UNIVERSITÁ DEGLI STUDI DI

UDINE, PADOVA, VERONA E LIBERA UNIVERSITÀ DI BOLZANO

Corso di Laurea Magistrale Interateneo in
VITICOLTURA, ENOLOGIA E MERCATI VITIVINICOLI
Dipartimento di Scienze agroalimentari, ambientali ed animali

Tesi per il conseguimento della
Laurea Magistrale

(LM-69)

STUDIO DI EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE PER LA RICERCA DI OSPITI ALTERNATIVI DELLA FLAVESCENZA DORATA

Relatore:
Prof.ssa Marta Martini

Laureanda:
Federica Zannini

Correlatori:
Prof. Carlo Duso
Dr. Paolo Ermacora

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

1. INTRODUZIONE 4
1.1. FITOPLASMI: CARATTERISTICHE GENERALI E GENETICHE 4
1.2. TASSONOMIA 5
1.3. PATOGENICITA' E SINTOMATOLOGIA 9
1.4. TRASMISSIONE 11
2. I GIALLUMI DELLA VITE 13
2.1. SINTOMI ASSOCIATI AI GIALLUMI DELLA VITE 16
2.2. FLAVESCENZA DORATA 19
2.2.1. Epidemiologia della Flavescenza Dorata 21
2.2.2. Lotta alla Flavescenza Dorata e danni economici 22
2.3. PRINCIPALE INSETTO VETTORE DELLA FLAVESCENZA DORATA 25
2.3.1. Scaphoideus titanus 25
2.4 VETTORE SECONDARIO NELLA TRASMISSIONE DELLA FLAVESCENZA DORATA . 29
2.4.1 *Orientus ishidae* 29
3. SCOPO DELLA TESI 32
4. MATERIALI E METODI 35
4.1. RACCOLTA DEI MATERIALI 35
4.1.1. Raccolta dei materiali vegetali 35
4.1.2. Raccolta degli insetti vettori 35
4.2. ANALISI MOLECOLARI DEI CAMPIONI 36
4.2.1. Estrazione degli acidi nucleici 36
4.2.2. Real-time PCR con primers universali 38
4.2.3. Caratterizzazione dei ceppi di FD mediante analisi di nested-PCR/RFLP sul gene *map*.. 39
4.2.4. Preparazione dei campioni per il sequenziamento sul gene *map* 41
5. RISULTATI 43
5.1. CAMPIONI VEGETALI 43
5.1.1. Quantità e qualità degli acidi nucleici estratti 43
5.1.2. Real-time PCR con primers universali 43
5.2. CAMPIONI DI INSETTI 45
5.2.1. Quantità e qualità degli acidi nucleici estratti 45
5.2.2. Real-Time PCR con primers universali 45
5.3. CARATTERIZZAZIONE DEI CEPPI DI FD MEDIANTE ANALISI DI NESTED PCR/RFLP SUL GENE *map* 47
5.4. SEQUENZIAMENTO DEL GENE *map* 51
6. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI 53
7. BIBLIOGRAFIA 56

8. APPENDICE.....67

1. INTRODUZIONE

1.1. FITOPLASMI: CARATTERISTICHE GENERALI E GENETICHE

I fitoplasmi sono patogeni procariotici appartenenti alla classe dei *Mollicute*s (ordine *Acholeplasmatales*, famiglia *Acholeplasmataceae*), che colonizzano il tessuto floematico delle piante. Sono stati scoperti nel 1967 da ricercatori giapponesi (Doi *et* al., 1967) e sono stati denominati *mycoplasma-like organisms* (MLOs), a causa della loro somiglianza morfologica e ultrastrutturale con i micoplasmi, già noti come agenti eziologici di malattie dell'uomo e degli animali.

Questi patogeni sono filogeneticamente correlati ai batteri Gram-positivi, presentano un basso contenuto di G+C e utilizzano la tripletta UGA come codone di stop nella sintesi proteica. Sono quindi simili a microrganismi batterici di piccole dimensioni (variabili da 200 nm a 800 nm di diametro) privi di parete cellulare e circondati da una membrana. Presentano inoltre, una sensibilità all'antibiotico tetraciclina (Doi *et al*.,1967) ed un diametro medio compreso tra 200 e 800 µm. Di dimensioni ristrette è anche il genoma (dimensioni variabili tra 530 - 1350 kb, % G+C = 23- 29%), rappresentato da un cromosoma circolare di DNA a doppio filamento e da DNA extracromosomiale (piccoli plasmidi).

L'assenza di una parete cellulare rigida consente loro di essere altamente pleomorfi e di cambiare forma adattandosi all'ambiente, caratteristica probabilmente associata al fatto che, come gli altri *Mollicute*s, i fitoplasmi sono parassiti obbligati.

L'adattamento alla vita come parassita obbligato, è dimostrato anche dalla forte correlazione tessuto-specifica, dall'estrema difficoltà a coltivarli in vitro e dalla mancanza di diverse vie per la sintesi di composti ritenuti necessari per il metabolismo cellulare (Marcone *et al*., 1999; Oshima et al., 2004). I geni codificanti per l'ATP sintetasi risultano totalmente assenti in alcuni ceppi, che dipendono quindi dalla glicolisi per la produzione di energia. In particolare, in un ceppo di '*Ca*. P. asteris' molto virulento, è presente una duplicazione di una regione genomica contenente geni che codificano per cinque enzimi glicolitici, assente invece in ceppi meno aggressivi e in altri ceppi di giallumi dell'astro: tale duplicazione potrebbe quindi rappresentare un meccanismo di patogenicità (Oshima *et al.*, 2007). D'altra parte, i geni per la glicolisi risultano totalmente assenti nel genoma di '*Ca*. P. mali', che presenta invece un gene che codifica per 2-deidro-3-deossifosfogluconato aldolasi (via di Entner-Doudoroff), portando ad ipotizzare che in tali fitoplasmi la produzione di piruvato sia indipendente dalla glicolisi (Kube *et al*., 2012). I fitoplasmi hanno quindi conservato percorsi metabolici indipendenti, che gli permettono di sopravvivere come parassiti in ambienti diversi come il floema delle piante e l'emolinfa degli insetti.

1.2. TASSONOMIA

Il fatto di non riuscire a coltivare i fitoplasmi *in vitro*, unitamente all'assenza di caratteristiche morfologiche distintive da specie a specie, ha determinato per parecchi anni, notevoli difficoltà alla definizione di una loro tassonomia e dei rapporti filogenetici intercorrenti con microrganismi affini. Mancava cioè la possibilità di individuare caratteri morfologici, biochimici e fisiologici che, in passato, stavano alla base dei criteri di classificazione dei microrganismi. Inoltre, durante tutto il corso del 1900 molte malattie vegetali che si manifestavano con ingiallimenti, deformazioni e/o appassimenti, trasmesse per lo più da insetti, venivano imputate per lo più ai virus.

Solo con lo sviluppo delle tecniche di biologia molecolare, che hanno permesso lo studio approfondito del DNA di questi organismi, è risultata possibile la loro differenziazione dai micoplasmi. Grazie all'analisi delle sequenze del gene 16S rDNA e di altri geni altamente conservati, è stato possibile determinare che i fitoplasmi costituiscono un gruppo monofiletico all'interno della classe dei *Mollicutes*, posizione filogenetica che è stata rilevata attraverso le analisi delle sequenze codificanti per l'RNA ribosomiale 16S. (Namba *et al.*, 1993; Gundersen *et al.*, 1994; Seemüller *et al.*, 1998). All'interno della classe dei *Mollicutes*, sono inclusi batteri pleomorfi derivanti da un progenitore ancestrale batterico Gram positivo e Clostridio-simile, appartenente alla linea evolutiva dei Lattobacilli, che si suppone abbia perso, nel corso dell'evoluzione, la capacità di sintetizzare la parete cellulare per un fenomeno di degenerazione evolutiva (Weisburg *et al.*, 1989).

L'analisi filogenetica delle sequenze del gene 16S rDNA ha permesso di identificare circa 20 gruppi filogenetici principali all'interno del grande gruppo monofiletico dei fitoplasmi. Questa filogenesi ha costituito le basi per l'identificazione dei fitoplasmi, che si realizza con l'analisi dei polimorfismi della lunghezza dei frammenti di restrizione (*restriction fragment lenght polymorphism*, RFLP) sui prodotti del gene 16S rDNA. Con questa analisi è stato possibile differenziare velocemente i fitoplasmi, in funzione della similarità dei profili RFLP, in diversi gruppi, detti 16Sr e all'interno di ciascun gruppo in sottogruppi distinti (Lee *et al.*, 1998). Inizialmente i fitoplasmi sono stati classificati in 10 gruppi principali, denominati con il prefisso comune "16S" ed un numero romano progressivo (16SrI, 16SrII, ecc.), e in 15 sottogruppi a loro volta identificati, all'interno di ogni gruppo 16S, con lettere maiuscole (16SrI-A, 16SrI-B, ecc.) (Lee et al., 1998). Attualmente, anche attraverso le analisi RFLP virtuali, lo schema è arrivato ad includere 37 gruppi 16S (Wei e Zhao., 2022).

In aggiunta alla classificazione basata sul gene 16S rDNA, la differenziazione molecolare dei diversi ceppi di fitoplasma è basata anche sull'analisi di altri marcatori molecolari: la regione spaziatrice

compresa tra il 16S e il 23S rDNA, il gene *tuf* codificante per un fattore di allungamento, i geni *secA* e *secY* codificanti per subunità del sistema di traslocazione *Sec*, geni *rp* per le proteine ribosomiali, geni *amp* e *imp* e *groEL* codificanti per le proteine immunodominanti di membrana (Smart *et al.*, 1996; Schneider e Gibb., 1997; Martini *et al.*, 2002; Lee, *et al.*, 2006). La delineazione dei gruppi e sottogruppi di fitoplasmi con questi markers è in forte accordo con i risultati ottenuti dall'analisi del gene per il 16S rRNA.

Inoltre, nel 1994, era stata avanzata la proposta di attribuire ai fitoplasmi lo status di genere a sé stante (*Phytoplasma)* all'interno della classe dei *Mollicutes.* Più recentemente, dal momento che per i fitoplasmi non si possono utilizzare criteri tassonomici tradizionali per definire genere e specie (data la scarsità di dati di carattere fisiologico e fenotipico), è stato introdotto il concetto di '*Candidatus* Phytoplasma', ossia quello di una categoria tassonomica provvisoria assimilabile al genere (IRPCM, 2004).

Per circa 20 anni la descrizione di una specie di '*Ca*. Phytoplasma' è stata riferita ad una singola, unica sequenza per il 16S rDNA (>1200 bp) e un ceppo poteva essere riconosciuto come una nuova specie di tale taxon se la sequenza del suo gene 16S rDNA aveva una similarità ≤ al 97.5% con quella di una qualunque specie di '*Ca*. Phytoplasma' precedentemente descritta. Se due fitoplasmi condividevano più del 97.5% di similarità di sequenza del gene 16S rDNA, ma chiaramente rappresentavano popolazioni ecologicamente separate, potevano essere designate come specie separate di '*Ca*. Phytoplasma' se soddisfacevano i tre criteri seguenti (IRPCM, 2004):

- diversi insetti vettori;
- diverso range di piante ospiti;
- evidenze di diversità molecolare tra i due fitoplasmi.

Da poco meno di un anno le linee guida per la descrizione di una nuova specie di '*Candidatus* Phytoplasma' sono state revisionate e leggermente modificate (Bertaccini et al., 2022). Le linee guida aggiornate per delineare una nuova specie hanno esteso la lunghezza della sequenza del 16S rDNA all'intero gene o quasi e hanno aumentato la similarità di sequenza a 98,65%.

Attualmente sono state definite 49 specie di '*Ca*. Phytoplasma' (Tabella 1) (Bertaccini, 2022) di cui tre specie sono state solo proposte:

- '*Ca*. P. cocostanzaniae';
- '*Ca*. P. palmae';
- '*Ca*. P. vitis.

Tabella 1: Elenco delle specie di '*Candidatus* Phytoplasma' fino ad ora descritte e delle malattie ad esse associate.

'*Candidatus* Phytoplasma spp.'	**Sottogruppo ribosomiale 16S**	**Malattie associate**
N.a.	16SrI-A	North American grapevine yellows
'*Ca*. P. asteris'	16SrI-B	Aster yellows
N.a.	16SrI-C	Clover proliferation
'*Ca*. P. lycopersici'	16SrI-Y	"Brote grande" of tomato
'*Ca*. P. aurantifolia"	16SrII-B	Lime witches' broom
'*Ca*. P. australasia'	16SrII-D	Papaya mosaic
'*Ca*. P. pruni'	16SrIII-A	Peach X disease
N.a.	16SrIII-I	North American grapevine yellows
N.a.	16SrIII-J	Chayote witches' broom
'*Ca*. P. ulmi'	16SrV-A	Elm yellows
'*Ca*. P. ziziphi'	16SrV-B	Jujube witches' broom
N.a.	16SrV-C	Palatinate grapevine yellows and "Flavescence dorée" C
N.a.	16SrV-D	"Flavescence dorée" D
'*Ca*. P. rubi'	16SrV-E	Rubus stunt
'*Ca*. P. balanitae'	16SrV-F	Balanites witches' broom
'*Ca*. P. trifolii'	16SrVI-A	Clover proliferation
'*Ca*.P. sudamericanum'	16SrVI-I	Passionfruit disease
'*Ca*. P. fraxini'	16SrVII-A	Ash yellows
'*Ca*. P. luffae'	16SrVIII-A	Loofah witches' broom
'*Ca*. P. phoenicium'	16SrIX-B	Almond witches' broom
N.a.	16SrIX	n.a.
N.a.	16SrIX-C	Picris echioides yellows
'*Ca*. P. mali'	16SrX-A	Apple proliferation
'*Ca*. P. prunorum'	16SrX-B	European stone fruit yellows
'*Ca*. P. pyri'	16SrX-C	Pear decline
'*Ca*. P. spartii'	16SrX-D	Spartium witches' broom
'*Ca*. P. oryzae'	16SrXI-A	Rice yellows dwarf
'*Ca*. P. cirsii'	16SrXI-E	Cirsium malformation
'*Ca*. P. solani'	16SrXII-A	"Stolbur"
'*Ca*. P. australiense'	16SrXII-B	Australian grapevine yellows
'*Ca*. P. japonicum'	16SrXII-D	Japanese hydrangea phyllody
'*Ca*. P. fragariae'	16SrXII-E	Yellows diseased strawberry
'*Ca*. P. convolvuli'	16SrXII-H	Bindweed yellows
'*Ca*. P. hispanicum'	16SrXIII-A	Mexican periwinkle virescence
'*Ca*. P. meliae'	16SrXIII-G	Melia azedarach yellows

′*Ca*. P. cynodontis′	16SrXIV-A	Bermudagrass white leaf
′*Ca*. P. brasiliense′	16SrXV-A	Hibiscus witches’ broom
′*Ca*. P. graminis′	16SrXVI-A	Sugarcane yellow leaf syndrome
′*Ca*. P. caricae′	16SrXVII-A	Papaya bunchy top
′*Ca*. P. americanum′	16SrXVIII-A	American potato purple top wilt
′*Ca*. P. castaneae′	16SrXIX-A	Chestnut witches’ broom
′*Ca*. P. rhamni′	16SrXX-A	Rhamnus witches’ broom
′*Ca*. P. pini′	16SrXXI-A	Pinus phytoplasma
′*Ca*. P. palmicola′	16SrXXII-A	Mozambique coconut yellows
N.a.	16SrXXIII-A	Buckland Valley grapevine yellows
′*Ca*. P. omanense′	16SrXXIX-A	Cassia witches ‘ broom
′*Ca*. P. tamaricis′	16SrXXX-A	Salt cedar witches’ broom
′*Ca*. P. costaricanum′	16SrXXXI-A	Soybean stunt
′*Ca*. P. malaysianum′	16SrXXXII-A	Malaysian periwinkle virescence
′*Ca*. P. allocasuarinae′	16SrXXXIII-A	Allocasuarina phytoplasma

1.3. PATOGENICITA' E SINTOMATOLOGIA

Il genoma dei fitoplasmi è ricco di geni fondamentali per lo sviluppo dell'infezione, come i geni codificanti per sistemi di trasporto, grazie ai quali importano numerosi metaboliti dalle cellule ospiti, geni per sistemi di secrezione e per proteine effettrici come TENGU, SAP11, SAP54 e P38, che alterano il metabolismo o la risposta immunitaria della pianta ospite. Nell'interazione specifica con le cellule ospiti risultano coinvolti anche epitopi di superficie, unici per ciascuna specie di fitoplasma.

L'infezione da fitoplasmi provoca nella pianta lo sviluppo di sintomi che variano notevolmente in base ad una serie di fattori come la concentrazione e la localizzazione del fitoplasma nei tessuti, la stagionalità dell'infezione e infine le interazioni metaboliche che si verificano tra i fitoplasmi e le specie ospiti. Le cause induttive dello sviluppo dei sintomi che si verificano nella pianta infetta, sono rappresentate da:

- interferenza sul sistema ormonale che porta ad una serie di disturbi nell'equilibrio dei regolatori di crescita. Questo è essenzialmente il motivo per cui i fitoplasmi sono considerati "malattie auxoniche" in quanto causano drammatici cambiamenti nello sviluppo delle piante (Arashida et al., 2008), con conseguenti malformazioni dei vari organi della pianta;
- progressivo blocco parziale o totale del flusso del floema. La perturbazione del floema provoca l'accumulo di zuccheri nelle foglie impedendo il loro trasporto nelle parti più basse (Pagliari *et al.*, 2017);
- marcata riduzione dei composti di immagazzinamento essenziali negli organi 'sink' come le radici, dovuto ad un blocco parziale o totale del flusso floematico. Le radici di piante malate possono infatti mostrare un fenotipo distintivo rispetto alle radici di piante non infette (Guerriero *et al*., 2012). Durante le ultime fasi della malattia, i sintomi sembrano molto simili a quelli causati da una tipica malattia necrotica xilematica: avvizzimento progressivo diffuso, necrosi grave ed estesa, decadimento della pianta e morte dell'intera pianta.

I fitoplasmi sono associati, a livello mondiale a più di un migliaio di malattie sia di piante arboree che erbacee: vengono 'associati' a tali malattie, ma non classificati come agenti causali poiché, a causa della difficoltà nell'isolarli in coltura pura, non è mai stato possibile soddisfare completamente i postulati di Koch. Tuttavia, recentemente alcuni ricercatori hanno ottenuto dei risultati incoraggianti riguardanti la crescita dei fitoplasmi su substrati artificiali complessi, ma tali studi risultano ancora in una fase iniziale (Bertaccini *et al*., 2010, Contaldo *et* al., 2012, Contaldo *et al*., 2013, 2014).

Molte di queste malattie, specialmente quelle delle piante arboree, sono di grande importanza economica: gli scopazzi del melo, la flavescenza dorata e il legno nero della vite, la moria del pero,

il giallume europeo delle drupacee, il giallume letale della palma da cocco, gli scopazzi del mandorlo e della lima (Bellardi e Bertaccini, 2009).

La maggior parte delle piante ospiti dei fitoplasmi sono angiosperme, in cui viene indotta una ampia gamma di sintomi specifici e non specifici. Tra i sintomi specifici, i più importanti sono: virescenza (inverdimento dei petali), fillodia (sviluppo di foglie al posto delle strutture fiorali), sterilità dei fiori, proliferazione di gemme ascellari che danno luogo alla formazione di scopazzi, anormale allungamento o raccorciamento degli internodi ed eziolamento, generale arresto di crescita (Bertaccini, 2014), stipole ingrossate, schiusura anticipata delle gemme e imbrunimento del tessuto floematico. Sintomi meno specifici sono spesso più comuni nelle piante legnose ed includono ingiallimento o arrossamento delle foglie, accartocciamento e distorsione della lamina fogliare, malformazione dei frutti, ingrossamento delle nervature principali, necrosi, sviluppo ridotto degli organi o dell'intera pianta, deperimento. Alcuni fitoplasmi sono stati identificati anche in gimnosperme e precisamente in *Pinaceae* e *Cupressaceae* dove si moltiplicano causando sintomi di giallumi, crescita stentata e proliferazione dei germogli (Vannacci et al., 2021). Inoltre, in casi rari, possono anche essere presenti piante infette che nel corso della loro vita appaiono completamente asintomatiche, si possono inoltre avere fenomeni di remissione permanente o temporanea dei sintomi (Ripamonti *et al.*, 2020).

1.4. TRASMISSIONE

I fitoplasmi vivono all'interno delle cellule delle piante e degli insetti vettori e con un ciclo di vita unico, si replicano intracellularmente in entrambi (Hogenhout *et al.,* 2008). Attraverso l'attività di nutrizione degli insetti sulle piante infette, questi entrano all'interno dei vettori che sono rappresentati principalmente da insetti floemomizi appartenenti all'ordine dei *Hemiptera* (Omotteri), come *Cicadellidea* (cicadellidi), *Fulgoridea* (cixiidi) e *Psyllidae* (psillidi) (Weintraub *et al.,* 2006). L'acquisizione dei fitoplasmi dagli elementi cribrosi del floema delle piante avviene attraverso lo stiletto e comporta il passaggio attraverso l'intestino medio e l'ingresso nel sistema circolatorio dell'emolinfa. Affinché l'insetto vettore diventi infettivo, ossia in grado di trasmettere i fitoplasmi, gli stessi devono colonizzare le ghiandole salivari del vettore e moltiplicarvisi all'interno fino ad una concentrazione tale che l'alimentazione su una pianta sana comporti l'inoculo di una dose infettiva del fitoplasma (Webb *et al*., 1999). La colonizzazione dell'insetto da parte del fitoplasma, periodo nel quale l'insetto vettore è infetto ma non infettivo, può durare fino a 3 settimane. Questo periodo è noto come periodo di latenza (Webb *et al*., 1999; Carraro *et al.,* 2001) e può variare tra i vari sistemi vettore/fitoplasma.

Una volta infettati, gli insetti rimangono infettivi per il resto della loro vita, ma di solito non trasmettono i fitoplasmi per via transovarica (Tedeschi *et al.,* 2002). Tuttavia, sono state segnalate eccezioni: fitoplasmi sono stati trovati in uova, ninfe e adulti dopo che gli insetti di prima e seconda generazione sono stati allevati su piante prive di fitoplasma (Hanboonsong *et al*., 2002, Kawakita *et al.,* 2000). Oltre che dagli insetti vettori, i fitoplasmi possono essere diffusi anche attraverso l'uso di materiale di propagazione vegetativa infetto e da piante parassite. Molti fitoplasmi sono stati trasmessi per scopi sperimentali mediante l'impiego della cuscuta, che agisce da ponte tra piante naturalmente infette e piante sane come la pervinca (*Catharanthus roseus),* che è l'ospite sperimentale più usato ed in cui i fitoplasmi sono regolarmente mantenuti attraverso innesto periodico (Kuszala, 1996).I fitoplasmi, si localizzano e si moltiplicano nel tessuto floematico, con particolare preferenza per i tubi cribrosi dove, a causa dell'elevata concentrazione di carboidrati, trovano probabilmente le condizioni ideali di pressione osmotica (Belli, 2013). All'interno della pianta ospite, i fitoplasmi si muovono sistemicamente con il flusso floematico, anche se la sua diffusione all'interno della pianta non può essere spiegato esclusivamente dal flusso dei fotosintetati (Schaper *et al* 1984; Pagliari *et al*. 2017). Inoltre, studiando il loro genoma, si è visto che un movimento di tipo attivo da parte dei fitoplasmi all'interno della cellula ospite è assai casuale (Christensen *et al*., 2005) perché, non possiedono geni in grado di sintetizzare proteine atte al movimento, ma presentano diverse proteine sulla loro membrana plasmatica che sono utili per

l’interazione tra il fitoplasma e l’ospite. Nello specifico tra queste proteine di membrana ci sono delle “IMP protein” che sono in grado di interagire con l’actina delle piante; in particolare, l’actina si lega alle IMP protein presenti su un lato della cellula del fitoplasma, legame che gli permetterà lo spostamento. Questo tipo di interazione (actina-IMP protein) da un lato è utile solo al patogeno e provoca una destrutturazione (depolarizzazione o modifica della lunghezza dei filamenti di actina) dei filamenti di actina; dall’altro lato, questa interazione può generare un segnale che attiva i sistemi di difesa della pianta (Musetti *et al.,* 2019).

2. I GIALLUMI DELLA VITE

I giallumi della vite (Grapevine Yellows-GY) sono un gruppo di ampelopatie causate da fitoplasmi.

Il primo giallume della vite ad essere segnalato a livello internazionale fu la flavescenza dorata (FD), la quale tutt'oggi è ancora la forma di giallume più temuta per i danni che può provocare e per la rapidità con cui si diffonde.

Questa fitoplasmosi si manifestò negli anni '50 del secolo scorso nella Francia sud-occidentale, più precisamente in Guascogna, dove colpì soprattutto viti dell'ibrido "Baco 22 a", determinando deperimento vegetativo, vistosi ingiallimenti fogliari con riflessi metallici e danni alla produzione; da qui nasce il nome di "Flavescence dorée" datole da Caudwell (1957), che per primo la descrisse. Successivamente, venne dimostrato che l'agente causale di FD viene trasmesso dalla cicalina *Scaphoideus titanus* Ball (Hemiptera: Cicadellidae) (Schvester, 1961a).

In Italia, la prima presenza di un giallume della vite risale alla metà degli anni '60 in vigneti dell'Oltrepò pavese (Belli *et al*., 1973), seguita poi negli anni successivi da manifestazioni sporadiche in Valtidone (Piacenza) ed in varie province del Piemonte (Belli *et al*., 1978). Questi primi casi di giallume della vite, verificatisi in Italia fra la fine degli anni '60 e l'inizio degli anni '70, sono stati riferiti a FD, in quanto associati alla presenza di *S. titanus* (Osler *et al*., 1975). A partire dagli anni '80 le segnalazioni di giallumi della vite in Italia si susseguirono, andando ad interessare molte regioni vitivinicole.

Tuttavia, la mancanza di test diagnostici non permetteva negli anni '70 di discriminare i diversi fitoplasmi in quanto, indipendentemente dall'agente eziologico e dall'area geografica da cui derivano, tutti i giallumi della vite mostrano dei sintomi simili in *Vitis vinifera*.

Per questa ragione, l'identificazione precisa dei fitoplasmi nelle viti sintomatiche non è possibile attraverso la sola osservazione dei sintomi ma, deve essere effettuata attraverso dei metodi diagnostici in laboratorio.

In particolare, mediante metodi molecolari come il sequenziamento o l'analisi RFLP del gene 16S rRNA sono stati indentificati 24 diversi fitoplasmi della vite appartenenti a nove gruppi 16Sr, ovvero 16SrI, -II, -III, -V, -VII, -IX, -X, -XII e -XXIII e all'interno di questi gruppi sono stati distinti in ulteriori sottogruppi ribosomiali (Dermastia *et al*., 2017) (Tabella 2). Di tutte le fitoplasmosi quelle di maggiore interesse in Europa sono sicuramente la flavescenza dorata (FD), il cui fitoplasma associato appartiene al gruppo dell'*Elm yellows* (16SrV–C e 16SrV–D) e il legno nero (BN), il cui

fitoplasma associato appartiene al gruppo dello *Stolbur* (16SrXII–A). Entrambe inducono sintomi tra loro indistinguibili, ma si caratterizzano per un diverso comportamento epidemico:

- la Flavescenza Dorata viene trasmessa dalla cicalina *Scaphoideus titanus*, una specie strettamente ampelofaga che diffonde il fitoplasma da vite a vite con grande efficienza (Schvester, *et al*., 1961a);
- il Legno Nero viene trasmesso principalmente dalla cicalina *Hyalesthes obsoletus*, una specie polifaga su piante erbacee spontanee (ortica, convolvolo, e altre) che occasionalmente va sulla vite.

Queste diversità incidono sulla rapidità di diffusione delle due malattie; la Flavescenza Dorata ha una diffusione di tipo epidemico, e risulta inserita fra le malattie da quarantena sulla base delle norme previste dall'Unione Europea mentre il Legno Nero, non dà luogo ad epidemie ma piuttosto colpisce un numero limitato di viti nel vigneto con bassi incrementi di presenza della malattia in vigneto.

Tabella 2: Conoscenze attuali relative alla caratterizzazione molecolare, alla biologia, agli insetti vettori e alla distribuzione geografica dei fitoplasmi associati ai giallumi della vite (GY) (Dermastia *et al*., 2017).

Gruppo ribosomiale/ sottogruppo /ceppo	**Malattia**	**Fitoplasma associato**	**Insetti vettori conosciuti per la vite**	**Piante ospiti preferite del vettore**	**Piante ospiti alternative del phytoplasma**	**Diffusione**
16SrI-A	GY, NAGY	Aster yellows; Virginia grapevine yellows I (NAGYI)	ND	ND	*Vitis* spp.; altre piante ospiti erbacee/arboree	Canada,USA
16SrI-B	GY, aster yellows (South Africa)	Aster yellows	Europa: *Euscelidius variegatus; Euscelis incisus*	ND	*Vitis* spp.	Croazia,Italia, Slovenia
			Africa: *Mgenia fuscovaria*			Tunisia, Sud Africa
			Macrosteles quadripunculatus		Altre piante ospiti erbacee/arboree	Canada,Cile, Turchia
			Scaphoideustitanus			
			Africa: *Mgenia fuscovaria*			Tunisia, Sud Africa
16SrI-C	GY	Aster yellows	ND	ND	ND	Italia, Canada, Cile
16SrI-ceppi SoV, Char, FronN, PinN,SeyN	GY	Aster yellows	ND	ND		Canada
16SrII-D	AGY	'*Ca*. P. australasiae' - related strains, TBB	ND	ND	Ospiti vari	Australia
16SrIII	GY	ND	ND	ND	ND	Italia
						Croazia
						Israele
16SrIII-I	NAGY	'*Ca*. P. pruni' - related strains Grapevine yellows III (NAGYIII)	ND	ND	*Vitis* spp.	USA
16SrIII-A					*Prunus* spp.	Canada
16SrIIIα						
16SrIIIβ						

16SrIII-J	GY	Chayote witches' broom	*Paratanusexitiosus*		Canna da zucchero, Peonia	Cile
16SrV-A	GY	'*Ca*. P. ulmi' - related strains	ND	ND	*Ulmus* spp.	Italia Cile
16SrV-C	'Flavescence dorée"	"Flavescence dorée" (FD)	*Scaphoideustitanus*	*Vitis* spp.	*Clematis vitalba, Ailanthus altissima, Alnus glutinosa* *Alnus incana*	Austria, Croazia, Francia, Ungheria,Italia, Romania, Spagna, Serbia, Slovenia, Svizzera
16SrV-D	'Flavescence doréè"	"Flavescence dorée" (FD)	*Scaphoideustitanus*	*Vitis* spp.	ND	
16SrV-C	PalatinateGY	Palatinate GY	*Oncopsis alni*	*Alnus glutinosa*	*Alnus glutinosa*	Germania
16SrVII-A	GY	'*Ca*. P. fraxini'	ND	ND	*Galega officinalis*	Cile
16SrIX	GY	*Vitis vinifera* phytoplasma	ND	ND	ND	Turchia
16SrIX-C	GY	"Shiraz" GY	ND	ND	ND	Iran
16SrX-B	GY	European stone fruit yellows (EFSY)	*Cacopsylla pruni*	ND	Pesco e altre drupacee	Italia, Serbia, Ungheria
16SrXII-A	"Bois noir", "Legno nero", "Vergilbungs krankheit", Schwarzholz krankheit"	"Stolbur" (STOL, '*Ca*. P. solani')	*Hyalesthes obsoletus* *Reptalus panzeri*	*Hyalesthes obsoletus*: *Convolvulus arvensis, Urtica dioica, Ranunculus* spp., *Solanum* spp., *Lavandula* spp.	*Convolvulus arvensis, Urtica dioica, Ranunculus* spp., *Solanum* spp., *Lavandula* spp.	Europa, Cile, Iran,Israele, Libano Turchia
16SrXII-B	AGY	'*Ca*. P. australiense'	ND	ND	*Maireana brevifolia*	Australia
16SrXXIII	Buckland Valley GY	Buckland Valley GY(BVGY)	ND	ND	ND	Australia

2.1. SINTOMI ASSOCIATI AI GIALLUMI DELLA VITE

La presenza di FD o per meglio dire dei giallumi in generale risulta normalmente di facile individuazione grazie alla peculiarità dei sintomi, che si contraddistinguono chiaramente da quelli causati da altre avversità di tipo biotico e abiotico.

Le cause che portano alla comparsa dei sintomi sono da attribuire alle risposte fisiologiche allorché la pianta viene colonizzata da fitoplasmi. Questi ostruiscono le cellule floematiche (foglie, tralci, fusto e radici) provocando un rallentamento della circolazione della linfa elaborata (Osler., 1996).

Questa alterazione a livello floematico causa un accumulo di fotosintetati a livello fogliare, impedendo la loro traslocazione agli altri organi della pianta. Di norma i sintomi si osservano su nesto (cultivar di vite europea), mentre il portinnesto (ibridi di viti americane) rimane asintomatico (Constable, 2009). La moltiplicazione e la diffusione dei fitoplasmi nelle piante legnose, ed in particolare nella vite, avvengono piuttosto lentamente.

Sulle viti di cultivar particolarmente sensibili, i primi sintomi di Flavescenza dorata possono già comparire nel corso del mese di maggio, quando si possono manifestare necrosi e disseccamenti a carico degli apici vegetativi e dei grappolini appena formati. Talvolta già prima vi possono essere ritardi o irregolarità nel germogliamento. Tuttavia, le alterazioni più caratteristiche cominciano solitamente a comparire verso la metà di luglio, quando iniziano ad evidenziarsi i tipici sintomi fogliari, che consistono in un ripiegamento o arrotolamento della lamina verso la pagina inferiore, con graduale comparsa di ingiallimenti (nelle cultivar ad uva bianca) o arrossamenti (nelle cultivar ad uva nera) che interessano l'intera foglia o settori di essa, incluse comunque le nervature (Figura 1). I suddetti sintomi a carico delle foglie divengono via via più intensi col progredire della stagione, fino a risultare particolarmente marcati verso a fine estate. Parallelamente si evidenziano altri due sintomi piuttosto caratteristici della flavescenza dorata: il disseccamento dei grappoli (Figura 2) e la parziale o mancata lignificazione dei tralci (Figura 3), che rimangono verdi, di consistenza erbacea, che spesso si ripiegano verso il basso, conferendo alla pianta un aspetto prostrato. Questi stessi tralci, essendo sensibili al gelo, durante l'inverno necrotizzano e assumono una colorazione nerastra.

I sintomi sopra descritti compaiono solitamente nell'anno successivo a quello in cui si è verificata l'infezione; salvo casi di infezione precoce (avvenuta in giugno) cui può seguire la manifestazione dei sintomi entro l'autunno del medesimo anno. Inoltre, la sintomatologia descritta può comparire sull'intera pianta, ma molto spesso si manifesta soltanto su alcuni tralci, mentre i rimanenti hanno

un aspetto normale: vi è quindi la possibilità di risanare le piante eliminando tempestivamente il tralcio alla base o i pochi tralci con sintomi.

Le piante malate, alla ripresa vegetativa presentano spesso ritardi o irregolarità nel germogliamento e nelle forme più gravi, soprattutto a seguito di ripetute infezioni, vi può essere deperimento e morte della pianta (Belli *et al*., 2013).

Un aspetto peculiare e ancora poco compreso di molte malattie da fitoplasmi e dei giallumi della vite in particolare è il processo di guarigione e remissione spontanea dei sintomi noto come "recovery", tale per cui in un nuovo anno vegetativo le piante infette diventano asintomatiche e negative ai test diagnostici. Tuttavia, le basi biologiche di questo processo sono ancora in gran parte inesplorate, che come riportato dallo studio di Pagliarani *et al*., 2020, sembra si debbano ricercare tra i meccanismi epigenetici della pianta e dipendenti dalla suscettibilità delle cultivar.

Figura 1: Tipici sintomi fogliari di giallumi su vite di uva a bacca bianca e rossa

Figura 2: Disseccamento dei grappoli in differenti varietà: A: Chardonnay, B-C: Pinot Bianco, D: Dolcetto

Figura 3: Parziale o mancata lignificazione dei tralci

2.2. FLAVESCENZA DORATA

La Flavescenza Dorata o flavescence dorée (FD) è una malattia della vite che fa parte dei cosiddetti "giallumi" della vite (GY= grapevine yellows), ossia del gruppo delle ampelopatie causate da fitoplasmi.

L'agente causale della Flavescenza Dorata è un fitoplasma (Caudwell *et al*., 1971) appartenente al gruppo 16SrV (Bertaccini *et al*., 1997; Martini *et al*., 1999) per il quale è stato proposto il nome '*Candidatus* Phytoplasma vitis' ('*Ca*. P. vitis'); sebbene altri fitoplasmi di questo gruppo strettamente correlati geneticamente, occupino nicchie ecologiche diverse (Bertaccini *et al*., 2014).

Basandosi su analisi della sequenza nucleotidica del gene 16S rRNA e dello spazio intergenico tra i geni 16S rRNA e 23S rRNA, i fitoplasmi associati a FD sono stati classificati in due sottogruppi appartenenti al gruppo ribosomiale 16SrV (o del Giallume dell'olmo =*Elm Yellows*): 16SrV-C e 16SrV-D (rispettivamente FD-C e FD-D) (Martini *et al*.,1999; Angelini *et al*., 2001; Davis e Dally.,2001).

La discriminazione dei fitoplasmi all'interno dei gruppi 16SrV-C e 16SrV-D può essere fatta attraverso l'analisi MLST (Multi-locus Sequence Typing) usando i geni *rp*, *secY*, *map* e *uvrB-degV*, in quanto la sola variabilità del gene 16S rRNA è insufficiente per far emergere le differenze sussistenti tra i diversi fitoplasmi associati ad FD (Martini *et al*., 2002; Navrátil *et al*., 2009; Malembic-Maher *et al*., 2011). L'analisi molecolare e filogenetica sul gene *map*, ha portato alla divisione dei ceppi classificati come 16SrV-C e 16SrV-D in tre cluster genetici distinti, designati come: *map*-FD1 (16SrV-C) caratterizzato da una elevata variabilità genetica, *map*-FD2 (16SrV-D) caratterizzato da una bassa variabilità genetica e *map*-FD3 (16SrV-C) con una bassa variabilità genetica (Arnaud *et al*., 2007). All'interno di questi tre cluster genetici, sono stati identificati 16 genotipi associati alla vite (Malembic-Maher *et al*., 2020) che differiscono per diffusione geografica e caratteristiche epidemiologiche.

Il genotipo più abbondante, appartenente al cluster *map*-FD2, è M54 e corrisponde ai ceppi FD92 e FD-D rilevati in Italia ed in Francia (Arnaud *et al*., 2007a). Questo genotipo è presente in tutte le regioni della Francia e dell'Italia affette da FD, ma non in Serbia e presenta una certa variabilità genetica. Dalla presenza di 2 polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) del genotipo M54, è stato determinato il genotipo M38, ritrovato nella regione francese Aquitania, in Toscana e nelle Alpi del Rodano dove è stato identificato anche il genotipo M121, derivante invece, da 3 polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) del genotipo M54.

Il genotipo M50 appartenente al cluster *map*-FD1, corrispondente al ceppo di riferimento francese FD70 (Arnaud *et al.*, 2007a) e FD-CAM05 (Papura *et al.*, 2009), è invece molto abbondante nel Sud-Ovest della Francia (per il 36% dei casi di FD). Anche questo genotipo presenta una certa variabilità genetica: varianti di M50 per 1 o 2 polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs), denominati M27, M34 ed M112, sono stati identificati in qualche caso isolato nelle regioni francesi dell'Aquitania, del Midi- Pirenei e nelle Alpi del Rodano.

I genotipi più abbondanti del cluster *map*-FD3, M3 (corrispondente al ceppo FD-C originario del Nord-Est Italia) (Angelini *et al.*, 2001; Martini *et al.*, 2002) e M51, sono invece ampiamente presenti in Italia ed in Serbia. In aggiunta, i ceppi isolati da Arnaud *et al*, nello specifico VI04-248-04 dal Piemonte e VI04- TOSCANA1 dalla Toscana, sono stati classificati rispettivamente come genotipi M12 ed M6 e sono stati identificati solo in Italia (Malembic-Maher *et al.*, 2020).

I cluster FD2 e FD3 sono stati rilevati anche in Slovenia e in Croazia, con una prevalenza di FD3 (Mehle *et al.*, 2010), mentre in Spagna, Portogallo e Svizzera solo il cluster FD2 (Foissac *et al*., 2013).

Non è nota alcuna resistenza genetica della vite alla FD in quanto tutte le cultivar di vite sono suscettibili all'infezione, anche se in misura diversa (Eveillard *et al*., 2016); infatti cvv. come Barbera, Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon, Chardonnay, Pinot nero, Pinot grigio, Glera, Riesling, Sangiovese, Garganega e Refosco d'Istria sono più suscettibili e sensibili di cvv. come Nebbiolo, Merlot, Sauvignon Blanc e Syrah (Prezelj *et al*.,2013; F. Pavan *et al*., 1997).

2.2.1. Epidemiologia della Flavescenza Dorata

Il vettore principale di trasmissione della Flavescenza Dorata è lo *S. titanus*, il quale è stato introdotto in Europa dal Nord America nel 1958 (Chuche *et al*., 2014). È una specie monofaga , che si nutre e si riproduce su *Vitis* spp., incluse *V. vinifera* (vite Europea) e le specie selvatiche di origine Americane (*V. armurensis, V. champinii, V. doaniana, V. lambrusca, V. longii, V. pentagona, V. riparia, V. rubra, V. 22 rupestris, V. simpsonii, V. sylvestris*) e loro ibridi interspecifici usati come portinnesti nella produzione del materiale di propagazione (Bertaccini *et al*., 2019). Tali ibridi sono spesso presenti negli ambienti circostanti i vigneti come viti inselvatichite. Queste viti sono normalmente asintomatiche ma possono essere infette e ospitare elevate popolazioni di *S. titanus* (Lessio *et al*., 2007). Le viti americane e i portinnesti, benché poco sensibili alla malattia, presentano un'elevata concentrazione del fitoplasma nei tessuti floematici e quindi vanno considerati come una pericolosa sorgente d'inoculo (Eveillard *et al*., 2016). La distribuzione spaziale delle viti con sintomi all'interno del vigneto è casuale quando la sorgente d'inoculo è interna al vigneto, mentre risulta aggregata quando le sorgenti sono esterne (Pavan *et al*., 2012). In quest'ultimo caso si osserva un gradiente decrescente di FD dal bordo verso l'interno del vigneto in associazione alle potenziali sorgenti esterne di *S. titanus* infettivi (Lessio *et al*., 2015).

I fitoplasmi associati a FD (16SrV-C e 16SrV-D), sono stati trovati in diversi serbatoi vegetali naturali. In piante di ontano (*Alnus glutinosa* e *Alnus incana*) di molti paesi Europei, inclusa la Serbia, sono stati ripetutamente trovati genotipi strettamente correlati a quelli di FD, appartenenti in particolare ai cluster *map*-FD2 e *map*-FD1. Inoltre, tali specie sono state confermate come piante serbatoio asintomatiche (Arnaud *et al*., 2007a). Nel Nord Italia, Slovenia, Ungheria, Svizzera ed Austria (Oliver Krsti´c *et al*., 2022), l'arbusto rampicante clematide (*Clematis vitalba*) costituisce un serbatoio naturale di ceppi del cluster *map*-FD3 (Filippin *et al*., 2009b). Insieme agli ontani e alla clematide, che sono stati abbastanza ben documentati come sorgenti naturali di FD, a livello europeo i fitoplasmi appartenenti al sottogruppo 16SrV-C sono stati ritrovati in altre piante spontanee legnose e arbustive come *Sambucus nigra* L., *Cornus sanguinea* L., *Prunus spinosa* L., *Ulmus minor* (Mill.), *Ulmus* spp., *Corylus avellana* L. e *Salix* spp. (Casati *et al*., 2017).

Un ruolo nella diffusione di FD, oltre che a *S. titanus*, è stato attribuito anche ad altre cicaline floemomize come: *Dictyophara europaea* (Filippin *et al*., 2009c), *Orientus ishidae* (Lessio *et al*., 2017), *Allygus modestus* e *Allygus mixtus* (Malembic-Maher *et al*., 2020) che dagli ospiti vegetali secondari serbatoi di fitoplasma, vanno ad infettare la vite.

In particolare, *Dictyophara europaea,* è capace di trasmettere fitoplasmi del cluster *map*-FD3 dalla clematide alla vite, *Orientus ishidae* è stato trovato infetto da fitoplasmi di tutti e tre i cluster genetici correlati ad FD, provenienti dal nocciolo (*Corylus avellana*) e dal salice (*Salix* spp) infettato solo da *map*-FD1, mentre *Allygus modestus* e *Allygus mixtus,* sono capaci di trasmettere i genotipi *map*-FD2 e *map*-FD1 provenienti da ontani (Oliver Krsti´c *et al*., 2022).

Un'altra tipologia di trasmissione dell'agente eziologico è quella per innesto che tuttavia, sulla base dei dati sperimentali finora disponibili, risulta avvenire in percentuali piuttosto basse (per lo più inferiori al 10 %) e con grande variabilità tra le diverse cultivar. Questa modalità di trasmissione quindi ha una scarsa importanza ai fini epidemiologici, quantomeno nelle zone dove malattia e vettore sono già presenti (Belli, 2013).

2.2.2. Lotta alla Flavescenza Dorata e danni economici

La lotta alla FD, collocata nella lista A2 della EPPO, è regolata per la legge in base a norme di quarantena. In Italia è stato emanato un decreto ministeriale (31 maggio 2000) di lotta obbligatoria alla malattia e al suo vettore volto all'eradicazione della fitopatia nelle aree di nuovo insediamento e al suo contenimento nelle aree dove ormai è già stabilità da tempo. Secondo tale decreto, il Servizio Fitosanitario Regionale- SFR, è incaricato a monitorare la presenza della malattia e del suo vettore nelle aree vitate eD a diffondere informazioni sulla fitoplasmosi.

Il decreto prevede altresì la distinzione in tre zone:

1. La zona focolaio corrisponde ad un'area dove la presenza della malattia è stata accertata e la sua eradicazione è ritenuta possibile. In tale zona si procede all'estirpazione delle piante con sintomi della malattia, anche senza la necessità di saggi di laboratorio di conferma e all'esecuzione di due trattamenti all'anno con insetticidi: un primo trattamento, rivolto contro le forme giovanili, dev'essere effettuato circa un mese dopo la schiusura delle prime uova e quindi intorno alla metà di giugno. Il secondo trattamento invece, mirato contro le forme adulte, va eseguito circa 20 giorni dopo il primo (prima metà di luglio). Un terzo intervento insetticida, indirizzato agli eventuali adulti re-immigranti, viene previsto nei casi in cui l'assenza del vettore risulti ancora più importante, come ad esempio nel vivaismo viticolo;

2. La zona di insediamento comprende aree dove la presenza della FD e quella di *S. titanus* sono state accertate e la diffusione della malattia è talmente ampia da non permettere l'eradicazione (in tale zona ciascun SFR di competenza decide la misura di lotta);
3. La zona indenne comprende aree dove la malattia non è presente.

I SFR devono inoltre prestare attenzione all'attività vivaistica che deve garantire l'assenza del vettore nei vigneti di piante madri per marze e portainnesti e nei barbatellai mediante specifici trattamenti insetticidi che possono variare da Regione a Regione, da zona a zona, secondo le indicazioni dei SFR: 1-2 trattamenti nei vigneti di piante madri e 2 e 4 nei barbatellai. I SFR a loro volta effettuano annualmente monitoraggi sistemici nei vivai al fine di accertare la presenza di FD, è obbligatorio procedere all'eliminazione delle piante infette e viene sospeso il prelievo di materiale di propagazione fino a quando i controlli in campo disposti dal SFR ne abbiano accertato l'assenza per due anni consecutivi. Con specifiche misure di protezione, vi è in alcune Regioni l'obbligo di estirpazione dei vigneti abbandonati o delle viti inselvatichite nelle zone indenni dove è presente il vettore (Matta *et al*., 2017).

In assenza di adeguate misure di lotta, sono possibili degli scoppi epidemici. Per evitarli, gli interventi di lotta devono andare a interrompere il ciclo epidemiologico della malattia controllando le popolazioni del vettore all'interno dei vigneti (trattamenti insetticidi) ed eliminando le sorgenti d'inoculo, sia interne ai vigneti, che esterne agli stessi. Se le viti sorgenti d'inoculo si trovano all'interno dei vigneti, il controllo della malattia è relativamente semplice in quanto è sufficiente tenere le popolazioni del vettore a basse densità di popolazione attraverso adeguate strategie di controllo, lotta insetticida in particolare (Pavan *et al*., 2012). Il contenimento della malattia risulta più complesso quando i vettori infetti arrivano da piante sorgenti del fitoplasma presenti attorno ai vigneti (Pavan *et al*.,2012b; Lessio *et al*., 2015)

Il danno economico, nelle cultivar più sensibili, può essere rilevante in quanto si ha la perdita totale o parziale o di gran pare della produzione. Nell'ultima decade del secolo scorso, quando si verificarono le gravi epidemie in Veneto, Piemonte e Lombardia, in molti vigneti l'incidenza della malattia raggiunse punte dell'70-80%, determinando perdite nella produzione totale, superiori al 50 %, percentuale inferiore a quella dell'incidenza in quanto la malattia, in molti casi, non interessa l'intera pianta (Belli.,2013). Nell'annata di comparsa dei sintomi i danni sono parziali e legati all'appassimento delle infiorescenze, all'aborto fiorale, al disseccamento dei raspi e all'avvizzimento degli acini. I grappoli che arrivano integri alla vendemmia presentano un minor contenuto zuccherino, e sono di minore qualità per la vinificazione (Borgo., 1988). Nelle annate

successive, a causa della ridotta lignificazione dei tralci si assiste a danni da freddo sugli stessi con conseguente perdita di gemme e quindi presenza di un minor numero di grappoli. In alcuni casi le viti possono anche morire (Pavan *et al*., 2012). L'estirpo delle piante morte o fortemente colpite e il conseguente reimpianto al fine di colmare le fallanze, si traduce in un aumento dei costi di gestione del vigneto e diminuzione delle produzioni durante la fase di allevamento delle viti (Pavan *et al*., 2012). Qualora l'attuazione del decreto di lotta obbligatoria lasci la possibilità di non estirpare le piante sintomatiche e vista la possibilità che le viti sintomatiche possano risanare, la convenienza ad estirparle deve tener conto delle perdite di produzione che comporta il reimpianto, confrontate con quelle dovute alla minor produzione della pianta sintomatica prima che risani o che invece rimanifesti sintomi o addirittura muoia. La convenienza all'estirpo preventivo sarà tanto maggiore quanto più tardivo è il risanamento e quanto maggiore è la probabilità che le viti muoiano.

Quindi, i costi della flavescenza dorata per i coltivatori includono: perdite di resa, strategie di controllo dei vettori, rimozione di viti sintomatiche e bassa produttività delle piante sostitutive (Chuche *et al.*, 2014).

2.3. PRINCIPALE INSETTO VETTORE DELLA FLAVESCENZA DORATA

2.3.1. Scaphoideus titanus

2.3.1.1. Ciclo biologico

Scaphoideus titanus Ball, 1932 è un emittero appartenente alla famiglia Cicadellidae e alla sottofamiglia Deltocephalinae. È una specie monovoltina cioè, completa una sola generazione all'anno.

Sverna come uovo che vengono deposte a fine estate, da agosto a settembre, individualmente o in gruppo (Bagnoli *et al.*,2011) all'interno della corteccia dei tralci di due anni preferibilmente, ma possono essere deposte anche su legno più vecchio o su legno di un anno (Vidano.,1964). La fecondità delle femmine è stimata in media di 10-15 uova, ma può arrivare fino a 20 uova (Eriksson *et al*.,2012). Le uova passano l'inverno in una fase di diapausa di 6-8 mesi (Figura 4) la quale non richiede l'esposizione al freddo per essere interrotta (Chuche e Thiéry., 2014). La schiusura sembra variare molto a seconda della latitudine, dell'altitudine e dell'annata del vigneto e generalmente inizia nella seconda decade di maggio e si prolunga fino alla prima decade di luglio. Si osserva un certo anticipo nella schiusura delle uova che danno origine a maschi, tuttavia il fenomeno risulta particolarmente mitigato nelle annate caratterizzate da inverni miti (Chuche e Thiery.,2012).

Lo sviluppo da uovo ad adulto passa attraverso 5 età giovanili (2 stadi di neanidi e 3 di ninfa) (Figura 5), che portano alla comparsa dei primi adulti tra la fine di giugno e la metà di luglio, con differenze anche marcate a seconda delle aree viticole e delle annate: 7-8 settimane per la comparsa degli adulti in Francia (Boudon-Padieu.,2000) mentre questo periodo è più breve, 5-7 settimane, in Spagna (Rahola *et al*., 1997) e in Italia (Vidano.,1964). Il passaggio da uno stadio all'altro è caratterizzato da una muta, i resti del vecchio tegumento (esuvie) (Figura 6) che rimangono visibili sulle foglie. I primi adulti di solito compaiono tra la fine di giugno e l'inizio di luglio, la loro vita è di circa 1 mese, con le femmine che iniziano a deporre le uova circa 10 giorni dopo l'emergenza (Schvester *et al.*,1962). Nonostante *S. titanus* sia una specie univoltina, nel 1987 è stato osservato il primo stadio ninfale nel sud della Francia all'inizio di agosto, circa 3 settimane dopo l'ultima osservazione a metà luglio di ninfe appena nate. Questo suggerisce in modo interessante che *S. titanus* potrebbe in particolari condizioni produrre una seconda generazione, con le femmine della prima generazione che producono uova che non vanno in diapausa. (Bernard e Du Fretay, 1988).

S. titanus è crepuscolare e notturno e la sua attività di volo è massima tra il tardo pomeriggio e la mattina presto ed aumenta con le temperature giornaliere minime fino ad un massimo intorno a 22

C°. Inoltre, nonostante l'attività di volo di *S. titanus* dipende principalmente dal fotoperiodo, l'umidità relativa è correlata negativamente al volo (Lessio and Alma, 2004). Il movimento di *S. titanus*, all'interno del vigneto dipende inoltre dalla densità della vite così come dell'architettura della chioma. Questa doppia dipendenza di *S. titanus* è probabilmente dovuta dal fatto che il suo movimento all'interno del vigneto è confinato nella chioma dove si muove lungo il filare piuttosto che trasversalmente (Lessio e Alma, 2009).

Il monitoraggio degli adulti può essere effettuato con trappole cromotropiche gialle invischiate oppure mediante l'ausilio di uno strumento scuotitore-raccoglitore (frappage). Con le trappole cromotropiche il picco di catture si osserva alla fine di luglio-inizio agosto (Lessio e Alma., 2004). All'inizio con le trappole cromotropiche si catturano solo individui di sesso maschile, con un picco delle catture a metà agosto; mentre alla fine si catturano solo femmine, con un picco delle catture per gli individui di sesso femminile a metà agosto. Con il frappage il picco di catture di maschi si verifica a metà luglio, mentre per le femmine a metà agosto (Riolo *et al*.,2014).

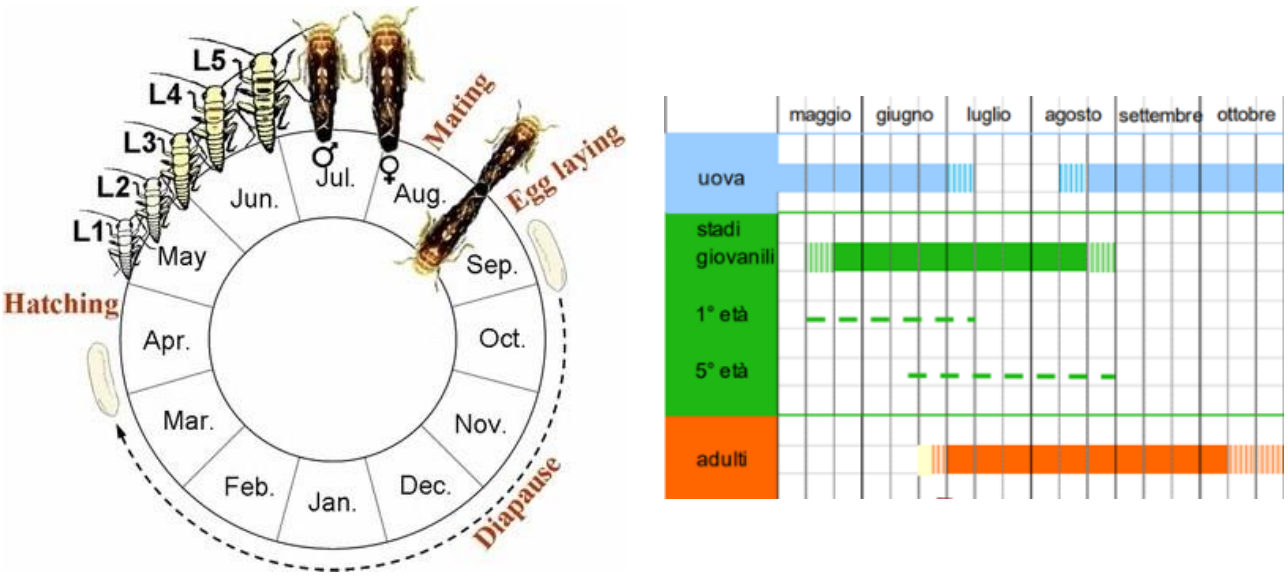

Figura 4: Ciclo di vita dello *Scaphoideus titanus.* Le date sono indicative e variano a seconda dell'anno e della località. Fonte: Biology and ecology of the Flavescence dorée vector *Scaphoideus titanus*: a review Julien Chuche & Denis Thiéry.

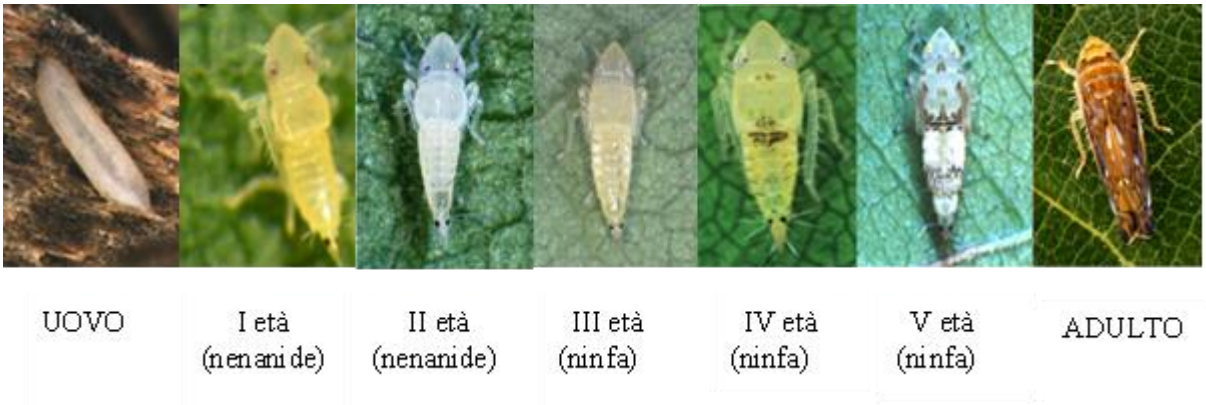

Figura 5: Da uovo ad adulto di *Scaphoideus titanus* Ball, passando per 5 stadi giovanili.

Figura 6: Esuvie rimanenti su foglie

2.3.1.2. Distribuzione geografica

Scaphoideus titanus è una specie di origine nordamericana, diffusa nell'areale neartico, tra il 30° e il 50° parallelo, tra Canada e California (Mazzoni e Lucchi, 2005). Questa cicalina è stata introdotta accidentalmente in Europa dal Nord America ed è stata segnalata prima in Francia e poi in Italia (Vidano, 1964). La distribuzione di *S. titanus* è ampia quanto quella di FD, da qui emerge il suo ruolo chiave nella diffusione della malattia.

Ad oggi possiamo affermare che in Europa, *S. titanus* è presente in Austria, Bulgaria, Croazia, Francia, Ungheria, Italia, Portogallo, Spagna, Romania, Slovenia, Slovacchia, Svizzera, Serbia, Montenegro e Bosnia-Erzegovina (Tothova *et al*., 2015)(Figura 7). In Italia, la sua presenza è segnalata in tutto il Nord, ma anche in Toscana, Umbria, Campania e Basilicata, dove in quest'ultime aree viticole del Centro-Sud l'insetto è presumibilmente giunto come uovo svernante nel materiale di propagazione.

La diffusione di *Scaphoideus titanus* in Europa non è ancora finita, come dimostrano diversi studi in cui si è trovato che le popolazioni di *S. titanus* potrebbero stabilirsi in certe regioni del nord Europa ed anche in Cina, a causa delle favorevoli condizioni climatiche (Maixner, 2005; Quanqing and Fujiang, 2006).

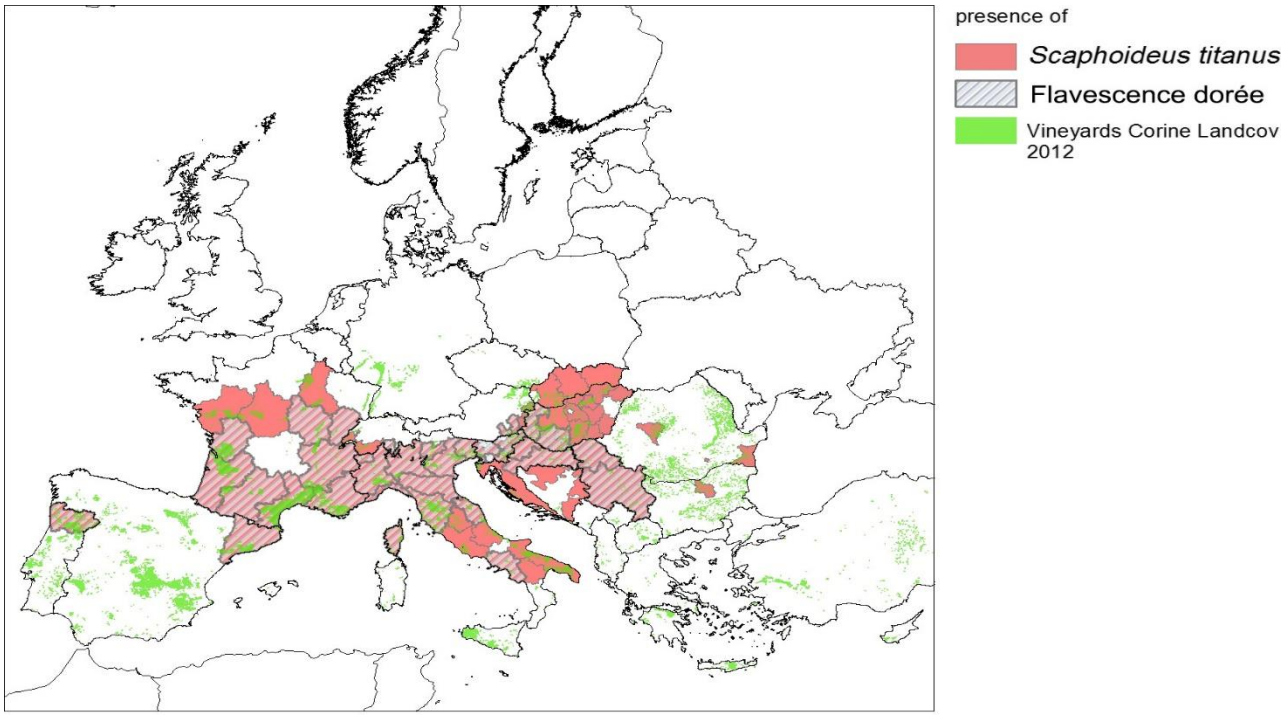

Figura 7: Diffusione di *Scaphoideus titanus* e della Flavescenza Dorata in Europa. Fonte:Risk to plant health of Flavescence dorée for the EU territory, EFSA 2016 doi:10.2903/j.efsa.2016.4603

2.3.1.3. Piante ospiti

Molti individui di *S. titanus* sono stati trovati, nella sua area nativa, nei boschi o nelle siepi dove erano presenti le due specie di vite selvatiche: *Vitis labrusca* e *Vitis riparia* mentre solamente pochi individui sono stati osservati nei vigneti di *Vitis Vinifera* (Lessio, Tedeschi and Alma, 2007), preferenza che si osserva anche in Europa dove entrambe le specie coesistono. In Europa *S. titanus* è stato osservato anche su *V. labrusca* e su *Parthenocissus quinquefolia* (Tabella 2) ed occasionalmente in altre piante non appartenenti alla famiglia *Vitaceae*, come *Salix viminalis* e *Prunus persica*, quando crescono in prossimità della vite ed in gran numero sull'olmo (*Ulmus americana*) in America. Inoltre, sempre in Nord America, *S. titanus* è stato riportato su molte altre piante il cui stato di ospite non è stato ancora dimostrato, ed in vari ambienti tra cui foreste, prati, frutteti (Hill e Sinclair, 2000).

2.4 VETTORE SECONDARIO NELLA TRASMISSIONE DELLA FLAVESCENZA DORATA

2.4.1 *Orientus ishidae*

2.4.1.1 Ciclo biologico

Orientus ishidae (Matsumura), è una cicalina appartenete alla sottofamiglia delle Deltocephalinae, è una specie monovoltina che sverna allo stadio di uovo sotto il ritidoma di diverse piante arboree e arbustive (Lessio *et al.*, 2016). Lo sviluppo da uovo a adulto passa attraverso 5 età giovanili: 2 neanidi e tre di ninfa (Figura 8) che compaiono nel mese di maggio mentre gli adulti sono presenti dalla fine di giungo all'inizio di ottobre, con un picco di catture a metà luglio (Lessio *et al.*, 2016). Sia le ninfe che gli adulti causano ingiallimento e arresto della crescita sulle foglie delle loro piante ospiti. Tuttavia, molti aspetti del ciclo biologico di questa cicalina, sono ancora sconosciuti, come anche i suoi rapporti con la vite per quanto riguarda la deposizione delle uova e la densità di popolazione delle neanidi (Lessio *et al.*,2019).

Si è dimostrato che *O. ishidae* (adulti e stadi giovanili) è in grado di portare diversi ceppi del fitoplasma agente causale di FD. Il primo indizio si è avuto quando nel 2010 in Slovenia (Alma *et al.*, 2015) e nel Nord Italia (Gaffuri *et al.*, 2011), sono stati trovati alcuni adulti portatori di fitoplasmi del gruppo 16SrV, rispettivamente appartenenti ai cluster FD1, FD2 e FD3 ed FD2 e FD3. La sua capacità di vettore di fitoplasmi appartenenti al gruppo 16SrV è stata dimostrata, in condizioni di laboratorio, utilizzando come sorgente di inoculo la fava (*Vicia faba* L.) e mantenendo gli individui infetti su nocciolo durante il tempo di latenza (Lessio *et al.*, 2019). La trasmissione ha comunque una bassa efficienza.

La presenza del vettore a livello delle ghiandole salivari è una conoscenza preliminare per poter considerare un insetto come potenziale vettore di un determinato fitoplasma. Analisi FISH (ibridazione in situ fluorescente) condotte su individui di *O. ishidae* dopo i saggi di trasmissione, hanno dimostrato che i fitoplasmi appartenenti al gruppo 16SrV possono essere acquisiti e raggiungere le ghiandole salivari. La presenza di fitoplasmi del gruppo 16SrV nelle ghiandole salivari è un'ulteriore evidenza sulla possibilità che essi possono essere trasmessi in modo persistente da questa cicalina.

Figura 8: Forme giovanili ed adulto di *Orientus ishidae*

2.4.1.2 Distribuzione geografica

Orientus ishidae, formalmente conosciuta come *Phlepsius tinctorius* (Sanders e DeLong) è considerata una specie Asiatica, introdotta per la prima volta in USA probabilmente insieme alla pianta ornamentale *Aralia sp.* (Felt e Bromley, 1941). La sua prima comparsa in Europa si suppone sia avvenuta nel 1998 in Svizzera e nel Nord Italia (Guglielmino, 2005), dove è stata ritrovata in differenti regioni: Piemonte (Chen *et al.*, 2009), Veneto (Forte *et al.*, 2013), Toscana (Mazzoni, 2005), Slovenia (Seljak, 2004), Germania (Nickel, 2010), Francia (Mifsud *et al.*, 2010), Repubblica Ceca (Malenovský and Lauterer, 2010) e recentemente anche nei Paesi Bassi (Den Bieman e Klink, 2015), Gran Bretagna, Austria e Ungheria (Koczor *et al.*, 2013).

2.4.1.3 Piante ospiti e rapporto con il vigneto

Orientus ishidae è presente a densità elevate soprattutto ai bordi dei vigneti, in corrispondenza di siepi e boschetti in cui sono presenti le sue piante ospiti preferite, rappresentate soprattutto da nocciolo (*Corylus avellana* L.) e ontano (*Alnus glutinosa* L.) (Lessio *et al.*, 2019).

Lo studio di Lessio *et al.*, 2019, ha inoltre identificato la presenza di ninfe e adulti anche su latifoglie, come il salice (*Salix* spp), carpino (*Carpinus* spp.) e noce (*Juglans regia* L., *Juglans nigra* L), mentre non è stato ritrovato né su piante erbacee, né su *Ailanthus altissima* (Mill.) e *C. vitalba* (Tabella 3). Anche la vite può rappresentare un sito di ovideposizione per la cicalina ed analogamente a *S. titanus*, il sito privilegiato è legno di almeno 2 anni o più vecchio; tuttavia, la presenza di stadi giovanili su vite è molto scarsa se confrontata con quella su nocciolo e ontano (Lessio *et al.*,2019). Le viti inselvatichite invece, rappresenterebbero per *O. ishidae* un ospite

legato quasi esclusivamente all'ovideposizione, in quanto le forme giovanili poi colonizzano altre piante spontanee.

Tabella 3: Piante su cui sono stati ritrovati forme giovanili e/o adulti di *O. ishidae (*Lessio et al.,2016*).*

Famiglia	**Specie**	**Stadi giovanili**	**Adulti**
Corylaceae	*Corylus avellana* L.	X	X
Corylaceae	*Ostrya carpinifolia* Scopoli	X	X
Corylaceae	*Carpinus betulus* L.	X	X
Rosaceae	*Malus domestica* Borkhausen	X	X
Rosaceae	*Prunus domestica* L.	X	X
Rosaceae	*Prunus avium* L.	X	X
Rosaceae	*Rubus fruticosus* L.		X
Rosaceae	*Cydonia oblonga* Mill.	X	X
Rosaceae	*Chaenomeles speciosa* (Sweet)Nakai	X	
Rosaceae	*Rosa canina* L.	X	X
Rosaceae	*Crataegus oxyacantha* L.		X
Juglandaceae	*Juglans regia* L.	X	X
Juglandaceae	*Juglans nigra* L.	X	X
Berberidaceae	*Berberis spp.*	X	X
Berberidaceae	*Buxus sempervirens* L.	X	X
Papaveraceae	*Chelidonium majus* L.		X
Vitaceae	*Vitis vinifera* L.	X	X
Caprifoliaceae	*Viburnum tinus* L.		X
Ulmaceae	*Ulmus minor* L.	X	X
Salicaceae	*Populus alba* L.	X	
Salicaceae	*Salix* spp.	X	X
Araliaceae	*Hedera helix* L.	X	X
Cornaceae	*Cornus sanguinea* L.	X	X
Grossulariaceae	*Ribes uva-crispa* L.	X	
Fabaceae	*Robinia pseudoacacia* L.	X	
Oleaceae	*Forsythia viridissima* Lindl.	X	
Oleaceae	*Fraxinus escelsior* L.	X	

3. SCOPO DELLA TESI

Come spiegato nella parte introduttiva, la prima segnalazione della Flavescenza Dorata risale agli anni ’50 del secolo scorso nella Francia sud-occidentale, mentre in Italia risale alla metà degli anni ’60 in vigneti dell’Oltrepò pavese (Belli *et al.*, 1973). A partire dagli anni ’80 le segnalazioni di giallumi della vite in Italia si susseguirono, andando ad interessare prima la regione Veneto, poi il Friuli-Venezia Giulia.

In Veneto le epidemie più devastanti risalgono agli anni Novanta e già allora si era individuato che la malattia era associata a ceppi diversi di questo fitoplasma (Martini *et al.*, 1999). Dopo anni relativamente tranquilli, tra il 2018 e il 2021, nella Regione del Veneto, le manifestazioni epidemiche causate da Flavescenza dorata hanno assunto nuovamente dimensioni maggiori e molto preoccupanti, interessando soprattutto le zone viticole delle province di Treviso, Vicenza, Belluno, Venezia e in parte di Verona.

In Friuli-Venezia Giulia le fitoplasmosi a carico della vite risultano note già a partire dall’inizio degli anni ’80, quando fu individuata la presenza di Legno Nero (Bois noir-BN), ma solo a metà degli anni ’90 furono riscontrati i primi casi di flavescenza dorata (FD) e da allora sono state create e adottate misure di prevenzione e controllo. A differenza di altri comprensori viticoli italiani ed esteri, dove le misure di controllo sono state attuate in ritardo (ossia quando l’epidemia era già in atto), in FVG grazie al programma regionale pluriennale “Flavescenza dorata” approvato nel 1996 dalla Direzione Regionale dell’Agricoltura, si è iniziato un programma di lotta a FD ancora prima che questa fosse presente sul territorio regionale. Alla gestione di questa malattia fu dedicata particolare attenzione, soprattutto in virtù dell’importanza del settore vivaistico regionale, che vanta nella produzione di barbatelle un ruolo di leadership a livello mondiale. In tempi recenti, tuttavia, si sta registrando una nuova ondata epidemica con diffusione su tutta la regione Friuli-Venezia Giulia, in particolare nel territorio della DOC “Friuli Colli Orientali”. Ad oggi non sono disponibili mezzi tecnici preventivi e curativi contro l’agente causale; pertanto, la lotta alla flavescenza dorata è esclusivamente indirizzata contro l’insetto vettore principale, la cicalina *Scaphoideus titanus* Ball., integrata da monitoraggi del medesimo vettore, di quelli alternativi e di piante di vite selvatiche e degli ospiti vegetali che possono agire come serbatoio d’infezione per i fitoplasmi di flavescenza dorata.

Questo lavoro si inserisce in un progetto di ricerca sulla gestione della Flavescenza dorata nel territorio del Consorzio Prosecco Superiore Conegliano Valdobbiadene DOCG, finanziato nel

2021 dal Consorzio medesimo, da una quindicina di aziende vitivinicole e da Banca Prealpi San Biagio.

Uno degli scopi di questo progetto è stato il monitoraggio di specie vegetali e di insetti, che fungono rispettivamente da ospiti e da vettori alternativi e che possono avere quindi un ruolo importante nel ciclo epidemiologico della malattia. Tra giungo e luglio 2022, sono stati catturati mediante aspiratori da campo gli insetti, mentre soprattutto ad inizio settembre è stata effettuata la raccolta di campioni fogliari di viti sintomatiche e di specie spontanee arbustive/arboree in differenti vigneti situati nelle zone di: Valdobbiadene (TV), San Pietro di Felletto (TV) e Santa Margherita del Gruagno (UD). La scelta delle specie di insetti e delle piante spontanee che sono state prese in considerazione, si è basata soprattutto sulla base della bibliografia esistente; evidenze scientifiche che sono state riportate in precedenza nel paragrafo relativo allo studio dell'epidemiologia della Flavescenza Dorata.

In particolare, nella località San Pietro di Felletto, sono stati prelevati dei campioni fogliari da noccioli, *Prunus* sp., viti selvatiche e dalle viti presenti nelle zone adiacenti che presentavano dei sintomi ben visibili di Flavescenza Dorata. Nella stessa località sono stati inoltre catturati i campioni di *Orientus Ishidae* dalla pagina inferiore delle foglie delle specie arbustive. Si è deciso inoltre di avviare delle analisi preliminari su individui di *Jikradia olitoria*, un emittero appartenente alla famiglia Cicadellidae ed alla sottofamiglia Coelidiinae che durante i monitoraggi è apparsa molto abbondante in un vigneto nella vicina località Collalbrigo (TV). È una cicalina originaria dell'America settentrionale, che è risultata l'unico insetto in grado di trasmettere il fitoplasma NAGYI-B associato ai North American Grapevine Yellows (NAGY) su *Vitis vinifera.*

A Santa Margherita del Gruagno (UD), sono stati invece prelevati campioni fogliari da piante di nocciolo e di ontani presenti nelle zone limitrofe ad un vigneto, nel quale, da indagini precedenti, si presupponeva la presenza di giallumi causati da FD. Ospiti alternativi insieme a piante di vite selvatiche, agiscono infatti come serbatoio d'infezione per i fitoplasmi di Flavescenza Dorata e sono spesso la causa della presenza di un effetto di bordo nella distribuzione delle piante sintomatiche in vigneti colpiti dalla malattia (Pavan *et al.*, 2012).

Tutti i campioni sono stati sottoposti ad estrazione del DNA genomico totale e a Real-time PCR con primers universali per determinare la presenza di fitoplasmi.

Un ulteriore obiettivo del lavoro svolto è stato quello di caratterizzare i ceppi di FD presenti nei campioni che attraverso analisi Real-time PCR, sono risultati positivi a FD. La caratterizzazione molecolare dei ceppi di flavescenza dorata è stata eseguita mediante nested-PCR su gene housekeeping *map* con primers specifici, seguita da analisi RFLP e sequenziamento.

Pertanto, la caratterizzazione dei ceppi di FD diffusi in eventuali insetti vettori ed ospiti alternativi e la delucidazione delle proprietà epidemiologiche di FD in un determinato contesto di agroecosistema vigneto, ci permetterà di migliorare le strategie di controllo della malattia.

4. MATERIALI E METODI

4.1. RACCOLTA DEI MATERIALI

4.1.1. Raccolta dei materiali vegetali

I campioni vegetali sono stati raccolti nei mesi di giugno e di settembre 2022. In totale sono stati raccolti 101 campioni in tre differenti zone: 23 campioni sono stati prelevati a Valdobbiadene (TV) di cui 19 viti e 4 noccioli, 53 campioni a San Pietro di Felletto (TV) di cui 34 noccioli, 18 viti ed 1 *Prunus* sp., e 10 campioni a Santa Margherita del Gruagno (UD), di cui 7 ontani e 3 noccioli. A San Pietro di Felletto ed a Valdobbiadene sono state prelevati i campioni da 4 siti per ciascuna zona, identificati come di seguito:

- San Pietro di Felletto: Borgo America, Borgo Doimo, azienda vinicola Colodel, azienda vinicola Prosecco La Svolta;
- Valdobbiadene: Area 4 vigneto bosco, Area 4 vigneto giardino Adami, vigneto Pierfrancesco Adami, Area 4 vigneto Ruggeri.

Questi campioni erano rappresentati da foglie raccolte sia dalle viti sintomatiche presenti nel vigneto coltivato, sia dalle piante spontanee presenti tra la vegetazione circostante (viti inselvatichite, altre piante arboree e arbustive).

La raccolta di piante spontanee ha riguardato essenzialmente quelle specie segnalate in bibliografia come ospiti alternativi per FD.

I campioni sono stati raccolti, etichettati e posti in sacchetti di plastica, quindi conservati ad una temperatura di 4 °C.

4.1.2. Raccolta degli insetti vettori

Gli insetti vivi sono stati catturati nei mesi di giungo e luglio 2022, mediante l'utilizzo di un aspiratore entomologico. In particolare, 62 campioni di *Orientus ishidae* sono stati catturati a Borgo America (San Pietro di Felletto) mentre 42 campioni di *Jikradia olitoria* sono stati catturati a Collalbrigo (TV). Gli insetti una volta catturati sono stati posti all'interno di provette Falcon™ contenenti etanolo 70% e quindi conservati in freezer a una temperatura di -20 °C in attesa di essere analizzati.

4.2. ANALISI MOLECOLARI DEI CAMPIONI

I campioni raccolti sono stati sottoposti a diagnosi molecolare al fine di evidenziare la presenza di FD. La procedura di analisi molecolare ha compreso le seguenti fasi:

- estrazione del DNA genomico totale;
- real-time PCR con primers universali.

4.2.1. Estrazione degli acidi nucleici

4.2.1.1. Estrazione da campioni vegetali

L'estrazione del DNA da campioni vegetali è stata effettuata utilizzando 0,6–1 g di nervature fogliari precedentemente prelevate e conservate a -20 °C, secondo il protocollo Doyle and Doyle modificato (Martini *et al*., 2009).

Il materiale vegetale, rappresentato dalle nervature fogliari, è stato raccolto in mortai di ceramica e successivamente frantumato con l'ausilio di un pestello dopo l'aggiunta di azoto liquido. Dopo l'aggiunta di 5 ml di 2,5% CTAB extraction buffer preriscaldato a 65 °C (100 mM Tris pH 8,0; 1,4 M NaCl; 50 mM EDTA pH 8,0; 2,5% CTAB; 1% 56 PVP-40; 0,2% 2-mercaptoetanolo aggiunto prima dell'uso), si è proceduto all'omogeneizzazione del tessuto frantumato usando il pestello. Il CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) è un detergente cationico che ha la capacità di formare complessi con il DNA e, separatamente, con polisaccaridi e proteine. Questo permette la separazione del DNA da polisaccaridi, fenoli e altre impurità ad esso associate. A questo punto, attraverso pipette Pasteur monouso, 1 ml di tale sospensione è stato trasferito in provette Eppendorf da 2 ml messe ad incubare in bagnomaria a 65 °C per 30 minuti, avendo cura di agitarle ogni 5-6 minuti. Questo passaggio risulta essenziale al fine effettuare la lisi delle cellule e denaturare le proteine.

I campioni sono stati lasciati raffreddare per una decina di minuti a temperatura ambiente e in seguito sono stati aggiunti 950 µl di soluzione 24:1 cloroformio: alcol isoamilico. Il cloroformio completa la denaturazione delle proteine, rimuove i lipidi e il CTAB che ha legato i polisaccaridi. Il cloroformio, inoltre, grazie alla sua elevata densità facilita la separazione della fase acquosa (contenente il DNA deproteinizzato) da quella organica (fenolica) stabilizzando l'interfaccia tra le due fasi. L'alcool isoamilico invece ha la funzione di prevenire la formazione di schiuma durante l'estrazione.

Una volta miscelati con il vortex, i campioni sono stati centrifugati a 13000 rpm per 15 minuti a 4 °C. Dopo la centrifugazione all'interno di ogni Eppendorf risultano presenti tra fasi:

- superiore: corrispondente alla fase acquosa, contenente la soluzione di acidi nucleici;
- interfase: contenente proteine denaturate, CTAB e polisaccaridi;
- inferiore: corrispondente alla fase fenolica, contenente lipidi e proteine ricche di amminoacidi idrofobici.

La fase acquosa è stata prelevata e trasferita all'interno di nuove Eppendorf da 2 ml. A questo punto si è proceduto con la precipitazione degli acidi nucleici mediante l'aggiunta di 600 µl di isopropanolo freddo (-20 °C). I tubi sono stati gentilmente invertiti mentre il DNA precipitava; quindi, i campioni sono stati centrifugati a 13000 rpm per 10 minuti a 4 °C. Una volta centrifugati, il sopranatante è stato scartato, mentre il pellet è stato lavato per 15 minuti con 800 µl di etanolo 70% freddo (-20 °C) al fine di rimuovere le tracce di CTAB e sali. Dopo aver eliminato l'etanolo, il pellet è stato asciugato in liofilizzatore (Hetovac 60e) per 5-7 minuti. A questo punto gli acidi nucleici sono stati risospesi in 400 µl di TE buffer 1X (1 M Tris pH 8,0; 0,5 M EDTA) a temperatura ambiente per 30 minuti. Terminato questo lasso di tempo, i campioni sono stati agitati nuovamente sia manualmente che con l'ausilio del vortex; quindi, è stata effettuata una nuova precipitazione, mediante l'aggiunta di 40 µl di sodio acetato NaOAc (3 M, pH 5,2) e di 900 µl di etanolo 95% freddo (-20 °C). I tubi sono stati invertiti più volte delicatamente e successivamente centrifugati a 14000 rpm per 3 minuti a 18 °C. Il sopranatante è stato eliminato e il pellet è stato lavato prima con etanolo 70% freddo (-20 °C) per 15 minuti poi con etanolo 80% freddo (-20 °C) per altri 15 minuti avendo cura ogni volta di scartare il sopranatante.

Infine, il pellet è stato asciugato in liofilizzatore (Hetovac) per 5-7 minuti e risospeso in 100 µl di TE buffer 1X agitando i tubi prima manualmente e successivamente con l'ausilio del vortex, prima di procedere alla quantificazione del DNA mediante spettrofotometro Nanodrop1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific. MA, USA). Tale strumento permette di determinare per ogni campione: la concentrazione del DNA espressa in ng/µl e la qualità del DNA estratto mediante i valori dei due rapporti di assorbanza a 260/280 e 260/230. Gli acidi nucleici così estratti possono essere conservati a 4°C (conservazione a breve termine) o -20°C (conservazione a lungo termine).

4.2.1.2. Estrazione da insetti

Per effettuare l'estrazione si è partiti da individui singoli di *O. ishidae* e *J. olitoria* conservati in etanolo 70% alla temperatura di -20 °C. L'estrazione degli acidi nucleici è stata condotta secondo il protocollo Doyle and Doyle modificato (Martini *et al*., 2009).
I campioni sono stati adagiati singolarmente all'interno di una provetta Eppendorf da 2 ml e successivamente asciugati in liofilizzatore Hetovac per 7-10 minuti. Una volta terminata l'asciugatura, gli insetti sono stati polverizzati all'interno della provetta con l'ausilio di un micropestello, previa aggiunta di azoto liquido.
Dopo l'aggiunta di 950 µl di tampone di estrazione CTAB 2,5% preriscaldato a 65 °C (100 mM Tris-HCl pH 8.0; 1.4 M NaCl; 50 mM EDTA pH 8.0; 2.5% CTAB; 1% PVP-40) e mediante il micropestello, è stata effettua l'omogeneizzazione all'interno del tubino.
Successivamente si è proceduto con gli stessi step visti per l'estrazione degli acidi nucleici da matrice vegetale ma, in questo protocollo non è stata effettuata la seconda precipitazione.

Dopo l'asciugatura del pellet con Hetovac per 5-10 minuti, gli acidi nucleici sono stati risospesi in 50 µl di TE buffer 1X (1 M Tris pH8.0; 0,5 M EDTA) e posti in frigorifero per essere conservati a 4 °C. I campioni sono stati agitati manualmente e poi con l'ausilio del vortex, prima di procedere alla quantificazione del DNA mediante spettrofotometro Nanodrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific. MA, USA).

4.2.2. Real-Time PCR con primers universali

Tutti i DNA genomici estratti, sia dai campioni vegetali che dagli insetti, sono stati sottoposti a Real-time PCR al fine di evidenziare la presenza di fitoplasmi.

La Real-time PCR è stata eseguita usando SSoFast™Evagreen®Supermix (Bio-Rad Laboratories, CA, USA), seguendo il protocollo fornito dalla casa produttrice e una coppia di primers universali per fitoplasmi:

- 16S(RT)F1 (5'-TTCGGCAATGGAGGAAAC T-3') (Saccardo *et al.*, 2012);
- 16S(RT)R1 (5'-GTTAGCCGGGGCTTATTCAT-3') (Saccardo *et al.*, 2012).

Ogni campione è stato diluito fino a raggiungere la concentrazione finale di DNA di 20ng/µl. Da ogni diluizione, sono stati poi prelevati 2 µl, i quali sono stati aggiunti ai seguenti reagenti al fine di ottenere una soluzione con volume finale di 15 µl:

- 5,05 µl di H_2O sterile;

- 7,5 µl di 2X SSoFast™Evagreen®Supermix;
- 0,225 µl di primer forward 20 pmol/µl;
- 0,225 µl di primer reverse 20 pmol/µl.

Sono stati inseriti 3 controlli positivi, rappresentati da: ceppo di riferimento EY-1 (Elm yellows, 16SrV-A), ceppo FD92 (Flavescence dorée, 16SrV-D) e da '*Ca.* P. solani' ceppo A-SLO (trasmesso a vinca con vettore aereo, 16SrXII-A). I controlli negativi inseriti sono stati 2, costituiti dalla miscela di reazione sopra indicata senza alcuna aggiunta di DNA.

La Real-time PCR è stata condotta in un termociclatore CFX96 Real-time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, CA, USA).

Di seguito vengono riportate le condizioni di reazione:

- denaturazione iniziale: 98°C per 2 min;
- 55 cicli composti da denaturazione a 98°C per 5 s e *annealing*/estensione a 57°C per 5 s.

Per l'analisi della temperatura di melting in seguito ad un iniziale step di denaturazione a 95°C per 1 minuto e ad una fase di re-*annealing* a 65°C per 1 minuto, la temperatura è stata innalzata progressivamente da 65 a 95°C con un incremento di 0.5°C ogni 5 secondi.

4.2.3. Caratterizzazione dei ceppi di FD mediante analisi di nested-PCR/RFLP sul gene *map*

Il protocollo per l'individuazione dei principali cluster di appartenenza dei ceppi di FD è stato messo a punto sulla base del lavoro svolto da Arnauld (Arnaud *et al.*, 2007a). In seguito all'amplificazione del gene *map* dai campioni di vite, è stata eseguita una digestione enzimatica con due enzimi di restrizione: *Alu*I (Fermentas, Lituania) e *Tai*I (Fermentas, Lituania). Quest'ultimo è stato utilizzato in quanto isoschizomero dell'enzima *Eco*72I utilizzato da Arnauld nel citato lavoro ma che non era disponibile nel nostro laboratorio.
I primers utilizzati nella reazione di PCR sono stati:

- FD9f5 (5'-CAAAAAAATTACTTTTGGCGGGAC- 3') (Arnaud *et al.*, 2007a);
- MAPrI (5'-TGCTCAAAATGAGCGCTTAAAC- 3') (Arnaud *et al.*, 2007a).

La miscela di reazione con volume finale di 25 µl risultava costituita da:

- 14,38 µl di H2O sterile;
- 5 µl di 5X GoTaq® Flexi Buffer (Promega, WI, USA);

- 2 µl di dNTPs 2.5 mM (Sigma-Aldrich, MO, USA);
- 1,5 µl di MgCl2 25 mM (Promega, WI, USA);
- 0,5 µl di primer forward 20 pmol/µl;
- 0,5 µl di primer reverse 20 pmol/µl;
- 0,125 µl di 5X GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega, WI, USA);
- 1 µl di DNA.

La reazione di PCR diretta è stata condotta in un termociclatore One Advanced con il seguente programma:

- denaturazione iniziale: 94 °C, 2 min;
- denaturazione: 94 °C, 1 min;
- *annealing*: 55 °C, 45 s;
- estensione: 72 °C, 60 s.

} 35 cicli

Nella PCR diretta è stato aggiunto un controllo positivo rappresentato da FD 92 (Flavescence dorée, 16SrV-D).

A questo punto i prodotti della PCR diretta sono stati sottoposti a una nested-PCR mediante l'uso dei primers:

- FD9f6 (5'- GTCGCTTTAGAATCGACACA- 3') (Arnaud *et al.*, 2007a);
- MAPrII (5'- TCGGAAGTAACAGCAGTCCA- 3') (Arnaud *et al.*, 2007a).

I prodotti di PCR diretta sono stati diluiti 1:50 in H_2O sterile prima di essere aggiunti alla miscela di reazione. Le condizioni di reazione sono state le stesse della PCR diretta.

I campioni sono stati visualizzati mediante elettroforesi in gel di agarosio 1% con l'aggiunta di 1 µl di 6X loading dye (0,25% [w/v] bromophenol blu, 0,25% [w/v] xylene cyanole FF, 40% saccarosio [w/v]). Il gel è stato preparato sciogliendo 1 g di agarosio in 100 ml di tampone 1X TAE. All'interno del campione è poi stato aggiunto 1 µl di intercalante GelRed™ (Biotum, CA, USA) per la successiva visualizzazione dei campioni agli UV. L'elettroforesi è stata effettuata a 100 V per 60 minuti e come marker per verificare la lunghezza degli amplificati è stato usato Gene Ruler 1 kb DNA ladder (Thermo Fisher Scientific, CA, USA). Alla fine della corsa il gel è stato colorato in una soluzione di etidio bromuro per 10 minuti, quindi lavato in acqua per altri 10 minuti e visualizzato in transilluminatore UV.

Successivamente, 6µl di prodotto di nested-PCR sono poi stati sottoposti a digestione enzimatica con gli enzimi *Alu*I (Fermentas, Lituania) e *Tai*I (Fermentas, Lituania), che tagliano, rispettivamente, a livello delle sequenze 5'-AG↓CT- 3' e 5'-ACGT↓-3'. A causa delle diverse temperature di incubazione dei due enzimi, 37 °C per *Alu*I e 65 °C per *Tai*I, sono state effettuate due digestioni separate consecutive.

Per la prima digestione con *Alu*I è stata utilizzata la seguente miscela di reazione:

- 11,5 µl di H_2O sterile;
- 2 µl di 10X Buffer (Fermentas, Lituania);
- 0,5 µl di *Alu*I;
- 6 µl di prodotto nested-PCR.

I campioni sono stati posti in bagnomaria overnight a 37 °C. Il giorno seguente all'interno di ogni eppendorf sono stati aggiunti 0,5 µl di *Tai*I. La seconda digestione è stata effettuata overnight a 65 °C. I prodotti così ottenuti sono stati visualizzati caricando 12 µl in gel di agarosio 2,5% (2,5 g di agarosio in 100 ml di tampone 1X TBE) per 100 minuti a 120V.

Come marker di riferimento è stato utilizzato il DNA del fago ϕX174. Alla fine della corsa il gel è stato colorato come in precedenza nella soluzione di etidio bromuro per 10 minuti, quindi lavato in acqua per altri 10 minuti, prima di essere visualizzato mediante transilluminatore UV.

4.2.4. Preparazione dei campioni per il sequenziamento sul gene *map*

Per l'amplificazione e il sequenziamento del gene *map*, sono stati scelte tutti i campioni di vite del Veneto risultate positive a FD. Per questa analisi, sono stati utilizzati gli stessi primers descritti al paragrafo 4.3, insieme ai reagenti inclusi in "KAPA HiFi HotStart PCR Kit" (KAPA Biosystems, Inc., Cape Town, Sud Africa).

La miscela di reazione, con volume finale di 25 µl, era costituita da:

- 17 µl di H2O sterile;
- 5 µl di 5X KAPA Fidelity Buffer (KAPA Biosystems, Inc., Cape Town, Sud Africa);
- − 0.75 µl di KAPA dNTPs Mix 10 mM (KAPA Biosystems, Inc., Cape Town, Sud Africa);
- 0.375 µl di primer forward (20 pmol/µl);
- 0.375 µl di primer reverse (20 pmol/µl);

- 0.5 µl di KAPA HiFi HotStart DNA Polymerase (KAPA Biosystems, Inc., Cape Town, Sud Africa);
- 1 µl di DNA (20 ng/µl).

Assieme ai campioni da amplificare sono stati inseriti anche un controllo positivo, rappresentato da FD92 (Flavescence dorée, 16SrV-D).

La reazione di PCR è stata condotta in termociclatore One Advanced (Euroclone S.p.A., Pero (MI), Italia) con il seguente programma:

- denaturazione iniziale: 95 °C, 3 min;
- denaturazione: 98°C, 20 s;
- *annealing*: 62 °C, 15 s;
- estensione: 72 °C, 20 s;

} 35 cicli

- estensione finale: 72 °C, 1 min.

Tutti i prodotti della PCR diretta sono stati successivamente diluiti 1:50 in H2O sterile prima di essere aggiunti alla miscela per la reazione di nested-PCR con i primers FD9f6/MAPr2 (Arnaud *et al.*, 2007) e gli altri reagenti utilizzati con le stesse concentrazioni usate nella miscela della PCR diretta. I prodotti di nested-PCR sono stati inviati per il sequenziamento Sanger alla ditta BMR Genomics (PD, Italia), seguendo le indicazioni pubblicate sul sito dell'azienda stessa.

Tutte le sequenze nucleotidiche dei 27 ceppi di interesse sono state poi analizzate con lo strumento Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), al fine di ottenere l'identificazione del genotipo sulla base delle similarità più significative con le sequenze del gene *map* dei ceppi di riferimento e di altri ceppi di interesse (Malembic-Maher et al., 2020) disponibili in GenBank presso sito internet del National Center for Biotechnology Information (NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

5. RISULTATI

5.1. CAMPIONI VEGETALI

5.1.1. Quantità e qualità degli acidi nucleici estratti

Il range di concentrazione degli acidi nucleici estratti da piante di vite è risultato compreso per la maggior parte dei campioni fra 105,7 e 727,2 ng/µl; mentre per le piante di nocciolo prelevate in Veneto, il range oscillava fra 103,6 e 440 ng/µl.

Per quanto riguarda i campioni di noccioli ed ontani prelevati in Friuli-Venezia Giulia, il range di concentrazione era compreso tra 88 e 456,8 ng/µl (i dati relativi alle concentrazioni di ogni campione vegetale, sono riportati in **APPENDICE**). Per la maggior parte dei campioni i valori dei rapporti di assorbanza a 260/280 nm e 260/230 nm rientravano in un range che definisce un DNA come puro.

5.1.2. Real-time PCR con primers universali

Tutti i DNA genomici estratti da materiale vegetale sono stati sottoposti a Real-time PCR con primers universali per i fitoplasmi, i risultati ottenuti sono stati riportati in Tabella 4(una versione completa della tabella si trova in **APPENDICE**). Sono stati ritenuti positivi alla presenza di fitoplasmi associati a FD o di fitoplasmi strettamente correlati tutti quei campioni che hanno mostrato una reazione con un valore di cycle threshold (Ct) ≤ a 40. In particolare, 15 su 18 campioni di vite prelevati a San Pietro di Feletto (TV) sono risultati positivi alla presenza di FD con un valore di Ct compreso tra 21 e 27,53 (Tabella 4). Mentre 17 su 19 campioni di vite prelevati a Valdobbiadene (TV) sono risultati positivi all'amplificazione, di cui 14 sono risultati positivi a LN e i restanti 3 a FD. Tra le specie ospiti alternative, solo 4 noccioli su 66 prelevati a San Pietro di Feletto hanno dato una reazione in Real-time PCR con valori di Ct molto elevati compresi tra 33,40 e 38,38; mentre i 3 noccioli ed i 7 ontani campionati in provincia di Udine sono risultati tutti positivi con Ct compresi tra 19,13 e 31,27 (Tabella 4).

Tabella 4: Risultati ottenuti dall'analisi di real-time PCR sui campioni vegetali.

OSPITE	**COMUNE**	**CAMPIONI POSITIVI**	**Cycle treshold (Ct)** /T. melting (Tm)
Vitis vinifera L. (cv. Glera)	San Pietro di Feletto (TV)	15/18 (83.3%) a FD	**21 ≤ Ct ≤ 27,53** / 78,20
	Valdobbiadene (TV)	14/19 (74%) a LN 3/19 (16%) a FD	**25,25 ≤ Ct ≤ 34,53**/ 79,60 **22,30 ≤ Ct ≤ 26,40**/ 78,20
Corylus avellana L (Nocciolo)	San Pietro di Feletto (TV)	4/66 (6%) a FD	**33,40 ≤ Ct ≤ 38,38**/ 78,20
	Santa Margherita del Gruagno (UD)	3/3 (100%) a FD	**19,93 ≤ Ct ≤ 31,27**/ 78,20
Alnus glutinosa (Ontano)	Santa Margherita del Gruagno (UD)	7/7 (100%) a FD	**19,13 ≤ Ct ≤ 30**/ 78,20

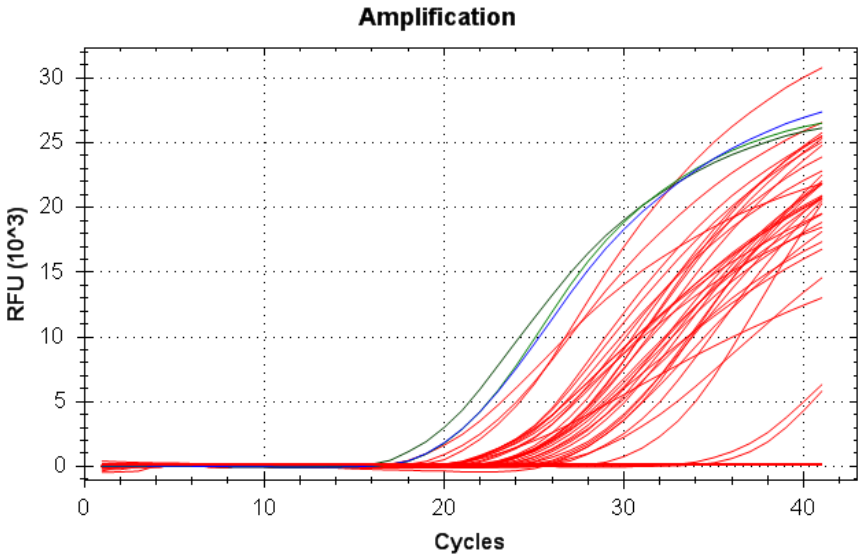

Figura 9: Curve di amplificazione attenute dai campioni vegetali risultati positivi e dai ceppi di riferimento: ceppo FD92 in nero, ceppo A-SLO in verde chiaro e ceppo EY-1 in blu.

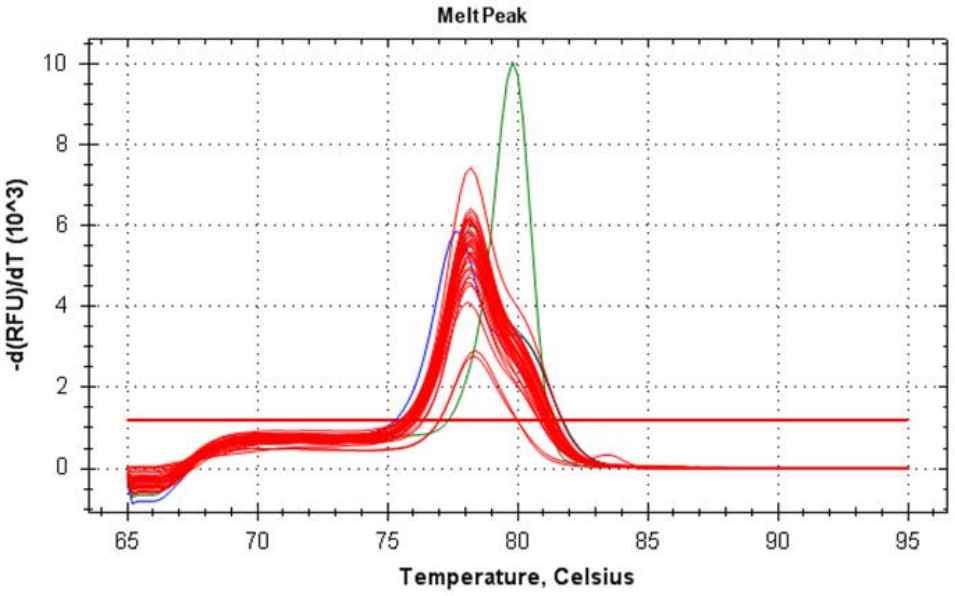

Figura 10: Temperature di melting (Tm) dei campioni vegetali positivi e dei ceppi di riferimento: EY-1 (Elm yellows, 16SrV-A) in blu (T° *melting*: 77,60), ceppo FD92 (Flavescence dorée, 16SrV-D) in rosso (T° *melting*: 78,20) e da '*Ca*. P. solani' ceppo A-SLO (vettore aereo, 16SrXII-A) in verde chiaro (T° *melting*: 79,60).

5.2. CAMPIONI DI INSETTI

5.2.1. Quantità e qualità degli acidi nucleici estratti

Il range di concentrazione degli acidi nucleici per i campioni di *Orientus ishidae* è risultato compreso fra 50,1 e 296,7 ng/µl, mentre per i campioni di *Jikradia olitoria* il range di concentrazione è risultato molto ampio compreso fra 38,1 e 1902,7 ng/µl (i dati relativi alle concentrazioni di ogni campione di insetti, sono riportati in **APPENDICE**). Per la maggior parte dei campioni i valori dei rapporti di assorbanza a 260/280 nm e 260/230 nm rientravano in un range che definisce un DNA come puro.

5.2.2. Real-Time PCR con primers universali

Per quanto riguarda i campioni di insetti sottoposti a real-time PCR con primers universali per i fitoplasmi, si sono ottenuti i risultati riportati nella Tabella 5 (una versione completa della tabella si trova in **APPENDICE**). Sono stati ritenuti positivi alla presenza di fitoplasmi associati a FD o di fitoplasmi strettamente correlati tutti quei campioni che hanno mostrato una reazione con un valore di cycle threshold (Ct) ≤ a 40. In particolare, 1 su 62 campioni di *Orientus ishidae,* è risultato positivo alla presenza di FD con un valore di Ct = 34,94 (Tabella 5), mentre su 32 campioni di

Jikradia olitoria, 8 sono risultati positivi a FD con valori di Ct alti, compresi tra 30,31 e 36,50 (Tabella 5).

Tabella 5: Risultati ottenuti dall'analisi di Real-time PCR sui campioni di insetti

INSETTO	**COMUNE**	**CAMPIONI POSITIVI**	**Cycle treshold (Ct)** /T. melting (Tm)
Orientus ishidae	San Pietro di Feletto (TV)	1/62 (1,2%) a FD	**Ct= 34,94/** 78,20
Jikradia olitoria	Collalbrigo (TV)	8/42(19%) a FD	**30,31 ≤ Ct ≤ 36,50** / 78,20

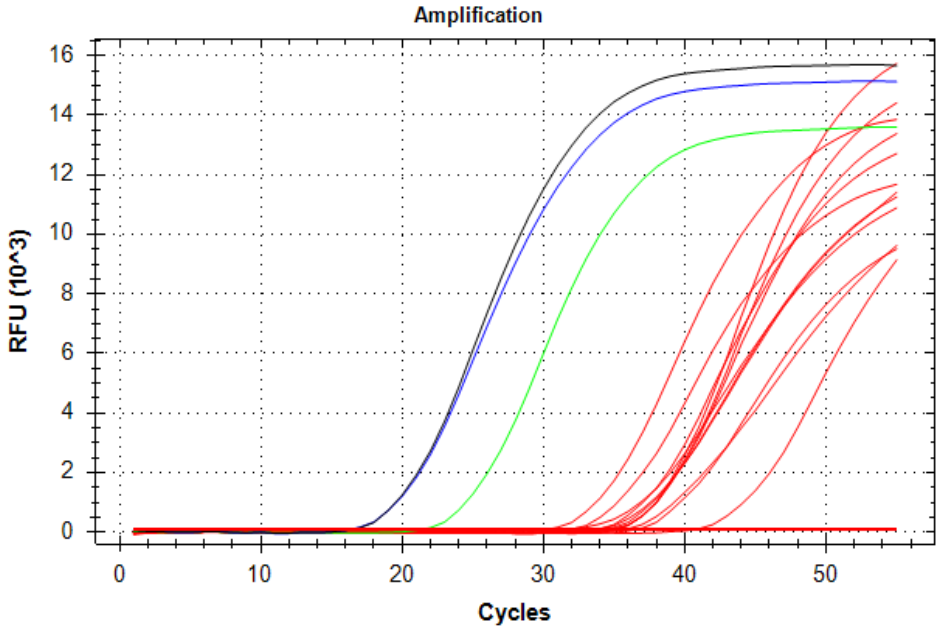

Figura 11: Curve di amplificazione ottenute dai campioni di insetti risultati positivi e dai ceppi di riferimento: ceppo FD-92 in nero, ceppo A-SLO in verde chiaro, ceppo "EY-1 in blu.

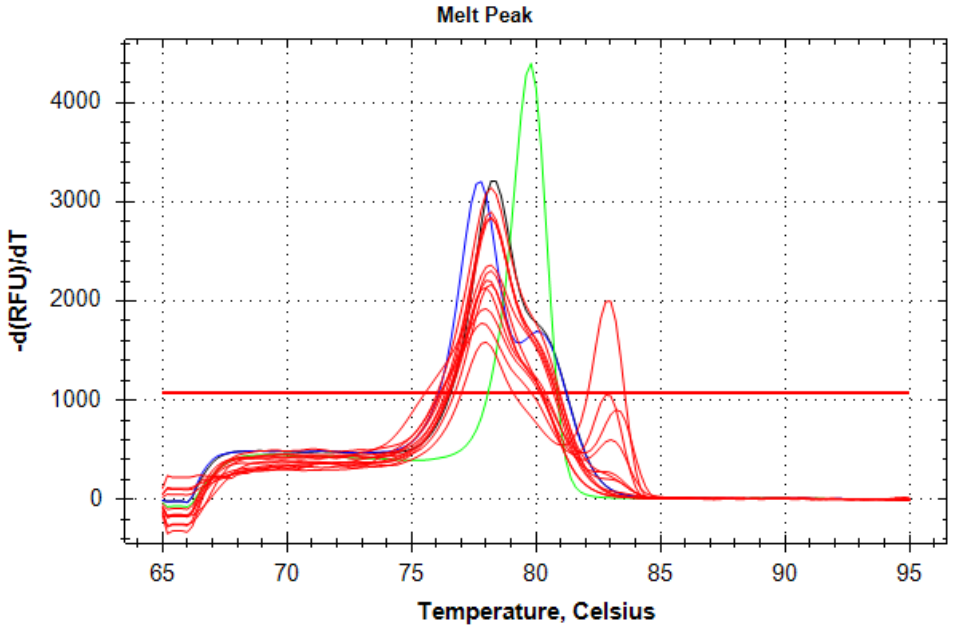

Figura 12: Temperature di melting dei campioni di insetti positivi e dei ceppi di riferimento: campioni positivi: ceppo EY-1 (Elm yellows, 16SrV-A) in blu (T° melting: 77,60), ceppo FD92 (Flavescence dorée, 16SrV-D) in nero (T° melting: 78,20) e da 'Ca. P. solani' ceppo A-SLO (vettore aereo, 16SrXII-A) in verde chiaro (T° melting: 79,60).

5.3. CARATTERIZZAZIONE DEI CEPPI DI FD MEDIANTE ANALISI DI NESTED PCR/RFLP SUL GENE *map*

La caratterizzazione sulla base del gene *map* è stata svolta su tutti i campioni vegetali e su quelli degli insetti risultati positivi in real-time PCR con Ct ≤ 40.

In particolare, dei 41 campioni positivi a seguito di real-time PCR, solo 27 sono stati effettivamente confermati positivi dall'analisi di nested-PCR sul gene *map* (Tabella 6, Figura 13). La non conferma della positività di alcuni campioni in seguito a quest'analisi, può essere spiegata dal fatto che questi presentavano dei valori di Ct molto elevati (30 ≤ Ct ≤ 40) riferibili quindi ad una concentrazione molto bassa del microrganismo target tale da non essere rilevabile dalla nested-PCR sul gene *map*, nelle condizioni utilizzate nel presente lavoro.

Tabella 6: Elenco dei campioni risultati positivi in seguito all'analisi di nested-PCR sul gene *map*

PIANTA OSPITE	**COMUNE**	**n° POSITIVI a fitoplasmi di FD o strettamente correlati in real-time PCR**	**n° POSITIVI su gene *map***
Vitis vinifera L. (cv. Glera)	San Pietro di Feletto (TV)	15/18 (83.3%)	**15/15 (100%)**
	Valdobbiadene (TV)	3/19 (15.8%)	**3/3(100%)**
Corylus avellana L (Nocciolo)	San Pietro di Feletto (TV)	4/66 (6%)	**0/4**
	Santa Margherita del Gruagno (UD)	3/3 (100%)	**2/3 (67%)**
Alnus glutinosa (Ontano)	Santa Margherita del Gruagno (UD)	7/7 (100%)	**7/7 (100%)**
Orientus ishidae	San Pietro di Feletto (TV)	2/62 (3%)	**0/2**
Jikradia olitoria	Collalbrigo (TV)	8/42(19%)	**0/8**

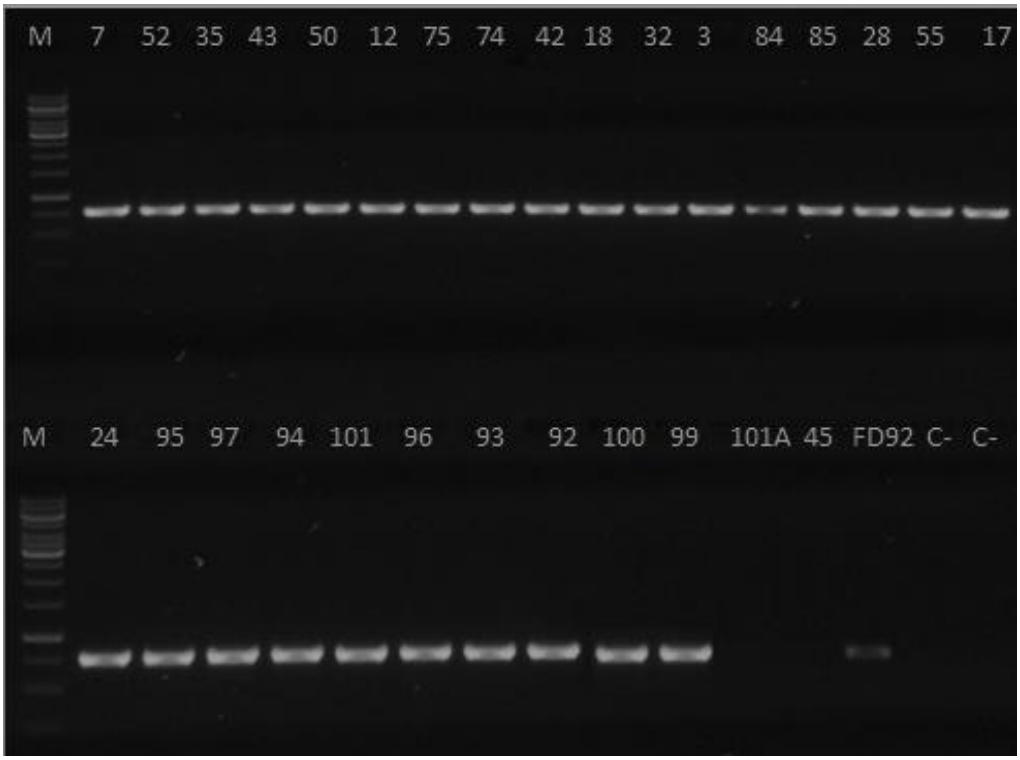

Figura 13: Elettroforesi su gel d'agarosio 1% in tampone 1X TAE dei prodotti di amplificazione della nested PCR ottenuti da campioni vegetali (vite, noccioli ed ontani) con la coppia di primers FD9f6/MAPrII. Ceppo di riferimento: FD-92. *Marker*: Gene *Ruler* 1 kb DNA *ladder*.

Dopo analisi RFLP, tra i 18 campioni di vite della provincia di TV confermati positivi sul gene *map*, 7 sono risultati appartenere al cluster FD3 ed i restanti 11 al cluster FD2. In nessun campione di vite è stata riscontrata la presenza di ceppi appartenenti al cluster FD1 (Figura 14). L'identificazione dei ceppi del fitoplasma è stata fatta confrontando i profili di restrizione ottenuti con quelli di un'altra corsa elettroforetica (Figura 15) di ceppi di riferimento analizzati in lavori precedenti.

I 9 prodotti di nested-PCR ottenuti dalle piante spontanee campionate in provincia di Udine sono stati sottoposti direttamente a sequenziamento Sanger i cui risultati sono riportati nel paragrafo che segue.

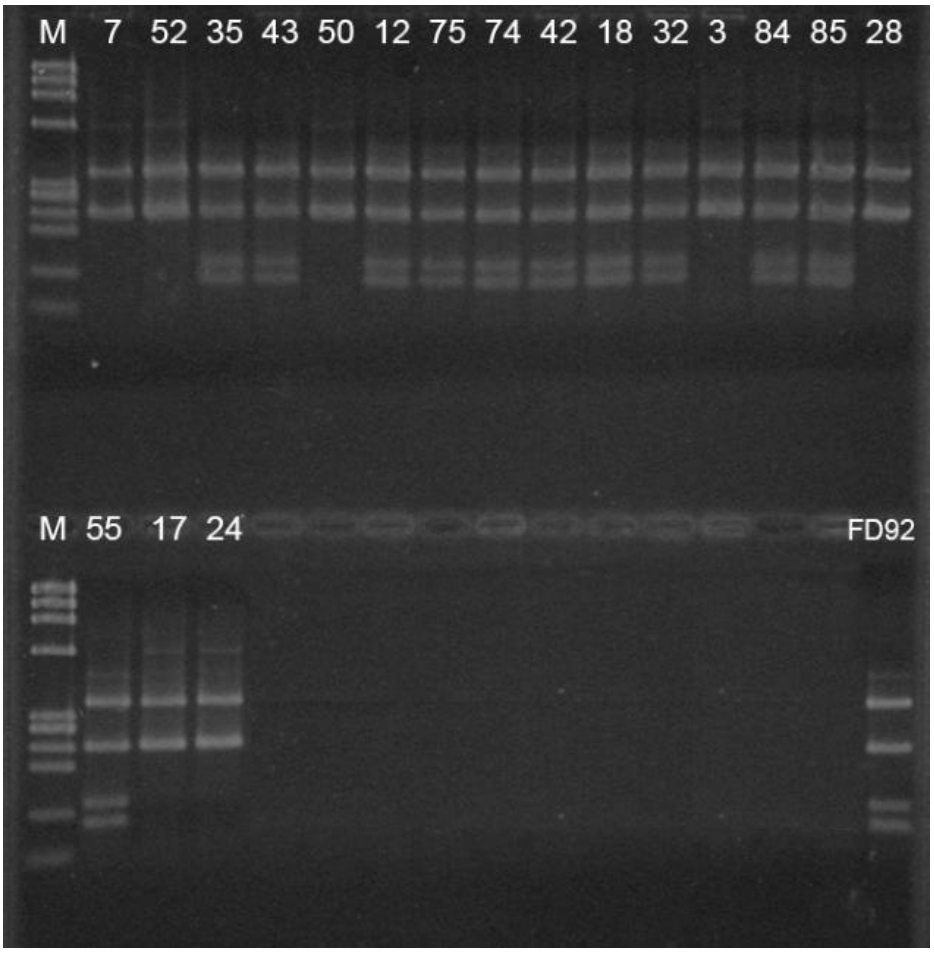

Figura14: Analisi RFLP in gel di agarosio 2.5% con l'enzima *Alu*I e *Tai*I dei prodotti di nested-PCR ottenuti da campioni vegetali (vite) con la coppia di primers FD9f6/MAPrII. Marker: DNA del fago ϕX174 digerito con *Hae*III. Ceppi di riferimento: FD-92.

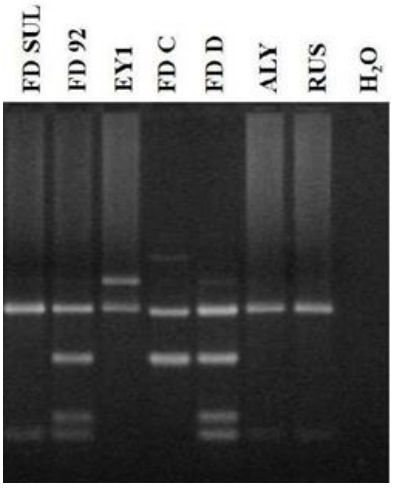

Figura 15: Profili di restrizione dei ceppi di riferimento utilizzati per l'identificazione dei ceppi del fitoplasma della Flavescenza dorata, analizzati in un precedente lavoro. Ceppi di riferimento del gruppo 16SrV: FD SUL (map-FD1, 16SrV-C), FD92 (map-FD2, 16SrV-D), EY1 (16SrV-A), FD-C (map-FD3, 16SrV-C), FD-D (map-FD2, 16SrV-D), ALY(16SrV-C), RUS (16SrV-E).

5.4. SEQUENZIAMENTO DEL GENE *map*

Il sequenziamento del gene *map* di 27 ceppi di fitoplasmi associati a FD o fitoplasmi strettamente correlati provenienti da ontani e noccioli, hanno confermato i risultati dell'analisi RFLP soprattutto per quanto riguarda i campioni di vite, mentre hanno mostrato una elevata variabilità genetica per i fitoplasmi provenienti da ontani e noccioli (Tabella 7). Nei campioni di vite raccolti in Veneto in provincia di TV è stata dimostrata la presenza di due genotipi, quello M3 appartenente al cluster *map*-FD3 (16SrV-C) e quello M54 appartenente al cluster *map*-FD2 (16SrV-D), in particolare:

- 67 % delle viti appartenenti al cluster *map*-FD2, genotipo M54, cioè 11 campioni di vite su 18 positive a FD, delle quali 10 prelevate a San Pietro di Feletto ed 1 a Valdobbiadene;
- 33% delle viti appartenenti al cluster *map*-FD3, genotipo M3, cioè 7 campioni di vite su 18 positive a FD, delle quali 5 prelevate a San Pietro di Feletto e 2 a Valdobbiadene.

I genotipi riscontrati in piante di nocciolo raccolti in Friuli-Venezia Giulia in provincia di UD erano M44 e M48, mentre quelli riscontrati in ontano erano 5 diversi genotipi e rispettivamente M44, M50, M143, M53 ed M13.

Tabella 7: Risultati dell'analisi BLAST condotta sulle sequenze del gene *map* dei campioni risultati positivi alla presenza del fitoplasma di FD o di fitoplasmi strettamente correlati.

OSPITE	**COMUNE**	**N. CAMPIONI POSITIVI A FD**	**CLUSTER /GENOTIPO**
Vitis vinifera L. (cv. Glera)	San Pietro di Feletto (TV)	15	**5/15 (33%) → *map*-FD3/ genotipo M3** **10/15 (66,6%)→ *map*-FD2/ genotipo M54**
	Valdobbiadene (TV)	3	**2/3 (66,6%)→ *map*-FD3/ genotipo M3** **1/3 (33,3%)→ *map*-FD2/ genotipo M54**
Corylus avellana L (Nocciolo)	Santa Margherita del Gruagano (UD)	2	**1/2 (50%)→ genotipo M44** **1/2 (50%)→ genotipo M48**
Alnus glutinosa (Ontano)	Santa Margherita del Gruagno (UD)	7	**1/7 (14,2%)→ genotipo M44** **2/7 (28,6%)→ genotipo M50** **1/7 (14,2%)→ genotipo M143** **1/7 (14,2%)→ genotipo M53** **2/7 (28,6%)→ genotipo M13**

6. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Questo lavoro si inserisce in un progetto di ricerca sulla gestione della Flavescenza dorata nel territorio del Consorzio Prosecco Superiore Conegliano Valdobbiadene DOCG (provincia di Treviso, Veneto), e aveva come scopo il monitoraggio di specie vegetali e di insetti che fungono rispettivamente da ospiti e da vettori alternativi e che possono avere quindi un ruolo importante nel ciclo epidemiologico della malattia. La scelta delle specie di insetti e delle piante spontanee arbustive/arboree che sono state prese in considerazione, si è basata soprattutto sulla base della bibliografia esistente. In particolare, alcuni campioni di piante spontanee sono stati analizzati anche in provincia di Udine (Santa Margherita del Gruagno) per fare un confronto con una situazione di vegetazione spontanea circostante il vigneto che includeva anche l'ontano.

Analizzando in primo luogo i risultati dell'analisi Real-Time PCR sui campioni di vite, si può osservare che la maggioranza delle viti prelevate a San Pietro di Feletto (TV), sono risultate positive al fitoplasma della Flavescenza Dorata (83,3 %), mentre solamente 3 campioni sono risultati negativi. Per quanto riguarda le viti prelevate a Valdobbiadene (TV), in questi vigneti si può vedere una maggiore presenza e diffusione pari al 74% del fitoplasma associato alla malattia del Legno Nero, mentre solo il 16% delle viti è risultato infetto dal fitoplasma della Flavescenza Dorata.

La caratterizzazione fine basata sull'analisi RFLP e sequenziamento sul gene *map* dei fitoplasmi rilevati in vite ha dimostrato come entrambi i genotipi M54 (*map*-FD2) e M3 (*map*-FD3) siano presenti in provincia di TV con una predominanza del genotipo M54 nei campioni provenienti da San Pietro di Feletto dove la diffusione di FD era cospicua. La presenza di entrambi i genotipi è in accordo con quanto riportato in precedenti lavori per il nord-est Italia (Martini *et al.*, 1999; Arnaud *et al.*, 2007a; Foissac and Maixner, 2013; Malembic-Maher *et al*., 2020). Gli stessi genotipi sono stati rilevati anche in un recente lavoro che ha riguardato la caratterizzazione di ceppi di fitoplasmi associati a recenti scoppi epidemici di FD in Friuli-Venezia Giulia (Martini *et al*., 2019).

La ricerca di eventuali ospiti vegetali alternativi circostanti i vigneti non ha dato invece alcun risultato certo in provincia di TV dato che le numerose piante di nocciolo analizzate sono risultate negative ad eccezione di quattro soltanto (4/66) che però, hanno dimostrato valori di Ct molto elevati ($33 \leq Ct \leq 38$), tali da non essere rilevabili dalla successiva analisi di nested-PCR/RFLP sul gene *map*.

Anche le indagini effettuate sugli individui di *Orientus ishidae* prelevati dalla zona boschiva circostante i vigneti di San Pietro di Feletto non hanno dato particolari risultati, dato che i due individui risultati positivi in real-time PCR non è stato possibile amplificarli in nested-PCR per lo stesso motivo esposto precedentemente e che dimostrerebbe come la tecnica di nested-PCR sul gene *map* sia risultata meno sensibile rispetto alla real-time PCR sul gene 16S rDNA alle condizioni utilizzate nella presente tesi.

Dai risultati riguardanti la zona di San Pietro di Feletto sembrerebbe che le siepi e le aree boschive circostanti i vigneti dove i noccioli e gli individui di *Orientus ishidae* normalmente sono numerosi, non ricoprano un ruolo nell'epidemiologia della malattia. Tutto ciò trova supporto nelle indagini dell'entomologo Francesco Pavan (dati non pubblicati), che nell'ambito dello stesso progetto, ha osservato che a San Pietro di Feletto, la presenza di *Orientus ishidae* in vigneto è strettamente associata al bosco, tuttavia questa specie in questa zona, sembrerebbe non avere un ruolo nella recrudescenza della Flavescenza Dorata. Quindi, da queste considerazioni, si può affermare che le recrudescenze di giallumi della vite nell'area del comune di San Pietro di Feletto sono imputabili a ceppi già noti che si sono diffusi nel territorio probabilmente a causa di un insufficiente controllo del vettore principale *S. titanus*, e non per la presenza di altri potenziali insetti vettori.

Considerazioni a parte vanno fatte per l'insetto *Jikradia olitoria* trovata abbondante e catturata in un vigneto nella zona di Collalbrigo e indagini preliminari su questa specie di insetto, al momento hanno dato risultati solo in Real-time PCR che non sono stati confermati in nested-PCR sul gene *map*. I risultati ottenuti indicano una positività molto debole dei campioni analizzati che deriva da una bassa concentrazione del microrganismo target negli individui risultati positivi. La bassa concentrazione potrebbe essere legata semplicemente al fatto che l'insetto nutrendosi su pianta infetta ha ingerito anche cellule del patogeno.

Tornando alle analisi svolte su campioni vegetali, una situazione completamente diversa è stata quella riscontrata in specie spontanee prelevate in una siepe limitrofa ad un vigneto in provincia di Udine (santa Maria del Gruagno) in cui numerose erano le piante di vite colpite da giallumi. Tutte le piante campionate, sia di nocciolo che di ontano, sono risultate positive alla presenza di fitoplasmi strettamente correlati a quelli di FD. Due delle tre piante di nocciolo positive in real-time PCR, sono risultate positive in nested-PCR sul gene *map* e il sequenziamento Sanger ha rivelato la presenza di due genotipi diversi, precisamente M44 e M48.

Anche tutti gli ontani prelevati nella stessa siepe, sono risultati positivi a fitoplasmi strettamente correlati a quelli di FD e in particolare a 5 diversi genotipi: M44, M50, M143, M53 ed M13, presentando quindi una elevata variabilità genetica in accordo con la letteratura (Malembic-Maher S. et al., 2020). Degna di nota è la presenza in ontano del genotipo M50, che è il genotipo del ceppo di riferimento FD70 del cluster *map*-FD1, di un genotipo quindi che è stato responsabile di scoppi epidemici di FD in Francia. Questi risultati, perciò, come ritrovato in letteratura, confermerebbero che gli alberi di ontani Europei (*Alnus glutinosa* e *A. incana)* nonostante siano asintomatici possono rappresentare un serbatoio di infezione primario di genotipi che possono diventare epidemici in vite se risultano compatibili con essa in seguito a salto di specie ontano-vite grazie a specie vettrici polifaghe come *O. ishidae*, e se risultano trasmissibili per mezzo di *S. titanus* da vite a vite.

Ulteriori indagini di epidemiologia molecolare sono necessarie per cercare di delucidare le relazioni esistenti in provincia di TV (Veneto), ma anche in FVG, tra i fitoplasmi di FD presenti nei vigneti indagati e quelli strettamente correlati trovati in specie vegetali spontanee e in potenziali insetti vettori.

7. BIBLIOGRAFIA

Alma, A. *et al.* (2015) 'Insect vectors of plant pathogenic Mollicutes in the Euro-Mediterranean region', *Phytopathogenic Mollicutes*, 5(2), pp. 53–73.

Angelini, E. *et al.* (2001) 'Flavescence dorée in France and Italy-Occurrence of closely related phytoplasma isolates and their near relationships to Palatinate grapevine yellows and an alder yellows phytoplasma', *Vitis*, 40(2), pp. 79–86.

Arashida, R. *et al.* (2008) 'Cloning and Characterization of the Antigenic Membrane Protein (Amp) Gene and In Situ Detection of Amp from Malformed Flowers Infected with Japanese Hydrangea Phyllody Phytoplasma', *Phytopathology®*, 98(7), pp. 769–775. Available at: https://doi.org/10.1094/PHYTO-98-7-0769.

Arnaud, G. *et al.* (2007a) 'Multilocus sequence typing confirms the close genetic interrelatedness of three distinct flavescence dorée phytoplasma strain clusters and group 16SrV phytoplasmas infecting grapevine and alder in Europe', *Applied and environmental microbiology*, 73(12), pp. 4001–4010.

Arnaud, G. *et al.* (2007b) 'Multilocus Sequence Typing Confirms the Close Genetic Interrelatedness of Three Distinct Flavescence Dorée Phytoplasma Strain Clusters and Group 16SrV Phytoplasmas Infecting Grapevine and Alder in Europe', *Applied and Environmental Microbiology*, 73(12), pp. 4001–4010. Available at: https://doi.org/10.1128/AEM.02323-06.

Bagnoli, B. and Gargani, E. (2011) 'Survey on *Scaphoideus titanus* egg distribution on grapevine', *IOBC/wprs Bulletin*, 67, pp. 233–237.

Beanland, L., Noble, R. and Wolf, T.K. (2006) 'Spatial and temporal distribution of North American grapevine yellows disease and of potential vectors of the causal phytoplasmas in Virginia', *Environmental Entomology*, 35(2), pp. 332–344.

Bellardi, M.G. and Bertaccini, A. (2009) 'Recenti acquisizioni sulle malattie da virus e fitoplasmi delle colture ornamentali', *PROTEZIONE DELLE COLTURE*, 4, pp. 8–12.

Belli, G. *et al.* (1973) 'Presenza di una malattia del tipo «flavescence dorée» in vigneti dell'Oltrepò pavese', *Rivista di Patologia Vegetale*, pp. 50–56.

Belli, G. (2013) *Elementi di patologia vegetale*. 2. ed. Edited by G. Assante. Padova: Piccin.

Belli, G., Fortusini, A. and Osler, R. (1978) ‘Present knowledge of diseases of the type" Flavescence dorée" in vineyards of Northern Italy’, *Monografias INIA (Spain)* [Preprint].

Bernard, P. and Du Fretay, G. (1988) ‘Dynamique de population de Scaphoideus titanus, vecteur de la Flavescence dorée dans l’Aude en 1987’, *Bull Tech Inf*, 433(434), pp. 457–464.

Bertaccini, A. *et al.* (1997) ‘Geographical distribution of elm yellowsrelated phytoplasmas in grapevine Flavescence dorée outbreaks in Veneto (Italy)’, in *12th Meeting of the International Council for the estudy of Virus and Virus-like diseases of the Grapevine*, pp. 57–58.

Bertaccini, A. *et al.* (2010) ‘Preliminary results of axenic growth of phytoplasmas from micropropagated infected periwinkle shoots’, in *18th Congress of the International Organization for Mycoplasmology (IOM), Chianciano Terme*, pp. 11–16.

Bertaccini, A. *et al.* (2014) ‘Phytoplasmas and phytoplasma diseases: a severe threat to agriculture’, *American Journal of Plant Sciences*, 2014.

Bertaccini, A. (2014) ‘Stato delle conoscenze sulle malattie dovute a procarioti fitopatogeni’, *accademia nazionale italiana di entomologia* [preprint].

Bertaccini, A. *et al.* (eds) (2019) *Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria - II: Transmission and Management of Phytoplasma - Associated Diseases*. Singapore: Springer Singapore. Available at: https://doi.org/10.1007/978-981-13-2832-9.

Borgo, M. (1988) ‘Problemi connessi alla presenza della «flavescenza dorata» della vite in Provinci di Treviso’.

Boudon-Padieu, E. (2000) ‘Cicadelle vectrice de la Flavescence dorée Scaphoideus titanus Ball, 1932’.

Carraro, L., Loi, N. and Ermacora, P. (2001) ‘Transmission Characteristics of the European Stone Fruit Yellows Phytoplasma and its Vector Cacopsylla Pruni’, *European Journal of Plant Pathology*, 107(7), pp. 695–700. Available at: https://doi.org/10.1023/A:1011923801387.

Casati, P. *et al.* (2017) ‘New insights on Flavescence dorée phytoplasma ecology in the vineyard agro-ecosystem in southern Switzerland: Insights on Flavescence dorée ecology’, *Annals of Applied Biology*, 171(1), pp. 37–51. Available at: https://doi.org/10.1111/aab.12359.

Caudwell, A. *et al.* (1971) 'Étude du rôle de particules de type «mycoplasme» dans l'étiologie de la flavescence dorée de la vigne. Examen cytologique des plantes malades et des cicadelles infectieuses', in *Annales de Phytopathologie*, pp. 107–123.

Christensen, N.M. *et al.* (2005) 'Phytoplasmas and their interactions with hosts', *Trends in Plant Science*, 10(11), pp. 526–535. Available at: https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.09.008.

Chuche, J. and Thiery, D. (2012) 'Egg incubation temperature differently affects female and male hatching dynamics and larval fitness in a leafhopper', *Ecology and evolution*, 2(4), pp. 732–739.

Chuche, J. and Thiéry, D. (2014) 'Biology and ecology of the Flavescence dorée vector Scaphoideus titanus: a review', *Agronomy for Sustainable Development*, 34(2), pp. 381–403. Available at: https://doi.org/10.1007/s13593-014-0208-7.

Constable, F.E. (2009) 'Phytoplasma epidemiology: grapevines as a model.', in *Phytoplasmas: genomes, plant hosts and vectors*. Cabi Wallingford UK, pp. 188–212.

Contaldo, N. *et al.* (2012) 'Axenic culture of plant pathogenic phytoplasmas', *Phytopathologia Mediterranea*, pp. 607–617.

Contaldo, N. *et al.* (2013) 'Cultivation of several phytoplasmas from a micropropagated plant collection', *Petria*, 23(1), pp. 13–18.

Contaldo, N. *et al.* (2014) 'Methods for isolation by culture, and subsequent molecular identification, of phytoplasmas from plants sourced in the field', in *IOM 2014, June 1-6*. Blumenau Brazil, p. 56.

Davis, R.E. and Dally, E.L. (2001) 'Revised subgroup classification of group 16SrV phytoplasmas and placement of flavescence dorée-associated phytoplasmas in two distinct subgroups', *Plant Disease*, 85(7), pp. 790–797.

Den Bieman, C.F.M. and Klink, R. van (2015) 'A considerable increase of the Dutch cicadellid fauna with fifteen species (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Cicadellidae).', *Entomologische Berichten*, 75(5), pp. 211–226.

Dermastia, M. *et al.* (2017) *Grapevine Yellows Diseases and Their Phytoplasma Agents: Biology and Detection*. Cham: Springer International Publishing (SpringerBriefs in Agriculture). Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-319-50648-7.

Doi, Y. *et al.* (1967) 'Mycoplasma- or PLT Group-like Microorganisms Found in the Phloem Elements of Plants Infected with Mulberry Dwarf, Potato Witches' Broom, Aster Yellows, or Paulownia Witches' Broom', *Japanese Journal of Phytopathology*, 33(4), pp. 259–266. Available at: https://doi.org/10.3186/jjphytopath.33.259.

Eriksson, A. *et al.* (2012) 'Exploitation of Insect Vibrational Signals Reveals a New Method of Pest Management', *PLoS ONE*. Edited by G. Smagghe, 7(3), p. e32954. Available at: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032954.

Eveillard, S. *et al.* (2016) 'Contrasting Susceptibilities to Flavescence Dorée in Vitis vinifera, Rootstocks and Wild Vitis Species', *Frontiers in Plant Science*, 7. Available at: https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01762.

Felt, E.P. and Bromley, S.W. (1941) 'New and unusual shade tree pests', *Journal of Economic Entomology*, 34(3), pp. 383–386.

Filippin, L. *et al.* (2009a) 'Molecular characteristics of phytoplasmas associated with Flavescence dorée in clematis and grapevine and preliminary results on the role of Dictyophara europaea as a vector', *Plant Pathology*, 58(5), pp. 826–837.

Filippin, L. *et al.* (2009b) 'Molecular characteristics of phytoplasmas associated with Flavescence dorée in clematis and grapevine and preliminary results on the role of Dictyophara europaea as a vector', *Plant Pathology*, 58(5), pp. 826–837.

Firrao, G., Gibb, K. and Streten, C. (2005) 'Short taxonomic guide to the genus'Candidatus Phytoplasma'', *Journal of Plant pathology*, pp. 249–263.

Foissac, X. and Maixner, M. (2013) 'Spread of grapevine phytoplasma diseases in Europe', *Phytopathogenic Mollicutes*, 3(1), pp. 47–50.

Forte, V. *et al.* (2013) 'Emitteri Auchenorrincha presenti in Ailantus altissima infetto dal fitoplasma della Flavescenza dorata della vite', *Petria 23, 83*, 86.

Gaffuri, F., Sacchi, S. and Cavagna, B. (2011) 'First detection of the mosaic leafhopper, Orientus ishidae, in northern Italian vineyards infected by the flavescence dorée phytoplasma', *New Disease Reports*, 24(22), pp. 2044–0588.2011.

Guerriero, G. *et al.* (2012) ‘A gene expression analysis of cell wall biosynthetic genes in Malus x domestica infected by “Candidatus Phytoplasma mali”’, *Tree Physiology*, 32(11), pp. 1365–1377. Available at: https://doi.org/10.1093/treephys/tps095.

Guglielmino, A. (2005) ‘Observations on the genus Orientus (Rhynchota Cicadomorpha Cicadellidae) and description of a new species: O. amurensis n. sp. from Russia (Amur Region and Maritime Territory) and China (Liaoning Province).’

Gundersen, D.E. *et al.* (1994) ‘RFLP analyses of ribosomal protein genes reveal strain diversity in MLO 16S rRNA groups I and III’, *Phytopathology*, 84, p. 1128.

Hanboonsong, Y. *et al.* (2002) ‘Transovarial transmission of sugarcane white leaf phytoplasma in the insect vector *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura): *Transovarial transmission of sugarcane white leaf phytoplasma*’, *Insect Molecular Biology*, 11(1), pp. 97–103. Available at: https://doi.org/10.1046/j.0962-1075.2001.00314.x.

Hill, G.T. and Sinclair, W.A. (2000) ‘Taxa of leafhoppers carrying phytoplasmas at sites of ash yellows occurrence in New York State’, *Plant Disease*, 84(2), pp. 134–138.

Hogenhout, S.A. and Loria, R. (2008) ‘Virulence mechanisms of Gram-positive plant pathogenic bacteria’, *Current Opinion in Plant Biology*, 11(4), pp. 449–456. Available at: https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.05.007.

Kawakita, H. *et al.* (2000) ‘Identification of Mulberry Dwarf Phytoplasmas in the Genital Organs and Eggs of Leafhopper *Hishimonoides sellatiformis*’, *Phytopathology®*, 90(8), pp. 909–914. Available at: https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.8.909.

Koczor, S. *et al.* (2013) ‘A rapidly spreading potential pest, Orientus ishidae identified in Hungary’, *Bulletin of Insectology*, 66(2), pp. 221–224.

Kube, M. *et al.* (2012) ‘Current View on Phytoplasma Genomes and Encoded Metabolism’, *The Scientific World Journal*, 2012, pp. 1–25. Available at: https://doi.org/10.1100/2012/185942.

Kuszala, C. (1996) ‘Survie du phytoplasme de la flavescence dorée de la vigne en présence d’extraits d’hôtes insectes et végétaux’, *Agronomie*, 16(9), pp. 573–583. Available at: https://doi.org/10.1051/agro:19960905.

Lee, I.-M., Zhao, Y. and Bottner, K.D. (2006) 'SecY gene sequence analysis for finer differentiation of diversestrains in the aster yellows phytoplasma group', *Molecular and Cellular Probes*, 20(2), pp. 87–91.

Lenzi, P. *et al.* (2019) '*Jikradia olitoria* ([Hemiptera]:[Cicadellidae]) Transmits the Sequevar NAGYIIIβ Phytoplasma Strain Associated with North American Grapevine Yellows in Artificial Feeding Assays', *Journal of Insect Science*, 19(1). Available at: https://doi.org/10.1093/jisesa/iey124.

Lessio, F. *et al.* (2015) 'A mathematical model of flavescence dorée epidemiology', *Ecological Modelling*, 312, pp. 41–53. Available at: https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2015.05.014.

Lessio, F. *et al.* (2016) 'The mosaic leafhopper Orientus ishidae: host plants, spatial distribution, infectivity, and transmission of 16SrV phytoplasmas to vines'.

Lessio, F. *et al.* (2017) 'Rapporti tra vite e Orientus ishidae, nuovo vettore di fitoplasmi agenti di flavescenza dorata', in *VII Incontro nazionale sui Fitopasmi e le Malattie da Fitoplasmi*. DISAFA-IPSP, pp. 18–18.

Lessio, F. and Alma, A. (2004) 'Dispersal patterns and chromatic response of Scaphoideus titanus Ball (Homoptera Cicadellidae), vector of the phytoplasma agent of grapevine flavescence dorée', *Agricultural and forest entomology*, 6(2), pp. 121–128.

Lessio, F., Bocca, F. and Alma, A. (2019) 'Development, Spatial Distribution, and Presence on Grapevine of Nymphs of Orientus ishidae (Hemiptera: Cicadellidae), a New Vector of Flavescence Dorée Phytoplasmas', *Journal of Economic Entomology*. Edited by S. Rondon, 112(6), pp. 2558–2564. Available at: https://doi.org/10.1093/jee/toz177.

Lessio, F., Borgogno Mondino, E. and Alma, A. (2009) 'Spatial correlation of Scaphoideus titanus Ball adults on European grapevine at a plot scale: a case study', in *Extended abstracts 16th meeting of ICVG, Dijon*, pp. 166–167.

Lessio, F., Tedeschi, R. and Alma, A. (2007) 'Presence of Scaphoideus titanus on American grapevine in woodlands, and infection with "flavescence dorée" phytoplasmas'.

Martini, M., Botti, S., Marcone, C., Marzachõá, C., *et al.* (2002) 'Genetic variability among ¯avescence doreÂe phytoplasmas from different origins in Italy and France'.

Maixner, M. (2005) ‘Risks posed by the spread and dissemination of grapevine pathogens and their vectors’, in *International symposium–Introduction and Spread of Invasive Species*. Citeseer, pp. 9–11.

Malembic-Maher, S. *et al.* (2011) ‘Genetic diversity of European phytoplasmas of the 16SrV taxonomic group and proposal of “Candidatus Phytoplasma rubi”’, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(9), pp. 2129–2134. Available at: https://doi.org/10.1099/ijs.0.025411-0.

Malembic-Maher, S. *et al.* (2020) ‘When a Palearctic bacterium meets a Nearctic insect vector: Genetic and ecological insights into the emergence of the grapevine Flavescence dorée epidemics in Europe’, *PLoS pathogens*, 16(3), p. e1007967.

Malenovský, I. and Lauterer, P. (2010) ‘Additions to the fauna of planthoppers and leafhoppers (Hemiptera: Auchenorrhyncha) of the Czech Republic’, *Acta Musei Moraviae, Scientiae biologicae*, 95(1), pp. 49–122.

Marcone, C. *et al.* (1999) ‘Chromosome Sizes of Phytoplasmas Composing Major Phylogenetic Groups and Subgroups’, *Phytopathology®*, 89(9), pp. 805–810. Available at: https://doi.org/10.1094/PHYTO.1999.89.9.805.

Martini, M. *et al.* (1999) ‘Identification and epidemic distribution of two flavescence dorée—related phytoplasmas in Veneto (Italy)’, *Plant disease*, 83(10), pp. 925–930.

Martini, M. *et al.* (2002) ‘Genetic variability among Flavescence dorée phytoplasmas from different origins in Italy and France’, *Molecular and Cellular probes*, 16(3), pp. 197–208.

Matta Alberto *et al.* (2017) *Fondamenti di patologia vegetale*. Pàtron.

Mazzoni, V. (2005) ‘Contribution to the knowledge of the Auchenorrhyncha (Hemiptera Fulgoromorpha and Cicadomorpha) of Tuscany (Italy)’, *Redia*, 88, pp. 85–102.

Mazzoni, V., Alma, A. and Lucchi, A. (2005) ‘Cicaline dell’agrecosistema vigneto e loro interazioni con la vite nella trasmissione di fitoplasmi’, in *Flavescenza dorata e altri giallumi della vite in Toscana e in Italia.* ARSIA, pp. 55–74.

Mehle, N. *et al.* (2010) ‘The first detection of a phytoplasma from the 16SrV (Elm yellows) group in the mosaic leafhopper Orientus ishidae’, *New Disease Reports*, 22(11), pp. 2044–0588.2010.

Mifsud, D. *et al.* (2010) *Other Hemiptera Sternorrhyncha (Aleyrodidae, Phylloxeroidea, and Psylloidea) and Hemiptera Auchenorrhyncha*. Pensoft Publishers.

Musetti Rita and Pagliari Laura (2019) *Phytoplasmas*.

Namba, S. *et al.* (1993) 'Detection and differentiation of plant-pathogenic mycoplasmalike organisms using polymerase chain reaction', *Phytopathology*, 83(7), pp. 786–791.

Navrátil, M. *et al.* (2009) 'Phytoplasma associated with witches'-broom disease of Ulmus minor Mill. in the Czech Republic: electron microscopy and molecular characterization', *Folia Microbiologica*, 54(1), pp. 37–42.

Nickel, H. (2010) 'First addendum to the Leafhoppers and Planthoppers of Germany:(Hemiptera: Auchenorrhyncha)', *Cicadina*, 11, pp. 107–122.

Krsti´c, O., *et al.* (2022) 'Genetic Diversity of Flavescence Dorée Phytoplasmas in Vineyards of Serbia: From the Widespread Occurrence of Autochthonous Map-M51 to the Emergence of Endemic Map-FD2 (Vectotype II) and New Map-FD3 (Vectotype III) Epidemic Genotypes'.

Oshima, K. *et al.* (2007) 'Presence of two glycolytic gene clusters in a severe pathogenic line of Candidatus Phytoplasma asteris', *Molecular Plant Pathology*, 8(4), pp. 481–489. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00408.x.

Osler, R. (1996) *Le più importanti malattie da fitoplasmi nel Friuli-Venezia Giulia: atlante*. Ente regionale per la promozione e lo sviluppo dell'agricoltura del Friuli ….

Osler, R., Fortusini, A. and Belli, G. (1975) 'Presence of Scaphoideus littoralis in vineyards of Oltrepo pavese affected by a disease of the type" flavescence doree".', *Informatore Fitopatologico*, 25(6), pp. 13–15.

Pagliarani, C. *et al.* (2020) 'Molecular memory of Flavescence dorée phytoplasma in recovering grapevines', *Horticulture Research*, 7(1), p. 126. Available at: https://doi.org/10.1038/s41438-020-00348-3.

Pagliari, L. *et al.* (2017) 'Filamentous sieve element proteins are able to limit phloem mass flow, but not phytoplasma spread', *Journal of Experimental Botany*, 68(13), pp. 3673–3688. Available at: https://doi.org/10.1093/jxb/erx199.

Papura, D. *et al.* (2009) 'Comparing the spatial genetic structures of the Flavescence dorée phytoplasma and its leafhopper vector Scaphoideus titanus', *Infection, Genetics and Evolution*, 9(5), pp. 867–876. Available at: https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.05.009.

Pavan, F. *et al.* (1997) 'Ruolo del vivaismo nella diffusione della flavescenza dorata', *Informatore Agrario*, 53, pp. 69–72.

Pavan, F., Mori, N., Bigot, G., *et al.* (2012a) 'Border effect in spatial distribution of Flavescence dorée affected grapevines and outside source of Scaphoideus titanus vectors', *Bull. Insectol*, 65(2), pp. 281–290.

Pavan, F., Mori, N., Bigot, G., *et al.* (2012b) 'Border effect in spatial distribution of Flavescence dorée affected grapevines and outside source of Scaphoideus titanus vectors', *Bull. Insectol*, 65(2), pp. 281–290.

Pavan, F., Mori, N., Bressan, S., *et al.* (2012) 'Control strategies for grapevine phytoplasma diseases: factors influencing the profitability of replacing symptomatic plants', *Phytopathologia Mediterranea*, pp. 11–22.

Prezelj, N. *et al.* (2013) 'Spatiotemporal distribution of flavescence dorée phytoplasma in grapevine', *Plant Pathology*, 62(4), pp. 760–766.

Quanqing, G. and Fujiang, W. (2006) 'Predicting the potential geographical distribution of flavescence dorée and its vector {\sl Scaphoideus titanus} Ball in China using DIVA--GIS', *Acta Phytophylacica Sinica*, 33(1), pp. 51–58.

Rahola, J. *et al.* (1997) 'La flavescencia dorada en los viñedos del Alt Empordà (Girona)', *Bol. San. Veg. Plagas*, 23(3), pp. 403–416.

Riolo, P. *et al.* (2014) 'Population dynamics and dispersal of Scaphoideus titanus from recently recorded infested areas in central-eastern Italy', *Bulletin of Insectology*, 67(1), pp. 99–107.

Ripamonti, M. *et al.* (2020) 'Recovery from Grapevine Flavescence Dorée in Areas of High Infection Pressure', *Agronomy*, 10(10), p. 1479. Available at: https://doi.org/10.3390/agronomy10101479.

Saccardo, F. *et al.* (2012) 'Genome drafts of four phytoplasma strains of the ribosomal group 16SrIII', *Microbiology*. Microbiology Society. Available at: https://doi.org/10.1099/mic.0.061432-0.

Schaper, U. and Seemüller, E. (1984) ‘Recolonization of the stem of apple proliferation and pear decline-diseased trees by the causal organisms in spring/Wiederbesiedlung des Sprosses von triebsuchtkranken Apfelbäumen und verfallskranken Birnbäumen durch die Erreger im Frühjahr’, *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz/Journal of Plant Diseases and Protection*, pp. 608–613.

Schneider, B. and Gibb, K.S. (1997) ‘Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas’, *Microbiology*, 143(10), pp. 3381–3389.

Schvester, D., Carle, P. and 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, pp. 1021–1024.

Schvester, D., Moutous, G. and Carle, P. (1962) ‘Scaphoideus littoralis Ball (Homopt. Jassidae) cicadelle vectrice de la Flavescence dorée de la vigne’, *Rev. Zool. Agric. Appl*, 61, pp. 118–131.

Seemüller, E. *et al.* (1998) ‘Current status of molecular classification of the phytoplasmas’, *Journal of plant pathology*, pp. 3–26.

Seljak, G. (2004) ‘Contribution to the knowledge of planthoppers and leafhoppers of Slovenia (Hemiptera: Auchenorrhyncha)’, *Acta Entomologica Slovenica*, 12(2), pp. 189–216.

Smart, C.D. *et al.* (1996) ‘Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region’, *Applied and environmental microbiology*, 62(8), pp. 2988–2993.

Tedeschi, R., Bosco, D. and Alma, A. (2002) ‘Population Dynamics of <I>Cacopsylla melanoneura</I> (Homoptera: Psyllidae), a Vector of Apple Proliferation Phytoplasma in Northwestern Italy’, *Journal of Economic Entomology*, 95(3), pp. 544–551. Available at: https://doi.org/10.1603/0022-0493-95.3.544.

Tothova, M., Bokor, P. and Cagáň, Ľ. (2015) ‘The first detection of leafhopper Scaphoideus titanus Ball (Hemiptera, Cicadellidae) in Slovakia’, *Plant Protection Science*, 51(2), pp. 88–93.

Vannacci, G., Bianco, P.A, and Bonanomi, G., (2021) *patologia vegetale*.

Vidano, C. (1964) ‘Scoperta in Italia dello Scaphoideus littoralis Ball cicalina americana collegata alla “Flavescence dorée” della Vite’, *L’Italia agricola*, 101(10), pp. 1031–1049.

Webb, D.R. *et al.* (1999) 'Oligonucleotides as Hybridization Probes to Localize Phytoplasmas in Host Plants and Insect Vectors', *Phytopathology®*, 89(10), pp. 894–901. Available at: https://doi.org/10.1094/PHYTO.1999.89.10.894.

Weintraub, P.G. and Beanland, L. (2006) 'Insect vectors of phytoplasmas', *Annual Review of Entomology*, 51(1), pp. 91–111. Available at: https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151039.

Weisburg, W.G. *et al.* (1989) 'A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification', *Journal of Bacteriology*, 171(12), pp. 6455–6467. Available at: https://doi.org/10.1128/jb.171.12.6455-6467.1989.

8. APPENDICE

Tabella 8: Dati relativi alle analisi molecolari effettuate sui campioni di vite e piante spontanee raccolti e analizzati nei mesi di giugno e settembre 2022, con annessa provenienza.

ID	Specie di pianta	Provenienza	Ct/Tm	Cluster /genotipo
1	*Corylus avellana* L.	Borgo America (San Pietro di Felletto)		
2	*Corylus avellana* L.	Borgo America (San Pietro di Felletto)		
3	*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)	Borgo America (San Pietro di Felletto)	27,57 / 78	***map*-FD2/ M54**
4	*Corylus avellana* L.	Borgo America (San Pietro di Felletto)		
5	*Corylus avellana* L.	Borgo America (San Pietro di Felletto)		
6	*Corylus avellana* L.	Borgo America (San Pietro di Felletto)		
7	*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)	Borgo America (San Pietro di Felletto)	26,16 / 78,20	***map*-FD3/ M3**
8	*Corylus avellana* L.	Borgo America (San Pietro di Felletto)		
9	*Corylus avellana* L.	Borgo America (San Pietro di Felletto)		
10	*Corylus avellana* L.	Borgo America (San Pietro di Felletto)		
11	*Corylus avellana* L.	Borgo America (San Pietro di Felletto)		
12	*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)	Borgo America (San Pietro di Felletto)	23 / 78,60	***map*-FD2/ M54**
13	*Corylus avellana* L.	Borgo America (San Pietro di Felletto)		
14	*Corylus avellana* L.	Borgo America (San Pietro di Felletto)		
15	*Corylus avellana* L.	Borgo America (San Pietro di Felletto)		
16	*Corylus avellana* L.	Borgo America (San Pietro di Felletto)		
17	*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)	Borgo America (San Pietro di Felletto)	25,21 / 78	***map*-FD3/ M3**
18	*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)	Borgo America (San Pietro di Felletto)	25,68 / 78	***map*-FD2/ M54**
19	*Corylus avellana* L.	Borgo America (San Pietro di Felletto)		
20	*Corylus avellana* L.	Borgo America (San Pietro di Felletto)		

21	*Corylus avellana* L.	Borgo Doimo (San Pietro di Felletto)		
22	*Corylus avellana* L.	Borgo Doimo (San Pietro di Felletto)		
23	*Corylus avellana* L.	Borgo Doimo (San Pietro di Felletto)		
24	*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)	Borgo Doimo (San Pietro di Felletto)	27,53 / 78	***map*-FD3/ M3**
25	*Corylus avellana* L.	Borgo Doimo (San Pietro di Felletto)		
26	*Corylus avellana* L.	Borgo Doimo (San Pietro di Felletto)		
27	*Corylus avellana* L.	Borgo Doimo (San Pietro di Felletto)		
28	*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)	Borgo Doimo (San Pietro di Felletto)	25,68 / 78,20	***map*-FD3/ M3**
29	*Corylus avellana* L.	Borgo Doimo (San Pietro di Felletto)		
30	*Corylus avellana* L.	Borgo Doimo (San Pietro di Felletto)		
31	*Corylus avellana* L.	Borgo Doimo (San Pietro di Felletto)		
32	*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)	Borgo Doimo (San Pietro di Felletto)	28,47/ 78	***map*-FD2/ M54**
33	*Corylus avellana* L.	Borgo Doimo (San Pietro di Felletto)		
34	*Corylus avellana* L.	Azienda vinicola Prosecco La Svolta (San Petro di Felletto)	37,84 /78	
35	*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)	Azienda vinicola Prosecco La Svolta (San Petro di Felletto)	24,68/ 78	***map*-FD2/ M54**
36	*Corylus avellana* L.	Azienda vinicola Prosecco La Svolta (San Petro di Felletto)		
37	*Corylus avellana* L.	Azienda vinicola Prosecco La Svolta (San Petro di Felletto)		
38	*Corylus avellana* L.	Azienda vinicola Prosecco La Svolta (San Petro di Felletto)		
39	*Vitis sp.* (vite americana inselvatichita)	Azienda vinicola Prosecco La Svolta (San Petro di Felletto)		
40	*Prunus*	Azienda vinicola Prosecco La Svolta (San Petro di Felletto)		

41	*Corylus avellana* L.	Azienda vinicola Prosecco La Svolta (San Petro di Felletto)		
42	*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)	Azienda vinicola Prosecco La Svolta (San Petro di Felletto)	24,50 / 77,8	***map*-FD2/ M54**
43	*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)	Azienda vinicola Prosecco La Svolta (San Petro di Felletto)	24,31 / 78,20	***map*-FD2/ M54**
44	*Corylus avellana* L.	Azienda vinicola Prosecco La Svolta (San Petro di Felletto)	38,04 / 78,20	
45	*Corylus avellana* L.	Azienda vinicola Prosecco La Svolta (San Petro di Felletto)		
46	*Corylus avellana* L.	Area 4 vigneto bosco (Valdobbiadene)		
47	*Corylus avellana* L.	Area 4 vigneto bosco (Valdobbiadene)		
48	*Corylus avellana* L.	Area 4 vigneto bosco (Valdobbiadene)		
49	*Corylus avellana* L.	Area 4 vigneto bosco (Valdobbiadene)		
50	*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)	Area 4 vigneto bosco (Valdobbiadene)	24,89 / 78	***map*-FD3/ M3**
51	*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)	Area 4 vigneto bosco (Valdobbiadene)	30/ 79,40	
52	*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)	Area 4 vigneto bosco (Valdobbiadene)	22,30 / 78,20	***map*-FD3/ M3**
53	*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)	Area 4 vigneto bosco (Valdobbiadene)	26,36/ 79,40	
54	*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)	Area 4 vigneto giardino Adami (Valdobbiadene)	34,40/ 79,60	
55	*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)	Area 4 vigneto giardino Adami (Valdobbiadene)	23 / 78,20	***map*-FD2/ M54**
56	*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)	Area 4 vigneto giardino Adami (Valdobbiadene)	33,87/ 79,60	
56 b	*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)	Area 4 vigneto giardino Adami (Valdobbiadene)	29,74/ 79,60	
57	*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)	Area 4 vigneto giardino Adami (Valdobbiadene)	30,06/ 79,80	
58	*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)	Area 4 vigneto giardino Adami (Valdobbiadene)		
59	*Vitis sp.* (vite americana inselvatichita)	Borgo America (San Pietro di Felletto)		
60	*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)	Vigneto Pierfrancesco Adami (Valdobbiadene)	35,63/ 79,80	

61	*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)	Vigneto Pierfrancesco Adami (Valdobbiadene)	27,36/ 79,60	
62	*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)	Vigneto Pierfrancesco Adami (Valdobbiadene)	28/ 79,60	
63	*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)	Vigneto Pierfrancesco Adami (Valdobbiadene)	27,06/ 79,80	
64	*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)	Vigneto Ruggeri (Valdobbiadene)	28,33/ 79,80	
65	*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)	Vigneto Ruggeri (Valdobbiadene)	32,51/ 79,80	
66	*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)	Vigneto Ruggeri (Valdobbiadene)	25,25/ 79,60	
67	*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)	Vigneto Ruggeri (Valdobbiadene)		
68	*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)	Area 4 vigneto giardino Adami (Valdobbiadene)	28,61/ 79,60	
74	*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)	Azienda Clodel (San Pietro di Felletto)	25,48 / 78,60	***map*-FD2/ M54**
75	*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)	Azienda Clodel (San Pietro di Felletto)	24,42 / 78	***map*-FD2/ M54**
76	*Vitis sp.* (vite americana inselvatichita)	Azienda Clodel (San Pietro di Felletto)		
77	*Corylus avellana* L.	Azienda Clodel (San Pietro di Felletto)		
78	*Corylus avellana* L.	Azienda Clodel (San Pietro di Felletto)		
84	*Vitis vinifera* L. (cv. Glera) sono	Borgo America (San Pietro di Felletto)	25,80 / 78,20	***map*-FD2/ M54**
85	*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)	Borgo America (San Pietro di Felletto)	24,66 / 78,20	***map*-FD2/ M54**
92	*Alnus glutinosa*	Santa Margherita del Gruagno (UD)	19,64 / 78,20	**M50**
93	*Alnus glutinosa*	Santa Margherita del Gruagno (UD)	17,96 / 78,20	**M53**
94	*Alnus glutinosa*	Santa Margherita del Gruagno (UD)	19,13 / 78,60	**M13**
95	*Alnus glutinosa*	Santa Margherita del Gruagno (UD)	22,24 / 78,20	**M44**
96	*Alnus glutinosa*	Santa Margherita del Gruagno (UD)	20,20 / 78,20	**M13**
97	*Corylus avellana* L.	Santa Margherita del Gruagno (UD)	19,93 / 78,20	**M48**
98	*Corylus avellana* L.	Santa Margherita del Gruagno (UD)	32,30 / 78,20	
99	*Alnus glutinosa*	Santa Margherita del Gruagno (UD)	30 / 78,20	**M143**
100	*Corylus avellana* L.	Santa Margherita del Gruagno (UD)	31,27 / 78,20	**M44**

101	*Alnus glutinosa*	Santa Margherita del Grugnano (UD)	18,43/ 78,20	**M50**

Tabella 9: Dati relativi alle analisi molecolari effettuate sui campioni di insetti, raccolti nei mesi di giugno e luglio 2022, con annessa provenienza.

ID	**Specie di insetto**	**Provenienza/ Pianta**	**Ct/Tm**	**Cluster /genotipo**
1A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Corylus avellana* L.		
2A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Corylus avellana* L.		
3A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Corylus avellana* L.		
4A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Corylus avellana* L.		
5A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Corylus avellana* L.		
6A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Corylus avellana* L.		
7A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Corylus avellana* L.		
8A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Corylus avellana* L.		
9A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Corylus avellana* L.		
10A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Corylus avellana* L.		
11A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Corylus avellana* L.		
12A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Corylus avellana* L.		
13A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Corylus avellana* L.		
14A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Corylus avellana* L.		
15A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Corylus avellana* L.		
16A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Corylus avellana* L.		
17A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Corylus avellana* L.		
18A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Corylus avellana* L.		
19A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Corylus avellana* L.		

20A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Corylus avellana* L.		
21A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Corylus avellana* L.		
22A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Corylus avellana* L.		
23A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Corylus avellana* L.		
24A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Corylus avellana* L.		
25A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Corylus avellana* L.		
26A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Corylus avellana* L.		
27A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Corylus avellana* L.		
28A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Corylus avellana* L.		
29A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Corylus avellana* L.		
30A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Corylus avellana* L.		
31A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Corylus avellana* L.		
32A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Corylus avellana* L.		
33A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Corylus avellana* L.		
34A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Corylus avellana* L.		
35A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Corylus avellana* L.		
36A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Corylus avellana* L.		
37A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Corylus avellana* L.		
38A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Corylus avellana* L.		
39A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Corylus avellana* L.		
40A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Corylus avellana* L.		
41A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Corylus avellana* L.		
42A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Corylus avellana* L.		
43A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Corylus avellana* L.		

44A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Corylus avellana* L.		
45A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Corylus avellana* L.		
46A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Corylus avellana* L.		
47A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Corylus avellana* L.		
48A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Corylus avellana* L.		
49A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Corylus avellana* L.		
50A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Corylus avellana* L.		
51A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Corylus avellana* L.		
52A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Vitis vinifera* L. (cv. Glera)		
53A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Vitis vinifera* L. (cv. Glera)	34,94 / 78,20	
54A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Vitis vinifera* L. (cv. Glera)		
55A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Vitis vinifera* L. (cv. Glera)		
56A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Vitis vinifera* L. (cv. Glera)		
57A	*Jikradia olitoria*	Collalbrigo/*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)		
58A	*Jikradia olitoria*	Collalbrigo/*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)		
59A	*Jikradia olitoria*	Collalbrigo/*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)		
60A	*Jikradia olitoria*	Collalbrigo/*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)		
61A	*Jikradia olitoria*	Collalbrigo/*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)		
62A	*Jikradia olitoria*	Collalbrigo/*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)	34,35 / 78,20	
63A	*Jikradia olitoria*	Collalbrigo/*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)	36,15 / 78,20	
64A	*Jikradia olitoria*	Collalbrigo/*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)		
65A	*Jikradia olitoria*	Collalbrigo/*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)		
66A	*Jikradia olitoria*	Collalbrigo/*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)	30,31 / 78,20	
67A	*Jikradia olitoria*	Collalbrigo/*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)	33,74 / 78,20	

68A	*Jikradia olitoria*	Collalbrigo/*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)		
69A	*Jikradia olitoria*	Collalbrigo/*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)		
70A	*Jikradia olitoria*	Collalbrigo/*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)		
71A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Vitis vinifera* L. (cv. Glera)		
72A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Vitis vinifera* L. (cv. Glera)		
73A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Vitis vinifera* L. (cv. Glera)		
74A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Vitis vinifera* L. (cv. Glera)		
75A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Vitis vinifera* L. (cv. Glera)		
76A	*Orientus ishidae*	San Pietro di Felletto/ *Vitis vinifera* L. (cv. Glera)		
77A	*Jikradia olitoria*	Collalbrigo/*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)		
78A	*Jikradia olitoria*	Collalbrigo/*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)		
79A	*Jikradia olitoria*	Collalbrigo/*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)		
80A	*Jikradia olitoria*	Collalbrigo/*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)		
81A	*Jikradia olitoria*	Collalbrigo/*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)		
82A	*Jikradia olitoria*	Collalbrigo/*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)		
83A	*Jikradia olitoria*	Collalbrigo/*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)		
84A	*Jikradia olitoria*	Collalbrigo/*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)		
85A	*Jikradia olitoria*	Collalbrigo/*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)		
92A	*Jikradia olitoria*	Collalbrigo/*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)		
93A	*Jikradia olitoria*	Collalbrigo/*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)		
94A	*Jikradia olitoria*	Collalbrigo/*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)	35,76/ 78,20	
95A	*Jikradia olitoria*	Collalbrigo/*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)		
96A	*Jikradia olitoria*	Collalbrigo/*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)		
97A	*Jikradia olitoria*	Collalbrigo/*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)		

98A	*Jikradia olitoria*	Collalbrigo/*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)		
99A	*Jikradia olitoria*	Collalbrigo/*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)		
100A	*Jikradia olitoria*	Collalbrigo/*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)	34,91 / 78,20	
101A	*Jikradia olitoria*	Collalbrigo/*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)	34,85 / 78,20	
102A	*Jikradia olitoria*	Collalbrigo/*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)		
103A	*Jikradia olitoria*	Collalbrigo/*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)	35,61 / 78,20	
104A	*Jikradia olitoria*	Collalbrigo/*Vitis vinifera* L. (cv. Glera)		