli: alla ripresa vegetativa i tralci infetti possono avere germogliamento stentato, o addirittura assente. Gli internodi risultano raccorciati e hanno andamento a zig-zag.

Tralci: i tralci infetti non lignificano, ma rimangono verdi ed assumono consistenza "gommosa"; si ripiegano verso il basso dando alla pianta un aspetto cadente. Inoltre si ricoprono in superficie di numerose piccole pustole nere.

Foglie: presentano alterazioni di colore estese all'intera lamina fogliare (solo in pochi casi limitata a settori), comprese le nervature; arrossamenti nelle varietà a bacca nera, ingiallimenti nelle varietà a bacca bianca. La lamina fogliare si ispessisce assumendo consistenza cartacea, e si accartocchia verso il basso. Spesso si ha la caduta anticipata delle foglie sui tralci infetti, mentre i piccioli rimangono attaccati.

- Lo *S. titanus* vive esclusivamente sulla vite, dove svolge una sola generazione l'anno.
- Sverna allo stato di uova (giallo chiare, in gruppi di 10-12) deposte al di sotto della corteccia dei tralci di due anni.
- Le prime forme giovanili (prima neanidi e poi ninfe) compaiono a metà maggio e sono visibili sulla pagina inferiore delle foglie più basse della pianta.
- Si susseguono 5 stadi evolutivi: 2 stadi di neanide e 3 stadi di ninfa.
- Le neanidi sono di colore bianchiccio, con due caratteristiche macchie nere all'estremità addominale, e non hanno abbozzi alari. Le ninfe, invece, hanno un colore via via più scuro e presentano i primi abbozzi delle ali.
- I primi adulti sfarfallano a luglio, e permangono fino ad agosto inoltrato nella vegetazione fitta della pianta, sempre localizzati sulla pagina inferiore delle foglie.

DANNI

- Gli stadi giovanili succhiano la linfa dalle nervature fogliari di ordine inferiore, mentre gli adulti si alimentano da quelle principali.
- La pericolosità di quest'insetto, però, non è dovuta tanto ai danni diretti (limitati e trascurabili) che può arrecare alla vegetazione in seguito alla sua attività trofica, ma per lo più è dovuta al suo ruolo di vettore del fitoplasma della Flavescenza dorata.

Le popolazioni di *S. titanus* vengono facilmente abbattute con i trattamenti insetticidi, se effettuati nei tempi e nelle dosi giuste

- **Insetticidi Regolatori di crescita - IGR** - impiegati per il primo trattamento, efficaci contro le forme giovanili: buprofezin ("Applaud" Sipcam), flufenoxuron ("Cascade" Basf), indoxacarb ("Stewart"). Massimo 1 intervento.
- **Esteri fosforici** - efficaci contro le forme giovanili e gli adulti: Fenitrothion ("Fenitrocap" Bayer, "IPM" Aventis), clorpirifos ("Dursban" Dow, "Alisè" Sipcam), clorpirifos-etile. Massimo 2 interventi.
- **Fenossiderivati** - efficaci contro le forme giovanili e gli adulti: Etofenprox ("Trebbon" Sipcam) utilizzabile non più di una volta l'anno. Massimo 1 intervento l'anno.
- **Prodotti a base di piretro naturale**: piretrine ("Piretrix10"), piretrine + piperonil butossido (inefficaci i prodotti a base di rotenone).

Legno Nero



- **SINTOMI**

- I sintomi del Legno nero sono quelli tipici di tutte le malattie da fitoplasma, quindi facilmente confondibili con gli altri giallumi (praticamente sono uguali a quelli provocati dalla Flavescenza dorata) :
- decolorazioni settoriali delle foglie (ingiallimenti nelle cv bianche, arrossamenti in quelle nere), che si estendono poi all'intera lamina fogliare, includendo anche le nervature;
- accartocciamento verso il basso della lamina fogliare, che assume consistenza cartacea (croccante);
- raccorciamento degli internodi;
- mancata lignificazione dei tralci, che assumono consistenza gommosa e tendono a ricadere verso il basso;
- frequente presenza sui tralci di punteggiature nere;
- disseccamento dei grappolini, con totale perdita della produzione.

- Per poter distinguere quale sia il fitoplasma responsabile dell'infezione (Legno nero o Flavescenza dorata) è indispensabile ricorrere ad analisi di tipo molecolare.
- Le cv più suscettibili sono: Chardonnay, Pinot Grigio, Lambrusco, Sangiovese, Malvasia.

- **LOTTA**

- Non esistono prodotti chimici in grado di curare la malattia in maniera diretta. L'unico tipo di lotta possibile è la prevenzione.
- Effettuare trattamenti insetticidi cautelativi contro l'insetto vettore *Hyalesthes obsoletus* (gli stessi utilizzati contro la cicalina della FD, (*Scaphoideus titanus*).
- Eliminare focolai d'infezione e rifugi per il vettore; soprattutto le piante ospiti (erbacee spontanee) presenti all'interno o nelle vicinanze del vigneto.
- Non piantare cv sensibili.
- Considerare che viti spinte a produzioni elevate (soprattutto con elevate concimazioni azotate) sono maggiormente suscettibili all'infezione

- **Nei nostri areali l'insetto è stato ritrovato principalmente sull'ortica.** E' stato osservato che la normale lotta chimica effettuata nei vigneti contro lo Scafoideo, vettore della Flavescenza Dorata, e contro la tignoletta, non influenza la dinamica di popolazione di *Hyalesthes obsoletus*; infatti il vettore non viene quasi mai a contatto con l'insetticida, in quanto le forme giovanili vivono sottoterra e gli adulti solo saltuariamente visitano la vite.
- Fondamentale quindi il ruolo delle piante erbacee come ortica e convulvolo che, oltre ad essere ospiti dell'insetto vettore, fungono da serbatoio della malattia (l'ortica senza manifestare alcun sintomo).



Take home #1

- **Rispetto alla Flavescenza dorata, il Legno nero desta meno preoccupazioni.** Questo perché, mentre lo *Scaphoideus titanus*, vettore della FD, vive e si riproduce solo sul genere *Vitis*, lo *H. obsoletus*, molto polifago, oltre che sulla vite può vivere tranquillamente anche su altre specie erbacee. Di conseguenza la malattia non è strettamente legata alla vite, e la sua diffusione è più lenta e meglio controllabile, e non assume andamento epidemico al pari della FD.

Take home #2

- **Tra i giallumi che colpiscono la vite il Legno Nero (LN) rappresenta la malattia associata a fitoplasmi più pericolosa e più difficile da controllare,** in quanto, al contrario della Flavescenza Dorata, l'agente eziologico e il suo vettore (il Rincote Omottero Ciixide *Hyaesthes obsoletus*) sono stati ritrovati, oltre che sulla vite, anche su numerose piante erbacee presenti in prossimità dei vigneti. Dalle ricerche condotte emerge che *Hyaesthes obsoletus*, il vettore del LN, è largamente diffuso nella provincia di Modena; svolge una sola generazione all'anno, sverna come stadio giovanile nelle radici delle piante erbacee e gli adulti sono presenti dalla metà di giugno alla metà di agosto.

Punti di vista?

**Necessità di nuovi fondi
per la ricerca?**

Prossimo appuntamento con gli agenti patogeni
della vite:

Sabato 11 Febbraio
(9:00-13:00)

Montalcino

“I FITOVIRUS”