

NUOVE ACQUISIZIONI SUI VETTORI DELLE FITOPLASMOSI DELLA VITE

E. ANGELINI, V. FORTE, L. FILIPPIN, E. PATRIARCA, M. BORGO
 CRA - VIT Centro di Ricerca per la Viticoltura
 Viale XXVIII aprile, 26, 31015 Conegliano (TV)
 elisa.angelini@entecra.it

RIASSUNTO

Flavescenza dorata (FD) e Legno nero sono due gravi giallumi trasmessi a vite da due specifici vettori, *Scaphoideus titanus* e *Hyalesthes obsoletus*, rispettivamente. Queste malattie causano ingenti perdite delle produzioni vitivinicole per il progressivo deperimento delle piante in vigneto e, nonostante l'applicazione di strategie di lotta, continuano ad espandersi nel territorio italiano. L'obiettivo di questo lavoro è stato di cercare nuovi vettori dei fitoplasmi della vite e di acquisire nuove conoscenze sui vettori già noti. È stato individuato un nuovo vettore di FD, la cicalina *Dictyophara europaea*, capace di trasmettere il fitoplasma FD da clematide a vite; dai dati raccolti sembra che la trasmissione a vite avvenga solo sporadicamente in vigneto. Tramite monitoraggio in diverse regioni viticole del Veneto sono state individuate consistenti popolazioni di *S. titanus* su portinnesti incolti ed inselvaticiti, che possono costituire un rischio per i vicini vigneti in produzione. È stata confermata la presenza di *H. obsoletus* in Veneto su ortica e convolvolo; inoltre è stata individuata una nuova pianta ospite, *Lamium orvala*, sulla quale sono stati rinvenuti sia gli stadi larvali che gli adulti dell'insetto.

Parole chiave: *Dictyophara europaea*, giallumi della vite, *Hyalesthes obsoletus*, *Scaphoideus titanus*

SUMMARY

NEW DATA ON INSECT VECTORS OF GRAPEVINE YELLOWS

Flavescence dorée (FD) and *Bois noir* are serious grapevine yellows transmitted by specific vectors, *Scaphoideus titanus* and *Hyalesthes obsoletus*, respectively. They cause heavy loss of grape and wine production and declining of plants in vineyard and, in spite of control strategies, are continuously spreading in Italy. The aim of this work was to identify new grapevine phytoplasma vectors and to gain new information on the known vectors. A new vector of FD phytoplasma was identified, the planthopper *Dictyophara europaea*, which showed to be able to transmit the phytoplasma from clematis to grapevine. Obtained data suggested that the transmission to grapevine in the field is sporadic. High populations of *S. titanus* were found on wild and abandoned rootstocks in several areas of Veneto region. They can have a role in the infection of the neighbour cultivated vineyards. *H. obsoletus* was confirmed to be present on nettle, bindweed in Veneto region. Furthermore, *H. obsoletus* nymphs and adults were found for the first time on *Lamium orvala*, which proved to be a new host plant.

Keywords: *Dictyophara europaea*, *Flavescence dorée*, grapevine yellows, *Hyalesthes obsoletus*, *Scaphoideus titanus*

INTRODUZIONE

I giallumi della vite sono patologie molto frequenti nei vigneti; sono causati da fitoplasmi, microrganismi simili ai batteri ma privi di parete cellulare. Due sono i principali giallumi che interessano la vite in Europa ed in Italia: la Flavescenza dorata (FD) ed il Legno nero (LN). Ambedue queste malattie causano gravi danni alla viticoltura, in particolare perdite di

produzione e progressivo deperimento delle piante in vigneto. Le due patologie sono trasmesse alla vite da due diversi insetti vettori di fitoplasmi.

FD viene trasmessa dalla cicalina *Scaphoideus titanus* Ball, che, essendo una specie strettamente ampelofaga, trasmette il fitoplasma da vite a vite con grande efficienza (Schvester *et al.*, 1961). Per questo motivo l'infezione ha una diffusione di tipo epidemico e FD è inserita fra le malattie da quarantena sulla base delle norme previste dalla Comunità Europea.

La trasmissione del fitoplasma associato a LN avviene tramite la cicalina polifaga *Hyalesthes obsoletus* Signoret, che lo acquisisce da piante infette di ortica e di convulvolo e lo trasmette poi a vite (Maixner, 1994; Sforza *et al.*, 1998; Alma *et al.*, 2002). Per questo motivo generalmente LN non dà luogo ad epidemie, ma piuttosto colpisce un numero limitato di viti nel vigneto.

La lotta contro i giallumi è basata principalmente sull'adozione di precisi piani di protezione fitosanitaria. Le sole strategie efficaci sono di tipo preventivo e contemplano l'estirpo delle piante infette e l'uso di insetticidi, che, nel caso dell'Europa, sono rivolti soprattutto contro *S. titanus*. Nonostante l'applicazione di tali strategie di lotta, i giallumi continuano ad espandersi nel territorio italiano ed a persistere nelle aree di primo insediamento.

È scaturita quindi l'esigenza di approfondire gli studi sui vettori dei giallumi della vite, al fine di cercare eventuali cause non ancora conosciute delle epidemie. Ciò infatti potrebbe rivelarsi utile per la messa a punto di nuove strategie di difesa da queste malattie. L'obiettivo di questo lavoro è stata l'individuazione di nuovi vettori dei fitoplasmi della vite, nonché l'acquisizione di nuove conoscenze sulla diffusione e biologia dei vettori già noti.

MATERIALI E METODI

Monitoraggio degli insetti

Il monitoraggio degli insetti è stato condotto in 30 vigneti della provincia di Treviso.

La ricerca di vettori potenziali di FD e LN è stata condotta con l'ausilio del retino entomologico nelle estati dal 2002 al 2007 in vigneti infetti. La presenza di *S. titanus* è stata monitorata nel 2008 tramite trappole gialle con colla posizionate sulla chioma sia di portinnesti selvatici, che crescevano in vicinanza di vigneti coltivati e normalmente trattati con insetticidi, sia sulle viti degli stessi vigneti. La presenza degli adulti di *H. obsoletus* è stata monitorata dal 2006 al 2008 tramite trappole gialle con colla posizionate sulle piante spontanee di interesse, cioè *Convolvulus arvensis* (convulvolo), *Urtica dioica* (ortica) e *Lamium orvala* ("falsa ortica"), sia all'interno dei vigneti che ai loro bordi. Le forme larvali dell'insetto sono invece state osservate sulle radici durante i due inverni. Sono state impiegate complessivamente 829 trappole per la cattura dei due vettori, installate da maggio a settembre e sostituite ogni due settimane. Gli insetti catturati sia con il retino che con le trappole sono stati poi contati e determinati usando uno stereomicroscopio.

L'analisi statistica è stata eseguita con il test U di Mann-Whitney per distribuzione non parametrica dei dati.

Prove di trasmissione

Le prove di trasmissione del fitoplasma FD da clematide a vite tramite l'insetto *Dictyophara europaea* Linnaeus sono state condotte usando clematidi infette raccolte in campo e barbatelle sane, coltivate in condizioni controllate. *D. europaea* è stata allevata a partire dalle uova raccolte dalle femmine allevate in gabbie posizionate in ambiente esterno con varie specie vegetali. Gli adulti (un totale di 100 individui) sono stati collocati per 48 ore sulle clematidi infette per l'acquisizione del fitoplasma FD. Dopo 26 giorni gli esemplari sopravvissuti sono

stati spostati in gruppi di 6 su 6 barbatelle chiuse in 6 gabbiette. Le gabbiette sono state controllate ogni giorno e gli insetti morti sono stati raccolti ed immediatamente congelati.

Test molecolari

Il DNA è stato estratto da foglie di portinnesti e dagli insetti interi con il metodo del CTAB (Angelini *et al.*, 2001). I test molecolari per verificare la presenza dei fitoplasmi sono stati eseguiti tramite *real time* PCR con *primer* e sonde TaqMan specifici per FD e LN (Angelini *et al.*, 2007a).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Monitoraggio degli insetti

Fra il 2002 ed il 2007 sono stati raccolti con il retino 320 insetti, ninfe ed adulti, appartenenti a 13 diverse specie (tabella 1). Il test molecolare ha evidenziato che 16 insetti erano infetti da fitoplasmi, identificati solo in esemplari adulti; nessuna ninfa è risultata positiva al test molecolare. Per quanto riguarda i vettori già noti dei giallumi della vite, 3 individui di *H. obsoletus* su 10 sono risultati infetti dal fitoplasma associato a LN, mentre 6 individui di *S. titanus* su 78 erano infetti dal fitoplasma FD. Questo risultato è in accordo con i dati di letteratura. Inoltre è stata individuata un'altra specie di cicalina infetta da fitoplasmi, *D. europaea*. Su 184 individui raccolti, infatti, 7 sono risultati infetti da FD, cioè il 3,8%. Tutti gli esemplari di *D. europea* infetti sono stati raccolti da piante di clematide che crescevano in vigneto o in prossimità, mentre quelli raccolti su vite sono risultati negativi. La presenza del fitoplasma FD su questa specie erbacea era stata segnalata recentemente (Angelini *et al.*, 2005).

Tabella 1. Lista degli Emitteri raccolti con il retino entomologico nel periodo 2002-2007 e risultati del test molecolare per la presenza di fitoplasmi

Specie di insetto	N. esemplari raccolti	N. individui infetti	Fitoplasma presente
<i>Hyalesthes obsoletus</i>	10	3	LN
<i>Dictyophara europaea</i>	184	7	FD
<i>Philaenus spumarius</i>	1	0	-
<i>Empoasca vitis</i>	7	0	-
<i>Metcalfa pruinosa</i>	4	0	-
<i>Stictocephala bisonia</i>	1	0	-
<i>Zygina rhamni</i>	1	0	-
<i>Macrosteles sp.</i>	3	0	-
<i>Euscelis incisus</i>	8	0	-
<i>Euscelis variegatus</i>	4	0	-
<i>Psammotettix sp.</i>	17	0	-
<i>Scaphoideus titanus</i>	78	6	FD
<i>Specie non identificata (Psylloideae)</i>	2	0	-

Il monitoraggio specifico di *S. titanus* tramite trappole posizionate su portinnesti negli incolti e sui vigneti coltivati confinanti ha evidenziato che il vettore è presente in ambedue gli ecosistemi (tabella 2). L'andamento del volo evidenzia una diminuzione da luglio a settembre,

in accordo con dati di altri autori, che mostrano che il picco di volo è alla fine di luglio - inizio di agosto (Lessio e Alma, 2004). L'insetto è stato catturato in numero maggiore nei portinnesti che colonizzano gli incolti rispetto ai vigneti trattati, dove il numero di esemplari raccolto è stato molto esiguo, con una differenza significativa al test statistico ($p < 0,05$). Le medie del numero di individui catturati per trappola sono state di $8,9 \pm 14,1$ per i portinnesti e di $3,1 \pm 3,1$ per i vigneti coltivati in prossimità dei portinnesti. Ciò mette in evidenza che nei portinnesti incolti o abbandonati sono presenti popolazioni consistenti di *S. titanus*, che possono costituire un rischio per i vicini vigneti in produzione. In particolare, in una delle 4 località indagate si è osservato un aumento con il passare della stagione degli esemplari catturati nel vigneto, oltre ad una contemporanea diminuzione delle catture sui portinnesti. Si è quindi ipotizzato che sia avvenuta una migrazione del vettore dai portinnesti al vigneto coltivato, che però è stata rilevata solo dopo che i trattamenti insetticidi erano stati eseguiti. Questi risultati confermano altri dati di letteratura, che indicano la presenza di popolazioni consistenti del vettore in portinnesti presenti negli incolti e nei boschi nelle regioni italiane nord-occidentali (Lessio e Alma, 2006; Lessio *et al.*, 2007a) e la presenza sporadica su portinnesti selvatici in Friuli Venezia Giulia (Pavan *et al.*, 2004).

Tabella 2. Numero (media \pm deviazione standard) di esemplari adulti di *S. titanus* raccolti per trappola nei portinnesti e nei vigneti trattati vicini

	Area 1	Area 2	Area 3	Area 4
Portinnesti	1,1 \pm 0,7	6,4 \pm 5,2	6,3 \pm 4,4	19,8 \pm 20,5
Vigneto coltivato	1,4 \pm 0,7	3,8 \pm 2,3	2,8 \pm 2,3	5,4 \pm 4,5

Tabella 3. Numero (media \pm deviazione standard) di esemplari di *H. obsoletus* raccolti per trappola su convolvolo ed ortica all'interno e ai bordi del vigneto

Anno	convolvolo		ortica	
	Dentro il vigneto	Ai bordi del vigneto	Dentro il vigneto	Ai bordi del vigneto
2006	0,89 \pm 2,34	0,00	1,00 \pm 1,67	4,38 \pm 8,87
2007	0,69 \pm 1,53	0,14 \pm 0,54	1,93 \pm 3,34	0,97 \pm 2,82
2008	1,09 \pm 2,90	0,00	3,91 \pm 5,95	0,49 \pm 1,51

Il monitoraggio di *H. obsoletus* su alcune piante spontanee assai comuni in Veneto conferma la presenza dell'insetto su ortica e convolvolo, dove esso può completare il suo ciclo vitale. L'andamento del volo si caratterizza per due distinti andamenti, associati con la fenologia delle diverse piante ospiti: infatti il picco su convolvolo è stato osservato verso la fine di giugno, mentre quello su ortica circa un mese dopo. Questi risultati confermano altri dati di letteratura, tenendo comunque conto dell'influenza dell'anno e della latitudine (Maixner *et al.*, 2006; Lessio *et al.*, 2007b; Mori *et al.*, 2008). I risultati del monitoraggio con le trappole nei tre anni hanno mostrato che il numero medio di *H. obsoletus* presenti su piante di ortica e convolvolo all'interno dei vigneti ($2,82 \pm 4,81$ e $0,93 \pm 2,45$, rispettivamente) è significativamente maggiore ($p < 0,0001$) rispetto agli insetti catturati sulle stesse specie ai bordi dei vigneti ($1,02 \pm 3,42$ e $0,09 \pm 0,45$) (tabella 3). Ciò significa che i trattamenti insetticidi, necessari nei vigneti di queste aree per il controllo di *S. titanus*, non hanno alcun effetto su *H. obsoletus*, come sottolineato anche da altri autori (Cavallini *et al.*, 2003). Altri dati di letteratura riferiscono però anche di situazioni diverse, con popolazioni più abbondanti nelle piante spontanee all'esterno dai vigneti rispetto a quelle all'interno (Mori *et al.*, 2008).

Durante il 2006, una singola trappola posta su falsa ortica ha catturato più di 100 individui di *H. obsoletus*. In relazione al fatto che questa specie vegetale non era mai stata segnalata come pianta ospite dell'insetto, l'inverno seguente la pianta è stata raccolta per controllare se *H. obsoletus* fosse presente nelle radici; in effetti sono stati contati 15 esemplari di ninfe. Questi dati indicano perciò che *H. obsoletus* può compiere il suo intero ciclo vitale anche sulla falsa ortica, che si rivela una nuova pianta ospite del vettore. La falsa ortica non è mai stata segnalata come ospite di fitoplasmi associati a LN, per cui il significato di questo dato è per ora rilevante solo per l'ecologia del vettore, mentre non ci sono ancora dati su un suo possibile ruolo nell'epidemiologia di LN. Nelle prossime stagioni vegetative verranno raccolte altre piante di *L. orvala* per continuare le ricerche in questa direzione.

Prove di trasmissione

Le prove di trasmissione del fitoplasma FD con il potenziale vettore *D. europaea* si sono rivelate molto interessanti. Infatti 36 individui su 100, che erano ancora vivi dopo 28 giorni dall'acquisizione, sono stati spostati sulle barbatelle sane, dove sono sopravvissuti per un periodo variabile da 1 a 6 giorni. Il saggio molecolare eseguito a posteriori sugli insetti ha dimostrato che 5 di essi, pari ad una percentuale del 14%, erano infetti dal fitoplasma FD. Per quanto riguarda le barbatelle usate per la trasmissione, 3 di esse hanno mostrato sintomi di giallumi l'anno seguente e sono risultate positive al fitoplasma FD con il saggio molecolare. La cicalina *D. europaea* si è quindi dimostrata capace di trasmettere il fitoplasma FD da clematide a vite. Ciò può spiegare la presenza sporadica di FD su vite in zone dove il vettore *S. titanus* non è presente. Un lavoro precedente aveva dimostrato come *Clematis vitalba* sia una pianta molto comunemente infetta dal fitoplasma FD (Angelini *et al.*, 2007b); il fatto che *D. europaea* sia capace di trasmettere il fitoplasma FD da clematide a vite suggerisce l'eventualità di importanti implicazioni per le epidemie di FD. Dai dati ottenuti finora sembra comunque che le viti infette da FD in regioni dove *S. titanus* non è presente siano casi sporadici; ciò induce a pensare che la trasmissione da clematide a vite avvenga raramente in natura. Nelle regioni con ampia presenza e diffusione di FD, quindi, questa possibilità è insignificante dal punto di vista epidemiologico, in quanto il ruolo di *S. titanus* è preponderante. Al contrario, in aree geografiche dove FD non sia ancora stata riscontrata su vite ed in presenza di clematidi infette, una prima introduzione accidentale in vigneto ad opera di *D. europaea* potrebbe scatenare un'epidemia nel caso in cui *S. titanus* sia presente. Ciò potrebbe già essere accaduto per le epidemie di FD scoppiate in Veneto alla fine degli anni '90 e in Serbia nei primi anni del 2000 e potrebbe verificarsi in qualsiasi altro ambiente ancora indenne dalle epidemie di FD, purché siano presenti contemporaneamente il fitoplasma, le piante ospiti intermedie ed i vettori.

CONCLUSIONI

I dati raccolti mostrano che, nonostante le strategie di lotta ai giallumi della vite siano applicate in Veneto da oltre 10 anni ed abbiano portato a risultati soddisfacenti, vari vettori di queste malattie sono presenti nei vigneti. I rischi di contaminazione dei vigneti coltivati sono ancora rilevanti e quindi le azioni di contenimento delle epidemie vanno migliorate. In questo senso, ricerche sui vettori alternativi dei fitoplasmi della vite e sull'ecologia degli stessi vettori possono avere un ruolo fondamentale. L'abbondante presenza di *S. titanus* sui portinnesti selvatici ed abbandonati, l'alto numero di *H. obsoletus* presente nelle piante ospiti che crescono all'interno dei vigneti, la scoperta di un nuovo vettore di FD capace di trasmettere il fitoplasma da clematide a vite, insieme con l'alta incidenza di clematidi infette, pongono

infatti ulteriori problemi di contenimento delle epidemie, ma suggeriscono anche come indirizzare ed ottimizzare le strategie di lotta attualmente adottate.

Ringraziamenti

Parte di queste ricerche sono state svolte grazie ad un finanziamento del MiPAAF (progetto nazionale GIAVI). Parte degli esperimenti di entomologia è stata svolta in collaborazione con il gruppo dell'IPP (Istituto di Protezione delle Piante) di Zemun, Belgrado, Serbia.

LAVORI CITATI

- Alma A., Soldi G., Tedeschi R., Marzachi C., 2002. Role of *Hyalesthes obsoletus* Signoret in the transmission of grapevine *Bois noir* in Italy. *Petria*, 12, 411-412.
- Angelini E., Clair D., Borgo M., Bertaccini A., Boudon-Padieu E., 2001. *Flavescence dorée* in France and Italy - Occurrence of closely related phytoplasma isolates and their near relationships to Palatinate grapevine yellows and an alder phytoplasma. *Vitis*, 40, 79-86.
- Angelini E., Borgo M., Squizzato F., Filippin L., Lucchetta G., Forte V., Taglietti F., Vanin S., 2005. La flavescenza dorata su clematide. *Vignevini*, 6, 64-69.
- Angelini E., Bianchi G.L., Filippin L., Morassutti C., Borgo M., 2007a. A new TaqMan method for the identification of phytoplasmas associated with grapevine yellows by real-time PCR assay. *Journal of Microbiological Methods*, 68, 613-22.
- Angelini E., Filippin L., Forte V., Borgo M., 2007b. Molto diffuse le clematidi infette da flavescenza dorata. *L'Informatore Agrario*, 33, 52-55.
- Cavallini G., Castiglioni A., Bortolotti P., Mori N., Nicoli Aldini R., Botti S., Malossi A., Bertaccini A., 2003. Flavescenza dorata e legno nero in vigneti del Modenese. *L'Informatore Agrario*, 59, 69-71.
- Lessio F., Alma A., 2004. Seasonal and daily movement of *Scaphoideus titanus* Ball (Homoptera Cicadellidae). *Environmental Entomology*, 33, 1689-1694.
- Lessio F., Alma A., 2006. Influence of grapevine presence in different ecosystems on the density of *Scaphoideus titanus* Ball. *IOBC/WPRS Bulletin*, 29, 155-159.
- Lessio F., Tedeschi R., Alma A., 2007a. Presence of *Scaphoideus titanus* on American grapevine in woodlands, and infection with "flavescence dorée" phytoplasmas. *Bulletin of Insectology*, 60, 373-374.
- Lessio F., Tedeschi R., Alma A., 2007b. Population dynamics, host plants and infection rate with stolbur phytoplasma of *Hyalesthes obsoletus* Signoret in North-Western Italy. *Journal of Plant Pathology*, 89, 97-102.
- Maixner M., 1994. Transmission of German grapevine yellows (*Vergilbungskrankheit*) by the planthopper *Hyalesthes obsoletus* (Auchenorrhyncha: Cixiidae). *Vitis*, 33: 103-104.
- Maixner M., Langer M., Gerhard Y., 2006. Epidemiological characteristics of *Bois noir* type I. *Atti 15th ICVG Conference*, 86-87.
- Mori N., Pavan F., Bondavalli, R., Reggiani N., Paltrinieri S., Bertaccini A., 2008. Factors affecting the spread of *Bois noir* disease in north Italy vineyards. *Vitis*, 47, 65-72.
- Pavan F., Bellomo C., Vidoni F., et al., 2004. Efficacia della lotta insetticida contro *Scaphoideus titanus* Ball in Friuli Venezia Giulia. *Supplemento Notiziario ERSA*, 17 (5-6), 11-21.
- Schvester D., Carle P., Moutous G., 1961. Sur la transmission de la flavescence dorée des vignes par une cicadelle. *Comptes Rendus des Séances de l'Académie d'Agriculture de France*, 47, 1021-1024.
- Sforza R., Clair D., Daire X., Larrue J., Boudon-Padieu E., 1998. The role of *Hyalesthes obsoletus* (Hemiptera: Cixiidae) in the occurrence of *Bois noir* of grapevines in France. *Journal of Phytopathology*, 146, 549-556.