

DOCUMENTI TECNICI UFFICIALI

Documento n. 44

SCHEDA TECNICA PER

INDAGINI SULL'ORGANISMO NOCIVO

**Flavescenza dorata (Grapevine flavescence dorée
phytoplasma) e *Scaphoideus titanus* Ball**

REV.	DESCRIZIONE E REVISIONE	COMPILAZIONE	APPROVAZIONE	DATA DI ADOZIONE	FIRMA
0	Revisione 0	GDL per il Programma di indagine sugli organismi nocivi delle piante	CFN 26-27/07/2023	27/07/2023	

Indice

Premessa	3
1. Informazioni Generali	3
1.1 Tassonomia e inquadramento	3
1.2 Normativa vigente	4
1.3 Distribuzione geografica	5
1.3.1 Presenza in Italia	6
2. Aspetti biologici dell'organismo	6
2.1 Morfologia e biologia dell'organismo nocivo	6
2.2 Sintomi/segni	7
2.3 Piante ospiti (ospiti principali/minori)	8
3. Siti di maggiore rischio	8
3.1 Aree a rischio/ Risk areas	8
4. Indagine/survey	9
4.1 Osservazione visiva	10
4.2 Campionamento	13
4.3 Indagine con trappole	14
5. Diagnosi	16
5.1 Campione/Matrice	16
5.2 Test per l'identificazione	16
Bibliografia	18

Premessa

La scheda tecnica di indagine per un organismo nocivo o gruppo di organismi nocivi affini riporta le informazioni sull'inquadramento tassonomico e normativo, la diffusione a livello mondiale e nazionale, gli aspetti di carattere generale sul ciclo biologico, le istruzioni su come condurre e quando rilievi visivi e campionamenti sulla base di ampie illustrazioni dei sintomi o danni causati sulle specie ospiti e, nel caso di insetti, le modalità di indagine attraverso l'uso di trappole. La scheda riporta anche le informazioni sulle metodologie diagnostiche per l'identificazione del singolo organismo nocivo o gruppo affine.

La scheda tecnica di indagine tiene conto dei **regolamenti comunitari** e/o **decreti nazionali**, dell'esperienza dei Servizi Fitosanitari Regionali (SFR) nel controllo del territorio, degli standard internazionali (**EPPO**, ISPM etc..). La scheda è uno strumento funzionale al riconoscimento dell'organismo nocivo in dotazione al personale tecnico impegnato nell'esecuzione delle indagini (Ispettori fitosanitari, Agenti fitosanitari, Assistenti fitosanitari, Tecnici rilevatori)

La scheda tecnica di indagine viene elaborata da un gruppo di lavoro di esperti (**SFR** e **CREA-DC**) per l'organismo nocivo considerato, con l'eventuale coinvolgimento di altri esperti di Enti di Ricerca e Università. La scheda di indagine viene approvata dal **Comitato Fitosanitario Nazionale** (CFN) e revisionata periodicamente per gli aggiornamenti normativi, distribuzione geografica e procedure di indagine.

1. Informazioni Generali

1.1 Tassonomia e inquadramento

Nome scientifico: Grapevine flavescence dorée phytoplasma

Vettore: *Scaphoideus titanus* Ball, 1932.

Nome comune: fitoplasma della Flavescenza dorata della vite.

Codice EPPO: PHYP64

Vettore: SCAPLI

Posizione tassonomica:

Phylum: Tenericutes

Classe: Mollicutes

Ordine: Acholeplasmatales

Famiglia: Acholeplasmataceae

Genere: Phytoplasma

Specie: Grapevine flavescence dorée phytoplasma

Categorizzazione

EU: I fitoplasmi associati alla Flavescenza dorata della vite rientrano tra gli organismi nocivi da quarantena, elencati nell'Allegato II, Parte B del Regolamento di esecuzione (UE) 2019/2072. Ad essi si applicano le prescrizioni di cui all'allegato VIII del Reg (UE) 2019/2072 e sue successive modifiche e integrazioni.

EPPO: EPPO List A2

1.2 Normativa vigente

EUROPEA:

- **Regolamento (UE) 2016/2031** del Parlamento europeo e del Consiglio, del 26 ottobre 2016, relativo alle misure di protezione contro gli organismi nocivi per le piante, che modifica i regolamenti (UE) n. 228/2013, (UE) n. 652/2014 e (UE) n. 1143/2014 del Parlamento europeo e del Consiglio e abroga le direttive 69/464/CEE, 74/647/CEE, 93/85/CEE, 98/57/CE, 2000/29/CE, 2006/91/CE e 2007/33/CE del Consiglio;
- **Regolamento (UE) 2017/625** del Parlamento europeo e del Consiglio, del 15 marzo 2017, relativo ai controlli ufficiali e alle altre attività ufficiali effettuati per garantire l'applicazione della legislazione sugli alimenti e sui mangimi, delle norme sulla salute e sul benessere degli animali, sulla sanità delle piante nonché sui prodotti fitosanitari, recante modifica dei regolamenti (CE) n. 999/2001, (CE) n. 396/2005, (CE) n. 1069/2009, (CE) n. 1107/2009, (UE) n. 1151/2012, (UE) n. 652/2014, (UE) 2016/429 e (UE) 2016/2031 del Parlamento europeo e del Consiglio, dei regolamenti (CE) n. 1/2005 e (CE) n. 1099/2009 del Consiglio e delle direttive 98/58/CE, 1999/74/CE, 2007/43/CE, 2008/119/CE e 2008/120/CE del Consiglio, e che abroga i regolamenti (CE) n. 854/2004 e (CE) n. 882/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio, le direttive 89/608/CEE, 89/662/CEE, 90/425/CEE, 91/496/CEE, 96/23/CE, 96/93/CE e 97/78/CE del Consiglio e la decisione 92/438/CEE del Consiglio (regolamento sui controlli ufficiali);
- **Regolamento delegato (UE) 2019/1702** della Commissione del 10 agosto 2019 che integra il regolamento (UE) 2016/2031 del Parlamento europeo e del Consiglio stabilendo l'elenco degli organismi nocivi prioritari;
- **Regolamento di esecuzione (UE) 2019/2072** della Commissione che stabilisce condizioni uniformi per l'attuazione del regolamento (UE) 2016/2031 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda le misure di protezione contro gli organismi nocivi per le piante e che abroga il regolamento (CE) n. 690/2008 della Commissione e modifica il regolamento di esecuzione (UE) 2018/2019 della Commissione e ss.mm.ii.;

- **Regolamento d'Esecuzione (UE) 2022/1630** della Commissione del 21 settembre 2022, che stabilisce misure per il contenimento di Grapevine flavescence dorée phytoplasma all'interno di determinate aree delimitate.

NAZIONALE:

- **DECRETO LEGISLATIVO 2 febbraio 2021, n. 19.** Norme per la protezione delle piante dagli organismi nocivi in attuazione dell'articolo 11 della legge 4 ottobre 2019, n. 117, per l'adeguamento della normativa nazionale alle disposizioni del regolamento (UE) 2016/2031 e del regolamento (UE) 2017/625, e s.m.i;
- **Ordinanza n. 4** del Direttore del Servizio fitosanitario centrale del 22 giugno 2023 prot. Masaf n. 326979, recante "Misure fitosanitarie d'emergenza per il contrasto di Grapevine flavescence dorée phytoplasma atte ad impedirne la diffusione nel territorio della Repubblica italiana", in corso di registrazione.

1.3 Distribuzione geografica

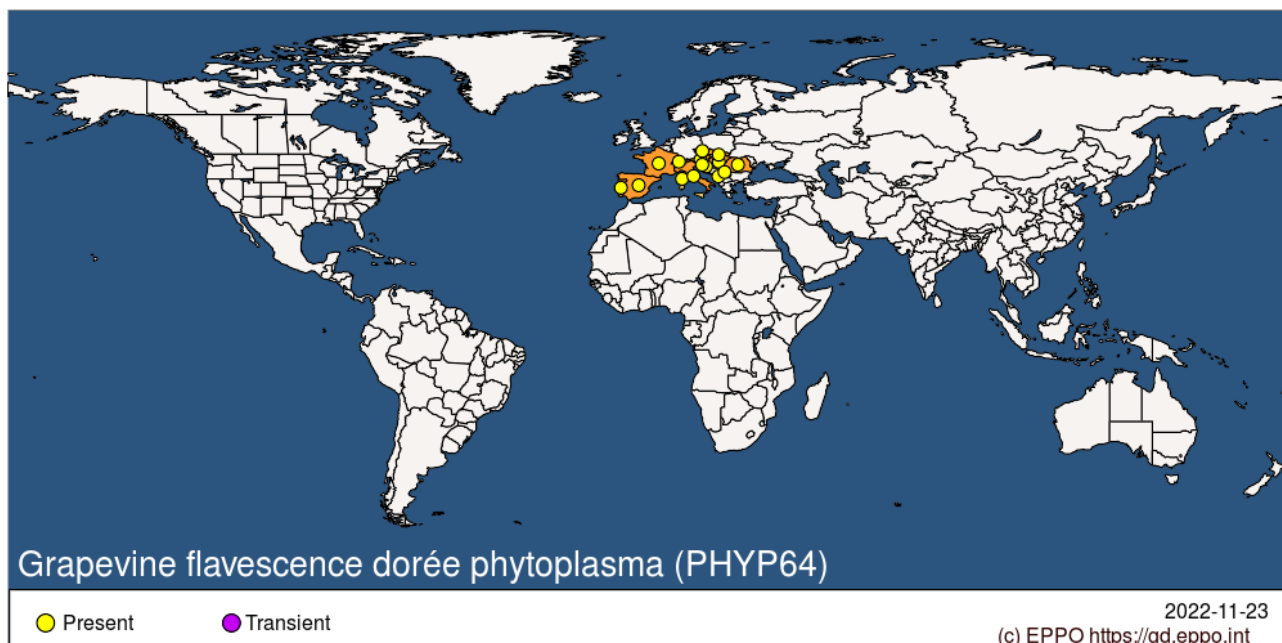
Africa: assente

America: assente

Asia: assente

Europa: Austria, Croazia, Repubblica Ceca, Francia, Germania, Ungheria, Italia, Montenegro, Portogallo, Romania, Serbia, Slovenia, Spagna e Svizzera.

Oceania: assente



1.3.1 Presenza in Italia:

FD è presente in tutte le aree viticole del centro nord Italia ed è stata segnalata nel 2011 sull'isola di Ischia, che rappresenta ad oggi il focolaio più a sud per l'Italia.

Scaphoideus titanus è presente soprattutto nel Nord e Centro Italia e più sporadicamente in alcune aree del Sud Italia, mentre è considerato assente in Sardegna e Sicilia. In particolare, le segnalazioni occorse negli anni riguardano le seguenti regioni: Abruzzo, Basilicata, Campania, Emilia-Romagna, Friuli-Venezia Giulia, Liguria, Lazio, Lombardia, Marche, Piemonte, Puglia, Toscana, Trentino-Alto Adige, Umbria, Valle d'Aosta e Veneto (Chuche and Thiéry, 2014, Digiario et al., 2014).

2. Aspetti biologici dell'organismo

2.1 Morfologia e biologia dell'organismo nocivo

I fitoplasmi associati alla Flavescenza dorata (FDp) appartengono al gruppo ribosomico 16SrV sottogruppo C e D. Sono trasmessi in maniera persistente propagativa principalmente dalla cicalina neartica *S. titanus* Ball (Hemiptera: Cicadellidae). Il vettore acquisisce FDp nutrendosi a livello del floema delle foglie di vite infette e li trasmette a nuove piante ospiti dopo un periodo di latenza di 4-5 settimane. Di norma l'acquisizione avviene da parte delle ninfe (stadi giovanili di 3° - 5° età) mentre l'inoculazione è prerogativa degli adulti, poiché il tempo di latenza fa sì che quando il fitoplasma è trasmissibile l'insetto abbia ormai completato la metamorfosi. Solo l'adulto è in grado di spostarsi in volo da pianta a pianta. Anche gli adulti possono comunque acquisire FDp, e la loro efficienza di acquisizione aumenta con l'avanzamento della stagione estiva. Inoltre, è stato osservato che il periodo di latenza negli adulti si può ridurre a due sole settimane in condizioni di laboratorio (Alma et al., 2018). L'infettività è conservata per il resto della vita del vettore e non viene persa con le mute. La trasmissione transovarica di FDp in *S. titanus* ad oggi non è stata accertata.

S. titanus è una specie monovoltina in grado di compiere il proprio ciclo vitale interamente a carico della vite (*Vitis* spp.) su cui l'insetto si nutre e riproduce. Le **uova** (1.5 mm) sono deposte tra agosto e ottobre nella corteccia dei tessuti lignificati prevalentemente di due o più anni e si schiudono a partire da metà maggio dell'anno successivo. Lo sviluppo postembrionale di *S. titanus* passa attraverso **cinque età giovanili** (1.8-5.2 mm), due di neanide e tre di ninfa. Le neanidi sono traslucide, con una colorazione che tende al bianco e che poi vira al giallo chiaro nelle ninfe di prima età e al giallo paglierino in quelle di seconda e terza età. Sull'addome di queste ultime compaiono anche delle bande brune. Le forme giovanili sono visibili da metà maggio fino ad agosto, principalmente sulla pagina inferiore delle foglie di vite e occasionalmente su piante erbacee presenti nell'interfilare del vigneto. Gli **adulti** di *S. titanus* (maschi: 4.8–5 mm; femmine: 5.5–5.8 mm), caratterizzati da pronunciata proterandria, cominciano a comparire tra fine giugno e inizio luglio e

possono essere presenti fino a inizio novembre, con picchi di densità di popolazione tra luglio e agosto. Gli adulti e le forme giovanili si nutrono soprattutto a livello delle nervature centrali delle foglie e sui germogli di vite. Occasionalmente possono alimentarsi anche a spese di piante presenti lungo l'interfilare del vigneto (Trivellone *et al.*, 2013; Gelmetti *et al.*, 2018).

Grazie alla monofagia su *Vitis* e alla propria competenza di trasmissione, *S. titanus* riveste di gran lunga il ruolo principale nella trasmissione di FDp e quindi nella diffusione della malattia in campo. Tuttavia, altre specie di emittenti sono state segnalate come vettori occasionali di FDp. *Dictyophara europaea* è una specie da tempo nota per la possibilità di trasmettere FDp da *Clematis vitalba* a vite (Filippin *et al.*, 2009). *Orientalus ishidae* è un insetto polifago che vive soprattutto su salice e nocciolo dai quali può acquisire FDp; inoltre è stata accertata, per ora in condizioni sperimentali, la sua capacità di acquisire il fitoplasma da fava e trasmetterlo a vite (Lessio *et al.*, 2016). Recentemente è stata confermata la capacità di *O. ishidae* di ovideporre sulla vite e non si esclude quindi un suo ruolo nella trasmissione di FDp da vite a vite (Lessio *et al.*, 2019). Per altre specie, come *Phlogotettix cyclops*, *Allygus mixtus* e *A. modestus*, è stata comprovata la capacità di acquisire FDp da diversi ospiti, ma la loro capacità di trasmissione a vite è ancora sotto esame (Reisenzein e Strauss, 2019; Malembic-Maher *et al.*, 2020). Il ruolo di queste specie nell'epidemiologia di FD è comunque da considerarsi trascurabile, vista la loro scarsa preferenza a nutrirsi su vite. *S. titanus* viene pertanto indicato come il vettore principale di FDp e si ritiene per il momento sia l'unica specie da sottoporre a monitoraggio.

2.2 Sintomi/segni

I sintomi di FD non sono distinguibili da quelli causati su vite da altri fitoplasmi, collettivamente riportati sotto il nome di giallumi della vite (GY – *Grapevine Yellows*) e, in particolare, da quelli causati da 'Candidatus *Phytoplasma solani*' (gruppo 16SrXII-A) agente del Legno nero. I sintomi sui tralci sono generalmente i primi che si osservano, subito dopo la ripresa vegetativa. In particolare, essi mostrano internodi corti e a zig-zag, appaiono gommosi e restano non lignificati fino alla fine della stagione vegetativa, risultando di conseguenza più suscettibili alla morte per il freddo invernale. I tralci possono, inoltre, presentare pustole scure oleose e in alcuni casi può manifestarsi necrosi delle gemme apicali. Le piante gravemente malate possono mostrare un forte declino, avendo solo uno o pochi tralci ancora vitali. Le infiorescenze possono appassire e cadere, di norma dopo la fioritura, se i sintomi compaiono a fine primavera-inizio estate. Con l'avanzare della stagione i sintomi diventano più tipici e più facilmente riconoscibili: le foglie tendono ad assumere, sulla lamina e sulle nervature principali, una colorazione rossa nei vitigni a bacca rossa oppure gialla in quelli a bacca bianca. Queste alterazioni cromatiche a volte coinvolgono solo settori della lamina fogliare, a partire dalle nervature verso le aree internervali. Le foglie sono spesso, ma non sempre, di consistenza

cartacea al tatto, fragili e arrotolate verso il basso con una forma triangolare. Nelle infezioni tardive, infine, i grappoli possono avvizzire o presentare bacche immature e amare.

I sintomi possono manifestarsi in modo settoriale, pertanto ci possono essere piante con solo pochi tralci infetti, soprattutto nel caso di varietà poco sensibili. Sulle varietà di vite ibride i sintomi sono perlopiù riconducibili a quelli osservati su vite europea; talvolta, tuttavia, si può osservare ingiallimento fogliare anche nelle varietà a bacca rossa e l'assenza del ripiegamento dei margini fogliari. In alcuni casi, inoltre, l'espressione dei sintomi è molto contenuta. La stessa situazione può verificarsi nelle varietà impiegate come portainnesto, e ciò comporta una difficile identificazione delle viti infette, soprattutto nel caso di viti rinselvatichite. In generale, l'espressione dei sintomi è influenzata anche dalla diversa sensibilità varietale. Fra le varietà a larga diffusione quelle notoriamente più sensibili sono: Barbera, Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Chardonnay, Glera, Pinot bianco, Pinot grigio, Sangiovese, Pinot Noir (Borgo *et al.*, 2016).

I sintomi di giallumi si possono confondere con quelli di altre malattie (degenerazione infettiva, accartocciamento fogliare, escoriosi, in alcuni casi anche con il mal dell'esca o con marciumi radicali da *Armillaria mellea*), con quelli indotti da lesioni meccaniche alla base del tralcio, da ferite di nutrizione da parte della stictocéfala (*Stictopcephala bisonia*) o con fisiopatie (carenza di magnesio).

2.3 Piante ospiti (ospiti principali/minori)

Oltre alla vite, i fitoplasmi del sottogruppo 16SrV-C e -D sono stati segnalati anche in *Clematis vitalba*, *Ailanthus altissima*, *Alnus glutinosa*, *A. cordata*, *A. incana*, *Corylus avellana* e *Salix* sp. sempre in prossimità di vigneti infetti (EFSA, 2014; EFSA, 2020; Casati *et al.*, 2017).

3. Siti di maggiore rischio

3.1 Aree a rischio/ Risk areas

Considerato che l'avversità presenta carattere epidemico solo sulla coltura della vite e che il principale vettore *S. titanus* risulta monofago sul genere *Vitis*, i siti da prendere in considerazione prioritariamente per le attività di indagine sono:

- Vigneti, soprattutto quelli con varietà più suscettibili
- Campi di piante madri e barbatellai, comprese le barbatelle in vaso

I vigneti abbandonati o incolti e i ricacci di portainnesti rinselvatichiti giocano un importante ruolo come reservoir dell'insetto vettore e, potenzialmente, nella diffusione del fitoplasma. La loro presenza nelle vicinanze dei siti oggetto di indagine costituisce quindi un elemento da considerare nella pianificazione dell'indagine, e comunque possono essere presi in considerazione soprattutto per il monitoraggio del vettore.

I siti a maggiore rischio secondo la codifica Europhyt:

All'aperto:

- 1.2 frutteto/vigneto;
- 1.3 vivaio;
- 2.4. piante spontanee in zone diverse dalle zone di conservazione.

Al chiuso:

- 3.1 serra.

4. Indagine/survey

Modalità di indagine previste



- ✓ Osservazione visiva – Visual Inspection
- ✓ Campionamento – Sample Taking
- ✓ Indagine con trappole - Trapping

4.1 Osservazione visiva

Aspetti generali:

Piante: l'ispezione visiva permette di accertare la sola presenza generica di giallumi della vite causati da fitoplasmi. Per la diagnosi specifica di FDp è necessario ricorrere ad analisi di laboratorio. La ricerca dei sintomi va effettuata principalmente da inizio invaiatura alla post-raccolta. Tuttavia, può essere particolarmente utile prendere in considerazione anche il periodo a cavallo della fioritura.

Insetto vettore *S. titanus*: l'ispezione visiva è utile soprattutto per rilevare le forme giovanili presenti sui giovani germogli nonché sulle foglie basali di vite. Date le loro piccole dimensioni, le uova sono rilevabili solo mediante l'esame allo stereomicroscopio di campioni di ritidoma di vite, su legno di due o più anni. Gli adulti invece sono monitorati prevalentemente con trappole cromotattiche gialle durante il periodo di volo.

Sito di Indagine	Cosa guardare	Periodo di osservazione	Immagini
Pianta			
Vigneti; Campi di piante madri.	Germogli e/o infiorescenze	<u>Periodo primaverile</u> : indicativamente fine maggio - prima metà di giugno (<i>i primi sintomi soprattutto nelle varietà più sensibili possono essere riscontrati già a partire dal mese di maggio</i>).	
Vigneti; Campi di piante madri; Barbatellai	Foglie, tralci e grappoli.	<u>Periodo estivo-autunnale</u> : indicativamente metà luglio - primi di ottobre (<i>in questo periodo si manifestano i sintomi più caratteristici</i>).	



(fonte Paolo Culatti- SFR Lombardia)



A



B



C



D

Sintomi fogliari simili a quelli causati da FD, dovuti a da:

- A) agenti virali, es. GLRaV, GFLV;
- B) Lesioni meccaniche dei germogli/tralci o punture di insetti (ad es., stictocefala);
- C) carenza di magnesio;
- D) mal dell'esca.

http://www.tigulliovino.it/malattie/malattie_cicalina_bufalo.htm

<https://www.agraria.org/viticultura-enologia/alterazioni-abiotiche.htm>

<https://www.regione.vda.it/gestione/riviweb/templates/aspx/informatore.aspx?pkArt=172>

Insetto vettore

**Vigneti;
Campi di
piante
madri;
Barbatellai**

**Polloni,
Foglie basali**
(soprattutto
pagina
inferiore) e
germogli
originatisi dal
legno più
vecchio
(testa della
vite o cordoni
permanenti).

**Fine maggio -
fine giugno**
(*periodo in cui
gli stadi giovanili
sono presenti in
maggiore
quantità*).

*Le osservazioni
dovrebbero
essere condotte
preferibilmente
la mattina presto
quando le
temperature
sono più basse,
il fogliame non è
mosso e
l'insetto ha una
mobilità ridotta.*



Uovo di *S. titanus* nel
ritidoma di vite.

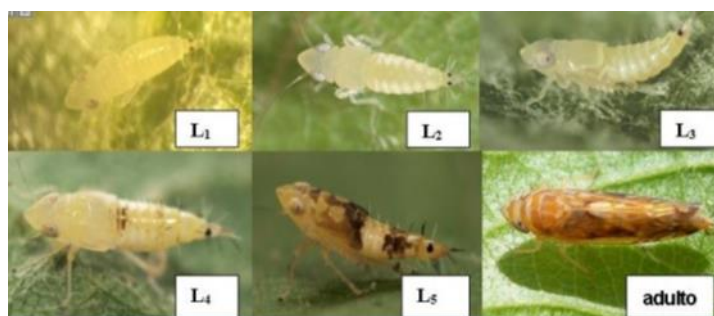
(fonte Bruno Bagnoli,
DIBAF-Università degli studi
della Toscana)



Neanide di prima età di *S. titanus* con il particolare delle
caratteristiche macchie nere
all'estremità dell'addome.

(fonte: Bruno Bagnoli, DIBAF-
Università degli studi della Toscana)






Stadi di sviluppo di *S. titanus* (<http://www.winetwork-data.eu/>)


4.2 Campionamento

Aspetti generali:

Campioni fogliari: le piante sono da ritenersi sintomatiche quando presentano sintomi da fitoplasmosi su almeno due dei tre organi principali (foglie, tralci, grappoli). I campioni devono essere raccolti indicativamente nel periodo compreso tra luglio e ottobre in base al decorso fenologico varietale e locale, prendendo foglie sintomatiche ma ancora in buone condizioni vegetative e di freschezza (assenza di aree necrotiche e sintomi indotti da altri patogeni). Da ogni pianta campionata vanno prelevate 10-20 foglie, in funzione delle loro dimensioni, raccolte dai tralci sintomatici.

Campioni dell'insetto vettore *S. titanus*: le forme giovanili possono essere raccolte su getti e foglie giovani prossime al ceppo, avvalendosi eventualmente di aspiratore entomologico; i campioni di adulti possono essere prelevati staccandoli dalle trappole cromotattiche adesive, con cui vengono catturati.

Sito di Indagine	Cosa prelevare	Periodo di Prelievo	Come conservare	Immagini
Vigneti; Campi di piante madri; Barbatellai	<u>Campioni fogliari</u> : solo foglie sintomatiche in buone condizioni vegetative e di freschezza	Luglio-ottobre	Una volta raccolti i campioni devono essere conservati in contenitori termici con accumulatori di freddo e così mantenuti anche durante la spedizione. I campioni vanno consegnati al laboratorio possibilmente entro 72 ore	 <p>(fonte Paolo Culatti- SFR Lombardia)</p>


			dal prelievo, mantenendoli in frigorifero a 4°C prima della spedizione.	
Vigneti; Campi di piante madri; Barbatellai	<p><u>Insetto vettore:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - forme giovanili (neanidi e ninfe) soprattutto da foglie basali e germogli di vite; - adulti da trappole cromotattiche gialle. 	<p>Maggio – luglio (forme giovanili) Luglio – ottobre (adulti)</p>	<p>Conservare gli individui di <i>S. titanus</i> ad almeno -20°C o, meglio, in etanolo assoluto per lunghi periodi.</p>	 <p style="text-align: center;">Adulti di <i>S. titanus</i> su trappola cromotropica.</p>

4.3 Indagine con trappole

Aspetti generali:

Le trappole cromotattiche gialle ad elevata adesività, nella forma rettangolare, sono da tempo considerate ottimi dispositivi per il rilevamento della popolazione adulta di *S. titanus* a livello della chioma. Le trappole consentono di intercettare gli individui in fase di volo, che è crepuscolare-notturno (tra il tardo pomeriggio e il mattino presto).

Le trappole cromotattiche una volta prelevate dal vigneto devono essere opportunamente avvolte con un film plastico sottile e trasparente e distintamente contrassegnate con dati specifici relativi al sito e al periodo di esposizione, per poi essere conservate in luogo fresco e asciutto o in congelatore per lunghi periodi.

Sito di indagine	Tipologia di trappola	Posizionamento trappola/Osservazione	Periodo di esposizione - frequenza consigliabile dei controlli	Immagini
Vigneti; Campi di piante madri; Barbatellai; ricacci di portainnesti rinselvatichiti	Trappole cromotattiche gialle ad elevata adesività	Posizionare le trappole verticalmente in corrispondenza della parte medio-alta della chioma, in modo che risultino al tempo stesso visibili e ombreggiate Osservare al microscopio gli individui adulti catturati, previa rimozione dalla superficie adesiva, per il rilevamento dei caratteri distintivi di <i>S. titanus</i> .	Gli adulti sono presenti solitamente da inizio luglio a fine ottobre. Tuttavia, per un monitoraggio più efficiente, si consiglia di posizionare le trappole in due turni successivi di 2 settimane ciascuno, in corrispondenza del picco del volo (indicativamente da metà luglio a metà agosto). Si consiglia di utilizzare da 2 a 6 trappole a ettaro, in funzione delle caratteristiche del vigneto e della sua gestione.	

5. Diagnosi

Protocolli ufficiali SFN:

- non disponibili

Standard di riferimento:

- PM 7/079 (2) Grapevine flavescence dorée phytoplasma

5.1 Campione/Matrice

Da ogni campione prelevare circa 0,5-1 g di nervature fogliari su cui eseguire l'estrazione del DNA. Nel caso non sia possibile procedere immediatamente all'estrazione conservare le nervature a temperature inferiori a -20°C.

Per l'estrazione del DNA da matrice vegetale si consiglia l'utilizzo di metodi validati quali quelli descritti nello standard EPPO PM7/79 (2) e relativo *Corrigendum* basati sull'impiego del buffer CTAB o di biglie magnetiche. In alternativa è possibile l'utilizzo di altri metodi di estrazione anche basati sull'impiego di kit commerciali che, tuttavia, dovranno essere preventivamente validati all'interno del laboratorio.

La diagnosi di FD nell'insetto vettore è possibile. Anche se tutti gli individui di *S. titanus* sono potenzialmente infettivi e quindi utilizzabili per la diagnosi di FD, vi è una maggior probabilità di rilevare la presenza del fitoplasma negli adulti raccolti a stagione inoltrata.

Non vi sono protocolli validati per la diagnosi di FD nei campioni di insetti vettori. Lo Standard EPPO PM 7/079 (2) suggerisce di applicare il protocollo di estrazione del DNA da insetto descritto in Marzachi *et al.* (1998) con le modifiche successivamente apportate da Trivellone *et al.* (2005).

5.2 Test per l'identificazione

Metodi di prova validati basati sulle tecniche sopra elencate, sono descritti nello Standard EPPO PM7/79 (2). Tali metodi includono:

- LAMP (Kogovšek *et al.*, 2015) - Appendix 2;
- PCR diretta e nested specifica per il gruppo ribosomico 16SrV - Appendix 3;
- Real-time PCR (Hren *et al.*, 2007) - Appendix 4;
- Multiplex real-time PCR (Pelletier *et al.*, 2009) - Appendix 5;
- Triplex real-time (Taq-Man®) PCR sviluppata su sequenze del gene *rp14* gene (IPADLAB) - Appendix 6.

I saggi LAMP (Appendix 2), PCR convenzionale e nested (Appendix 3) e Multiplex real-time PCR (Appendix 5) possono essere utilizzati anche per la diagnosi di FD nell'insetto vettore *S. titanus*.

Identificazione specifica di fitoplasmi agenti della flavescenza dorata

Tutti i metodi di prova elencati al precedente paragrafo consentono la diagnosi generica di fitoplasmi appartenenti al gruppo ribosomico 16SrV, a cui i fitoplasmi agenti di FD appartengono. Laddove si renda necessaria una identificazione specifica del fitoplasma della Flavescenza dorata *sensu stricto* occorre eseguire ulteriori analisi di laboratorio, che includono:

- sequenziamento dei prodotti di amplificazione ottenuti in PCR diretta/nested con primers specifici del tratto genomico *secY-map* (Arnaud *et al.*, 2007);
- analisi RFLP dei prodotti di amplificazione ottenuti in PCR diretta/nested con primers specifici del tratto genomico 16S-regione spaziatrice (Martini *et al.*, 1999).

Identificazione specifica di *S. titanus*

Non esistono protocolli ufficiali per l'identificazione morfologica di *S. titanus*. L'identificazione su base morfologica di individui adulti di *S. titanus* può avvenire avvalendosi della descrizione fatta da Della Giustina (1989) e Della Giustina *et al.* (1992), nonché delle chiavi tassonomiche contenute in Nielson (1979) e Ossiannilsson (1983), oppure consultando la guida interattiva per l'identificazione dei cicadellidi appartenenti alla sottofamiglia Deltocephalinae al seguente link: [31 - An Interactive Key to Tribes of Deltocephalinae \(speciesfile.org\)](#) (Zanhiser, 2015). Si ricordano inoltre alcuni caratteri distintivi di *S. titanus* facilmente osservabili, come le due macchie nere romboidali poste simmetricamente all'estremità posteriore dell'addome delle forme giovanili e le bande trasversali di colore marrone al vertice del capo degli adulti (3-4 nella femmina e 2-3 nel maschio). Inoltre, la tendenza delle forme giovanili di *S. titanus* a compiere dei salti se disturbate ne facilita la distinzione rispetto alle forme giovanili di altre cicaline presenti comunemente in vigneto, come *Empoasca vitis*, *Zygina rhamnii*, *Erasmoneura vulnerata* e *Metcalfa pruinosa*, che si muovono camminando a zig-zag.

L'identificazione molecolare di *S. titanus* avviene amplificando (mediante PCR convenzionale) regioni note del gene Cytochrome c oxidase I (COX1) con conseguente sequenziamento Sanger delle regioni di DNA amplificate e confronto con le sequenze di riferimento depositate nel database BOLDSYSTEMS (<http://www.boldsystems.org/http://www.boldsystems.org/>; accession numbers: CNCHG910-12.COI-5P, CNCHG912-12.COI-5P, CNCHG913-12.COI-5P, CNCHG914-12.COI-5P, CNCHG915-12.COI-5P). Un protocollo di DNA barcoding basato sul gene COX1 è descritto in EPPO PM 7/129(2) (EPPO, 2021). L'identificazione su base molecolare può essere effettuata su tutti gli stadi di sviluppo di *S. titanus*.

Bibliografia

- Alma A., Lessio F., Gonella E., Picciau L., Mandrioli M., Tota F., 2018. New insights in phytoplasma-vector interaction: acquisition and inoculation of Flavescence dorée phytoplasma by *Scaphoideus titanus* adults in a short window of time. *Annals of Applied Biology*, 173: 55–62.
- Arnaud G., Malembic-Maher S., Salar P., Bonnet P., Maixner M., Marcone C., Boudon-Padieu E., and Foissac X., 2007. 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*, 2007, Vol. 73, No. 12, p. 4001–4010.
- Borgo M. e Moretti G. 2016. *Avversità della vite – Volume II: Atlante malattie su vitigni* – Gianni Sartori Editore. ISBN: 978-88-992870-8-5
- Casati P., Jermini M., Quaglino F., Corbani G., Schaerer S., Passera A., Bianco P. A., Rigamonti I. E., 2017. New insights on Flavescence dorée phytoplasma ecology in the vineyard agroecosystem in southern Switzerland. *Annals of Applied Biology*, 171(1): 37–51.
- Chuche J., Thiéry D., 2014. Biology and ecology of the Flavescence dorée vector *Scaphoideus titanus*: a review. *Agronomy for Sustainable Development*, 34(2): 381–403.
- Della Giustina W., 1989. Homoptères Cicadellidae, Volume 3, Compléments Faune de France, 73. Fed. Fr. Soc. Sc. nat.-Inra, 350 pp.
- Della Giustina W., Hogrel R., Della Giustina M., 1992. Description des différents stades larvaires de *Scaphoideus titanus* Ball (Homoptera, Cicadellidae). *Bull. Soc. ent. Fr.*, 97(3): 269-276.
- Digiario M., Elbeaino T., Valentini F., Cornara D., Percoco A., Guarino A., Porcelli F., 2014. First record in Apulia of *Scaphoideus titanus*, the vector of Flavescence dorée. *Journal of Plant Pathology*, 96(2): 439.
- EFSA Panel on Plant Health, 2014. Scientific Opinion on pest categorisation of Grapevine Flavescence dorée. *EFSA Journal*, 12(10): 3851.
- EFSA 2020. Pest survey card on flavescence dorée phytoplasma and its vector *Scaphoideus titanus*. EFSA supporting publication 2020: EN-1909, 36 pp.
- EPPO PM7/079(2) Grapevine flavescence dorée phytoplasma, 2016. *EPPO Bulletin*, 46(1): 78–93.
- EPPO PM 7/129(2) DNA barcoding as an identification tool for a number of regulated pests, 2021. *EPPO Bulletin*, 51(1): 100–143.
- Filippin L., Jović J., Cvrković T., Forte V., Clair D., Toševski I., Boudon-Padieu E., Borgo M., Angelini E., 2009. 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: 826–837.

- Gelmetti A., Cainelli R., Fellin F., Ghidoni F., Matté B., Mattedi F., Margoni M., Michelotti F., Patton A., Penner F., Bottura M., 2018. *Scaphoideus titanus* su vite, la situazione in Trentino. L'Informatore agrario, 75(26): 58-60.
- Kogovšek P., Hodgetts J., Hall J., Prezelj N., Nikolic P., Mehle N., Lenarcic R., Rotter A., Dickinson M., Boonham N., Dermastia M., Ravnikara M., 2015. LAMP assay and rapid sample preparation method for on-site detection of flavescence dorée phytoplasma in grapevine. Plant Pathology, 64: 286–296.
- Hren M., Boben J., Rotter A., Kralj P., Gruden K., Ravnikar M., 2007. Real-time PCR detection systems for Flavescence dorée and Bois noir phytoplasma in grapevine: a comparison with the conventional PCR detection system and their application in diagnostics. Plant Pathology, 56: 785–796.
- Lessio F., Bocca F., 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, 112(6): 2558–2564.
- Lessio, F., Picciau L., Gonella E., Mandrioli M., Tota F., Alma A., 2016. The mosaic leafhopper *Orientus ishidae*: host plants, spatial distribution, infectivity, and transmission of 16SrV phytoplasmas to vines. Bulletin of Insectology, 69: 277–289.
- Malembic-Maher S., Desqué D., Khalil D., Salar P., Bergey B., Danet J-L., Duret S., Dubrana-Ourabah M-P., Beven L., Ember I., Acs Z., Della Bartola M., Materazzi A., Filippin L., Krnjajic S., Krstić O., Toševski I., Lang F., Jarausch B., Kölber M., Jović J., Angelini E., Arricau-Bouvery N., Maixner M., Foissac X., 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): e1007967.
- Martini M, Murari E, Mori N, Bertaccini A., 1999. Identification and Epidemic Distribution of Two Flavescence Dorée-Related Phytoplasmas in Veneto (Italy). Plant Dis. 1999 Oct; 83 (10): 925-930. doi: 10.1094/PDIS.1999.83.10.925. PMID: 30841074.
- Marzachi C., Veratti F., Bosco D., 1998. Direct PCR detection of phytoplasmas in experimentally infected insects. Annual Applied Biology, 133: 45–54.
- Nielson M.W., 1979. Taxonomic relationships of leafhopper vectors of plant pathogens. *Leafhoppers Vectors and Plant Disease Agents*, Maramorosch, K. and Harris, K.F., eds. Academic Press, New York: pp. 3-27.
- Ossiannilsson F., 1983. The Auchenorrhyncha (Homoptera) of Fennoscandia and Denmark. *Fauna Entomologica Scandinavica*, 7: pp. 594-979.

- Pelletier C., Salar P., Gillet J., Cloquemin G., Very P., Foissac X., Malembic-Maher S., 2009. Triplex real-time PCR assay for sensitive and simultaneous detection of grapevine phytoplasmas of the 16SrV and 16SrXII-A groups with an endogenous analytical control. *Vitis*, 48: 87–95.
- Reisenzein H., Strauss G., 2019. Sporadic outbreaks of ‘flavescence dorée’ in Austrian vineyards and the role of *Phlogottetix cyclops* as a potential vector. *Phytopathogenic Mollicutes*, 9: 61–62.
- Trivellone V., Pinzauti F., Bagnoli B., 2005. *Reptalus quinquecostatus* (Dufour) (Auchenorrhyncha: Cixiidae) as a possible vector of Stolbur-phytoplasma in a vineyard in Tuscany. *Redia*, 88: 103–108.
- Trivellone V., Jermini M., Linder C., Carà C., Delabays N., Baumgartner J., 2013. Rôle de la flore du vignoble sur la distribution de *Scaphoideus titanus*. *Revue suisse Viticulture, Arboriculture, Horticulture*, 45 (4): 222-228.
- Zahniser J. N., 2015. The leafhopper subfamily Deltocephalinae: an interactive key to Tribes of Deltocephalinae (zahniser.speciesfile.org).