

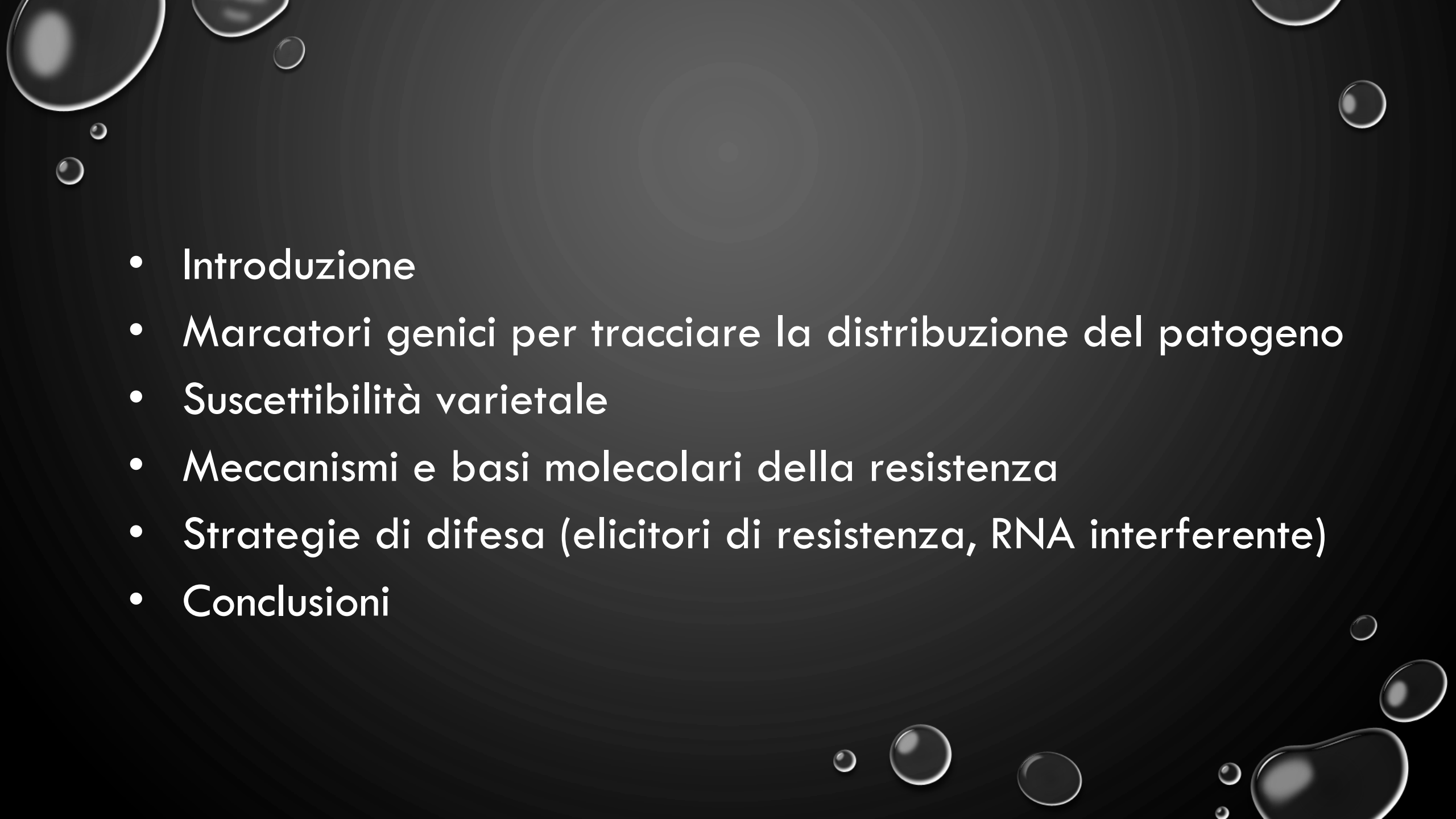


LA FLAVESCENZA DORATA DELLA VITE: RISVOLTI APPLICATIVI DELLA RICERCA SCIENTIFICA

SABRINA PALMANO

ISTITUTO PER LA PROTEZIONE SOSTENIBILE DELLE PIANTE

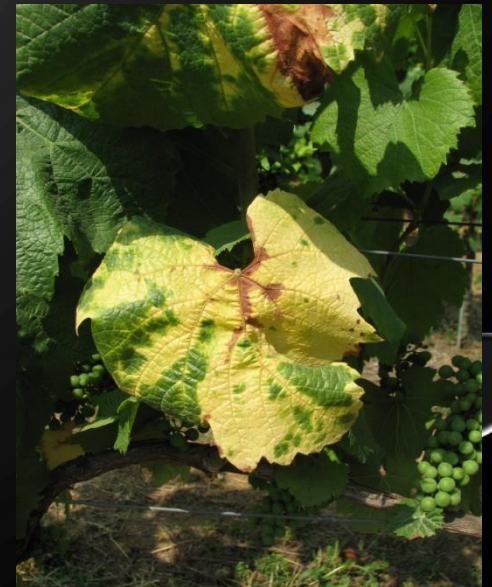
CNR

- 
- The background is a dark gray gradient with several realistic water droplets of various sizes. Some droplets are in the top left corner, some in the top right, and a cluster of larger droplets is in the bottom right corner. The droplets have highlights and shadows, giving them a three-dimensional appearance.
- Introduzione
 - Marcatori genici per tracciare la distribuzione del patogeno
 - Suscettibilità varietale
 - Meccanismi e basi molecolari della resistenza
 - Strategie di difesa (elicitori di resistenza, RNA interferente)
 - Conclusioni

• Introduzione

- Marcatori genici per tracciare la distribuzione del patogeno
- Suscettibilità varietale
- Meccanismi e basi molecolari della resistenza
- Strategie di difesa (elicitori di resistenza, RNA interferente)
- Conclusioni

- Malattia epidemica (A2 QUARANTINE PEST (ANNEX II B))
- Lotta obbligatoria al vettore *Scaphoideus titanus*



- ## Introduzione

- Marcatori genici per tracciare la distribuzione del patogeno
- Suscettibilità varietale
- Meccanismi e basi molecolari della resistenza
- Strategie di difesa (elicitori di resistenza, RNA interferente)
- Conclusioni

Classificazione tassonomica

Bacteria

Tenericutes

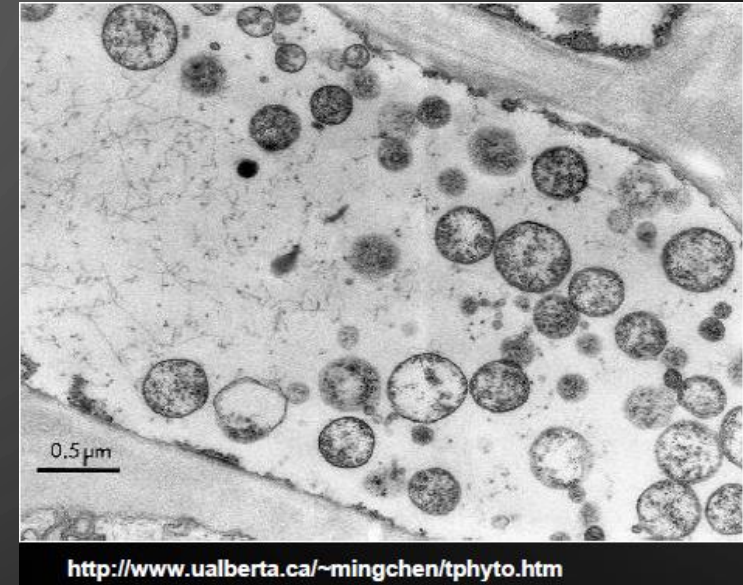
Mollicutes

Acholeplasmatales

Acholeplasmataceae

Candidatus Phytoplasma

- 16SrV (Elm yellow group)
- FDp



- Almeno due sottogruppi basati sulle differenze del gene ribosomale 16S rRNA: FD-C ed FD-D.

Introduzione

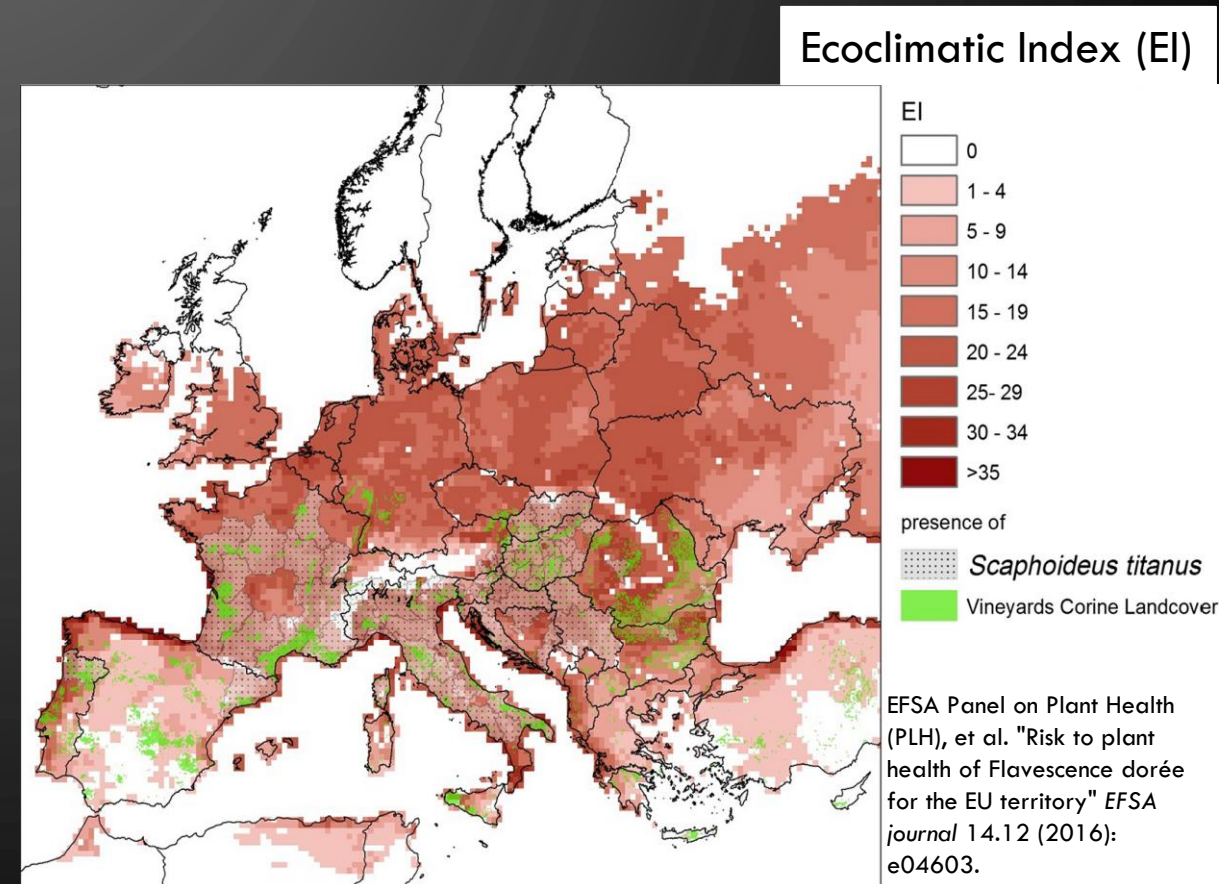
- Marcatori genici per tracciare la distribuzione del patogeno
- Suscettibilità varietale
- Meccanismi e basi molecolari della resistenza
- Strategie di difesa (elicitori di resistenza, RNA interferente)
- Conclusioni

Perché Flavescenza dorata è un problema per il futuro della viticoltura

Simulazione del potenziale di insediamento di *S. titanus* in Europa sulla base dei dati climatici 1999-2010

(EFSA, 2016)

- Regioni vitate del **nord ed est Europa** hanno condizioni climatiche **ottimali** per l'insediamento di *S. titanus*.
- L'insediamento del vettore nel nord e centro Europa è limitato dall'**attuale distribuzione di Vitis**, ma questa può variare in funzione del riscaldamento del clima.
- Altre zone vitate del **sud Europa** hanno condizioni climatiche che **non dovrebbero permettere l'insediamento del vettore**, benchè lo studio non abbia considerato la possibile mitigazione del clima dovuta all'eventuale irrigazione dei vigneti.
- In Italia la situazione è seria nel centro nord, ma può peggiorare anche al sud (Rizza et al., 2021).



Introduzione

- Marcatori genici per tracciare la distribuzione del patogeno
- Suscettibilità varietale
- Meccanismi e basi molecolari della resistenza
- Strategie di difesa (elicitori di resistenza, RNA interferente)
- Conclusioni

• Piante alternative ospiti del fitoplasma

Clematis



Filippin et al., 2009

Ontano



Casati et al., 2017

Ailanthus



Filippin et al., 2010

Nocciolo



Mehle et al., 2019

• Il fitoplasma è trasmesso principalmente da *Scaphoideus titanus* (Hemiptera, Cicadellidae)

(reviewed in Chuche and Thiéry, 2014)



- **Marcatori genici per tracciare la distribuzione del patogeno**

- Introduzione
- Suscettibilità varietale
- Meccanismi e basi molecolari della resistenza
- Strategie di difesa (elicitori di resistenza, RNA interferente)
- Conclusioni

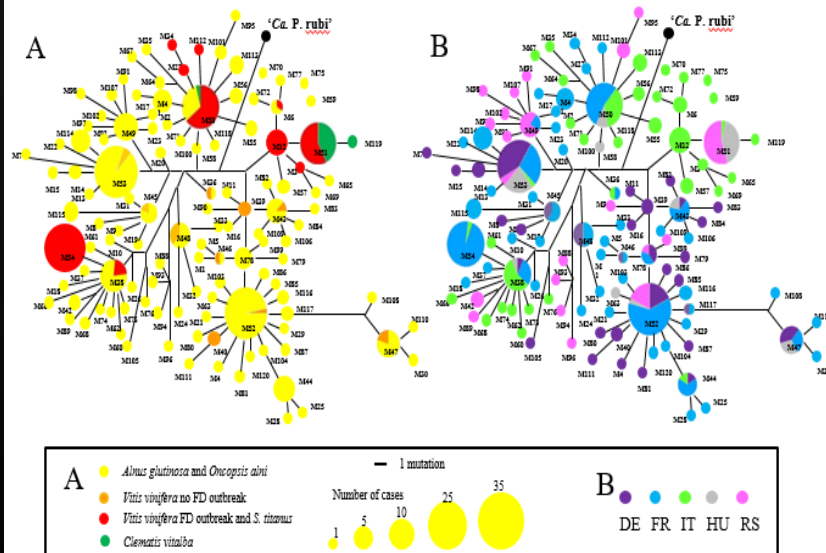
map, uvrB-degV

Map-FD1 Map-FD2 Map-FD3

- ✓ Diversi genotipi di FDp infettano vite, vettore, ospiti alternativi.
- ✓ Sviluppo di marcatori genetici efficienti per lo studio dell'epidemiologia di FD

Variabilità genetica di FD

(da X. Foissac, S. Malembic-Maher et al.)

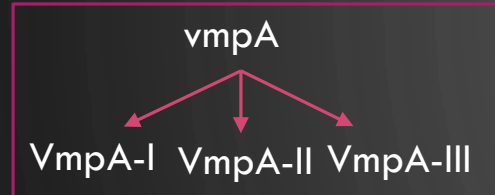


Marcatore adatto per evidenziare la variabilità genetica di FDp in diverse zone europee (Arnaud et al., 2007)

FDp è originario del vecchio mondo e pre-esistente all'introduzione del vettore nearctico *S. titanus*.

• Marcatori genici per tracciare la distribuzione del patogeno

- Suscettibilità varietale
- Meccanismi e basi molecolari della resistenza
- Strategie di difesa (elicitori di resistenza, RNA interferente)
- Conclusioni

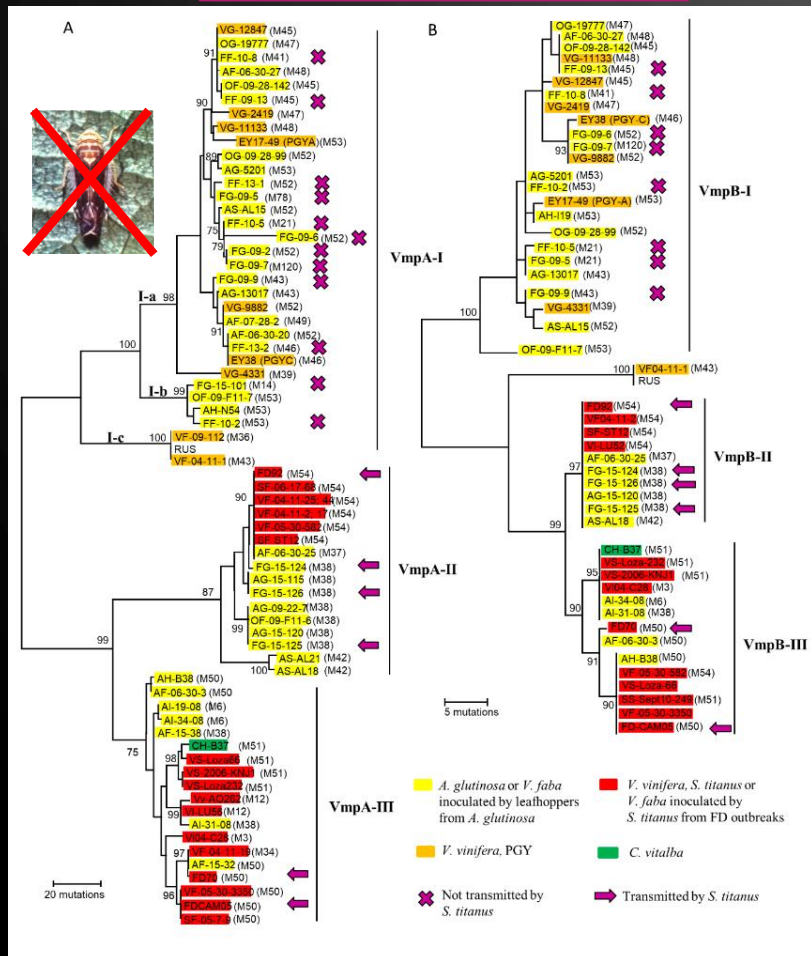


Vmp sono **proteine di membrana** che evidenziano la variabilità genetica di isolati di FDp da diverse zone europee.

Grande **variabilità genetica** di fitoplasmi del gruppo FD è riscontrabile in **vite coltivate**, **viti inselvatichite**, **Clematis**, ma soprattutto in **Alnus spp.** (Malembic-Maher et al., 2020).

VmpA funziona come una lectina, permette l'adesione di FDp alle cellule epiteliali del vettore (adesina, Arricau-Bouvery et al., 2018) ed attiva la colonizzazione delle cellule dell'ospite mediante endocitosi clatrina-dipendente (Arricau-Bouvery et al., 2023).

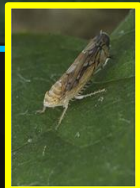
↓
Gli isolati di FDp che presentano la variante **VmpA-I** **NON** sono trasmessi da *S. titanus*.



- # Marcatori genici per tracciare la distribuzione del patogeno

- Introduzione
- Suscettibilità varietale
- Meccanismi e basi molecolari della resistenza
- Strategie di difesa (elicitori di resistenza, RNA interferente)
- Conclusioni

Sviluppo di marcatori genetici efficienti per lo studio dell'epidemiologia di FD **su piccola scala geografica**, per tracciare l'origine di nuovi focolai della malattia in vigneto e confermare il ruolo degli incolti di vite nelle reinfezioni dei vigneti.



IN: *V. vinifera*, *S. titanus*

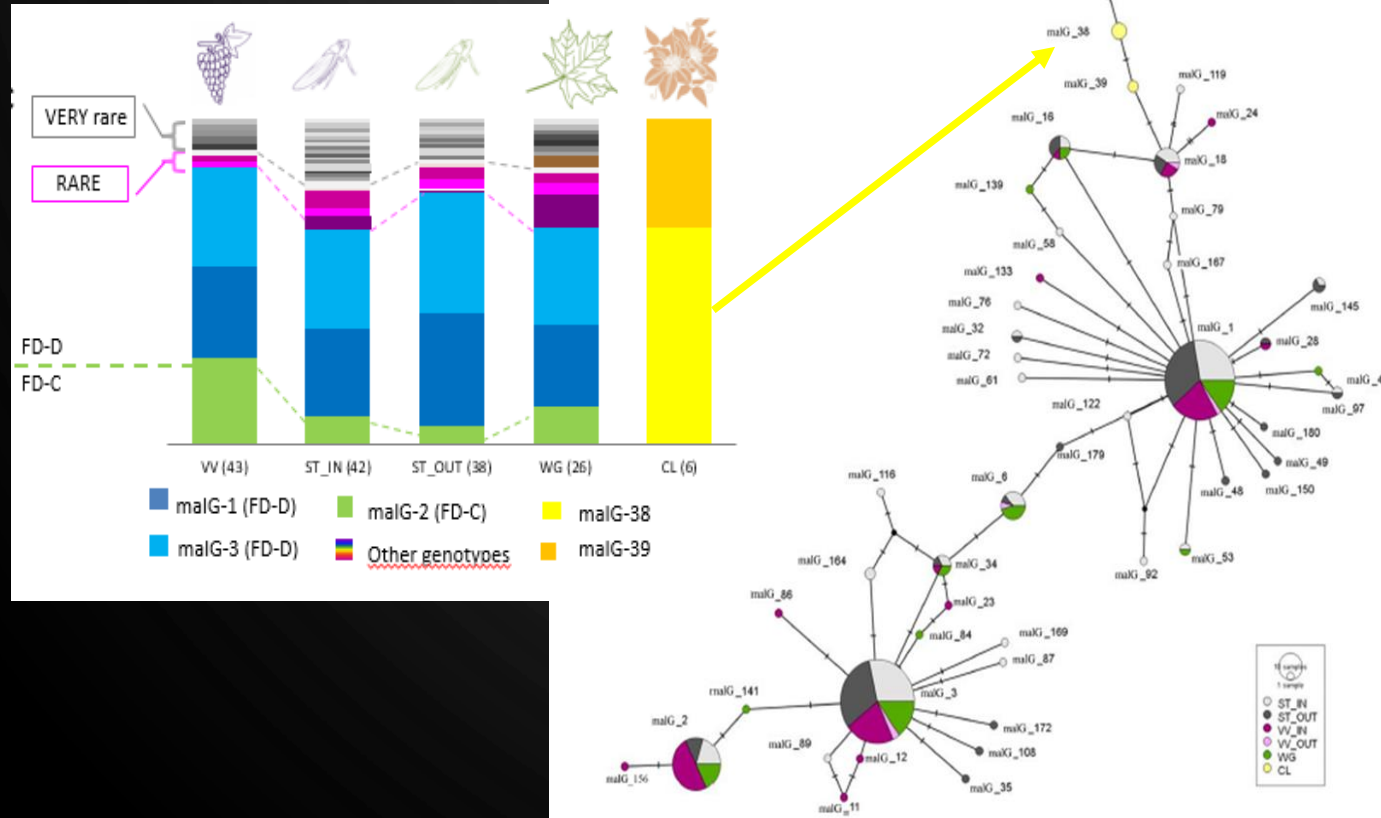
OUT: *V. vinifera*, *S. titanus*, viti abbandonate, viti selvatiche, *C. vitalba*

Marcatori genici per tracciare la distribuzione del patogeno

Suscettibilità varietale
Meccanismi e basi molecolari della resistenza
Strategie di difesa (elicitori di resistenza, RNA interferente)
Conclusioni

malG

50 *malG* genotypes



malG è un marcatore adatto per evidenziare la variabilità genetica di FDp su **scala geografica ridotta** (Rossi et al., 2019).

Gli isolati da *Clematis* non sembrano coinvolti nella diffusione primaria della malattia in vigneto.

Incolti abbandonati contenenti viti inselvatichite sono una **fonte continua di infezione** primaria in vigneto e rischiano di vanificare l'effetto dei trattamenti insetticidi.

- **Marcatori genici per tracciare la distribuzione del patogeno**

- Introduzione
- Suscettibilità varietale
- Meccanismi e basi molecolari della resistenza
- Strategie di difesa (elicitori di resistenza, RNA interferente)
- Conclusioni

Introduzione di FD in Piemonte (fine anni '90) e assenza di trattamenti insetticidi contro il vettore



prevalenza di infezioni secondarie con % di piante infette elevatissime ed espianto dei vigneti nei primi anni 2000



Lotta obbligatoria, drastica riduzione della popolazione di *S. titanus* in vigneto

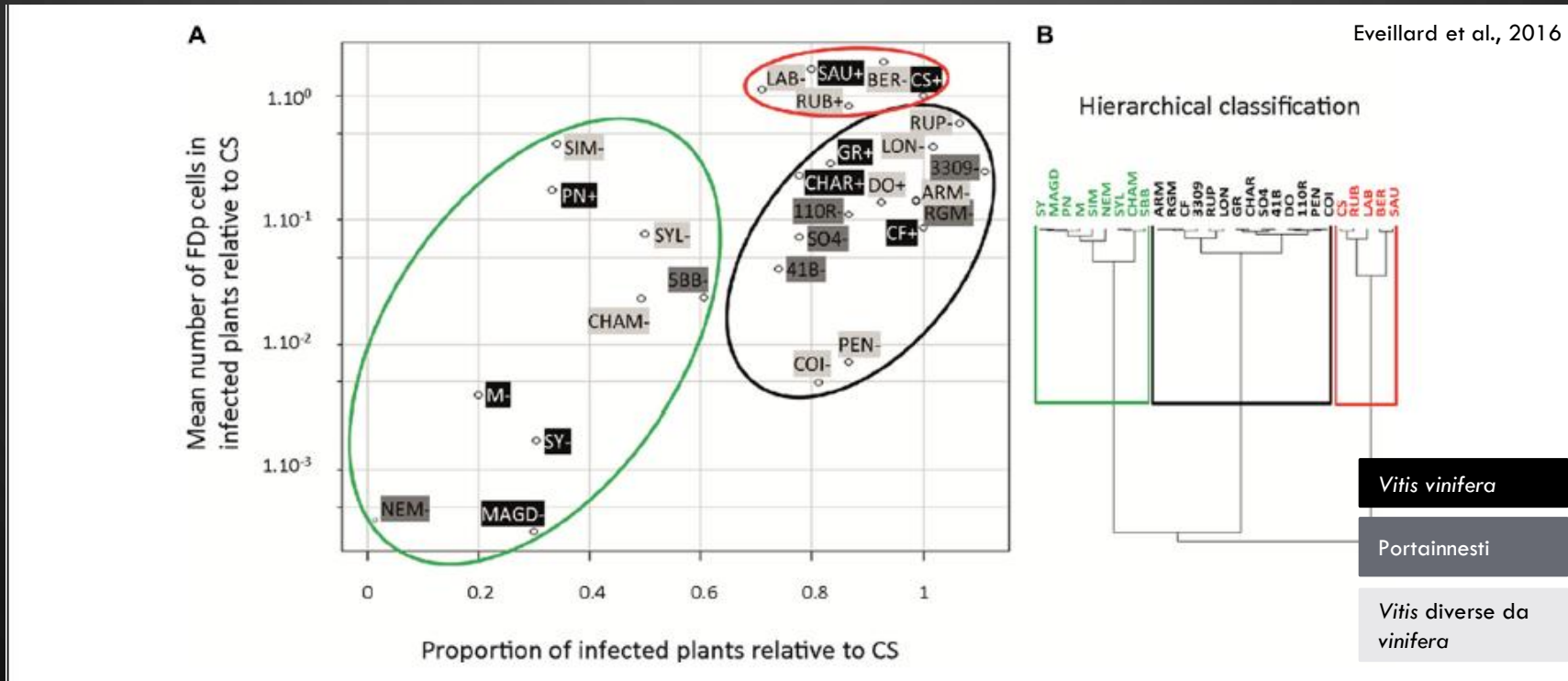


prevalenza di infezioni primarie con % di piante infette più contenute ma molto difficili da contrastare
Altri vettori?



- Introduzione
- Marcatori genici per tracciare la distribuzione del patogeno
- **Suscettibilità varietale**
- Meccanismi e basi molecolari della resistenza
- Strategie di difesa (elicitori di resistenza, RNA interferente)
- Conclusioni

Risposta di diverse varietà di *Vitis vinifera* al fitoplasma della Flavescenza dorata

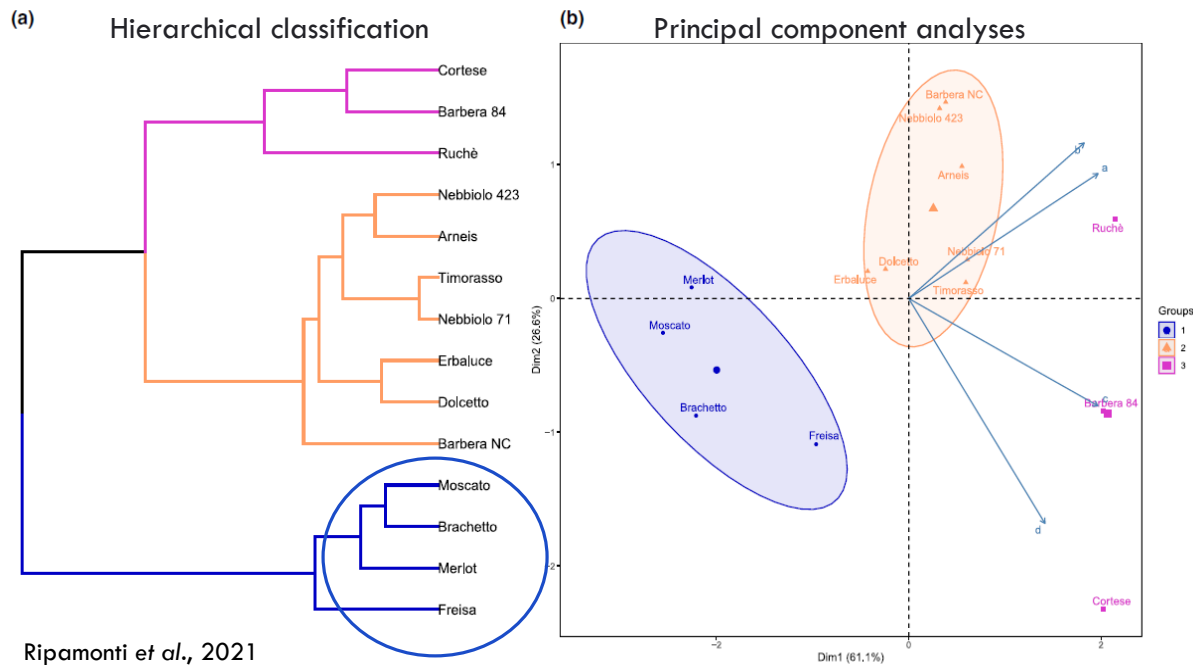


- Portainnesti sono mediamente suscettibili →
- Viti diverse da *vinifera* sono mediamente o molto suscettibili →
- Merlot si conferma come poco suscettibile →

- ★ Riserva di fitoplasma in vigneto
- ★ Riserva di fitoplasma esterna al vigneto
- ★ Quantificare la suscettibilità di varietà diverse

- Introduzione
- Marcatori genici per tracciare la distribuzione del patogeno
- **Suscettibilità varietale**
- Meccanismi e basi molecolari della resistenza
- Strategie di difesa (elicitori di resistenza, RNA interferente)
- Conclusioni

Risposta di diverse varietà di *Vitis vinifera* al fitoplasma della Flavescenza dorata



- Moscato, Brachetto e Freisa → poco suscettibili
- Nessuna varietà → completamente resistente
- Merlot → poco suscettibile

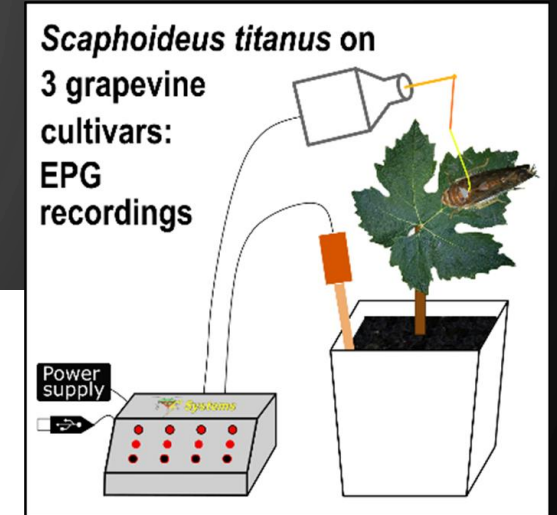
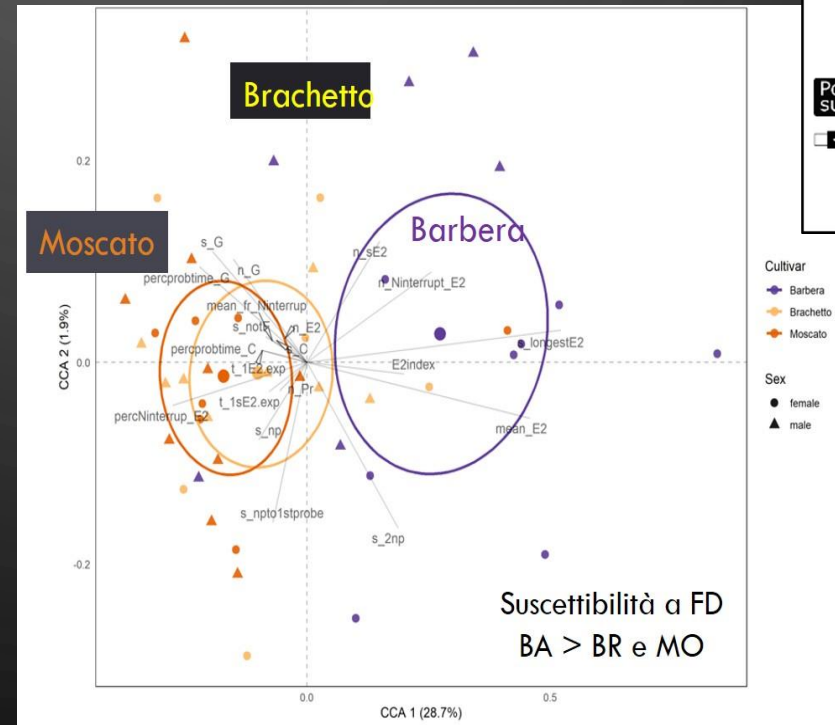
Questa diversa suscettibilità può essere determinata da un diverso comportamento del vettore sui diversi genotipi?

- Introduzione
- Marcatori genici per tracciare la distribuzione del patogeno
- **Suscettibilità varietale**
- Meccanismi e basi molecolari della resistenza
- Strategie di difesa (elicitori di resistenza, RNA interferente)
- Conclusioni

Risposta di *Scaphoideus titanus* a diverse varietà di *Vitis vinifera*

- L'analisi mediante Electro Penetration Graph (EPG) ha indicato che *S. titanus* si nutre diversamente sui tre genotipi.

- La differenza è dovuta a:
 - maggiore durata della **nutrizione floematica** su **Barbera** (Ripamonti *et al.*, 2022a).
 - **attività antibiotica e/o antixenotica** di **Moscato** nei confronti del vettore (Ripamonti *et al.*, 2022b).



- Introduzione
- Marcatori genici per tracciare la distribuzione del patogeno
- **Suscettibilità varietale**
- Meccanismi e basi molecolari della resistenza
- Strategie di difesa (elicitori di resistenza, RNA interferente)
- Conclusioni

● Possibile meccanismo di tolleranza di *Vitis vinifera* al fitoplasma della Flavescenza dorata



Tocai friulano (tollerante a FD)

Nella **varietà tollerante** i **sintomi** di FD restano **confinati** nella zona della loro comparsa originaria. **Il fitoplasma scompare dal floema secondario** durante la stagione vegetativa (Casarin et al., 2023).

Aree sintomatiche ed asintomatiche attivano **vie metaboliche di difesa diverse**.

Tolleranza potrebbe avvenire attraverso una **limitata a diffusione** del fitoplasma oltre il sito di inoculo (Casarin et al., 2023). Questo meccanismo potrebbe spiegare l'indicazione di rimuovere immediatamente le parti sintomatiche per bloccare l'ulteriore sviluppo dell'infezione in campo nelle zone dove la malattia è endemica.

Nessuna varietà di vite è risultata resistente alla FD, benchè alcune abbiano mostrato diversi gradi di suscettibilità.

- Introduzione
- Marcatori genici per tracciare la distribuzione del patogeno
- Suscettibilità varietale
- **Meccanismi e basi molecolari della resistenza**
- Strategie di difesa (elicitori di resistenza, RNA interferente)
- Conclusioni

Studi di trascrittomica della pianta infetta da fitoplasmi diversi, hanno suggerito alcuni potenziali meccanismi di azione coinvolti nella relazione tra la pianta ed il batterio (Rossi et al., 2019; Musetti et al., 2023).

Il fitoplasma produce **molecole effettrici** per garantire il successo dell'infezione dell'ospite. Questi possono avere effetti diversi spesso raggiunti tramite la manipolazione dei fattori di trascrizione della pianta e generano quindi dei fenotipi specifici (sintomi).

La pianta reagisce all'infezione e risponde con un profilo trascrizionale diverso rispetto alla pianta sana.

Individuare geni della pianta coinvolti nella risposta alla fitoplasmosi

Introduzione
 • Marcatore genici per tracciare la distribuzione del patogeno
 • Suscettibilità varietale

Meccanismi e basi molecolari della resistenza

• Strategie di difesa (elicitori di resistenza, RNA interferente)
 • Conclusioni

Arabidopsis thaliana come modello per comprendere le basi molecolari dell'interazione pianta-patogeno

Validazione in RT-Real Time PCR dei geni differenzialmente espresso durante l'infezione di FD in *A. thaliana*

Genetica inversa per confermare il coinvolgimento di alcuni geni differenzialmente espresso mediante l'infezione con FD di mutanti di *A. thaliana* (infection rate)

Genetica inversa

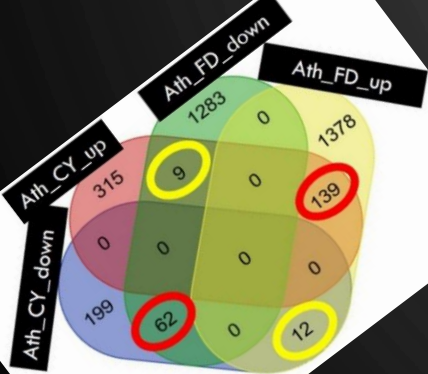
Selezione di geni bersaglio

Produzione di mutanti privi dei geni selezionati

Valutazione del fenotipo

Identificazione della funzione del gene

Profilo EPG per escludere alterazioni nutrizionali del vettore su un mutante con diversa suscettibilità a FD



A. thaliana



Euscelidius variegatus, vettore sperimentale di FD



Sintomi di FD su *A. thaliana*

- Introduzione
- Marcatori genici per tracciare la distribuzione del patogeno
- Suscettibilità varietale
- Meccanismi e basi molecolari della resistenza

• Strategie di difesa (elicitori di resistenza)

- Conclusioni

• Lotta obbligatoria come da decreti ministeriali

- Si prospetta una messa a bando totale di tutti gli insetticidi neonicotinoidi e molti piretroidi
- Urgente necessità di trovare valide alternative di lotta

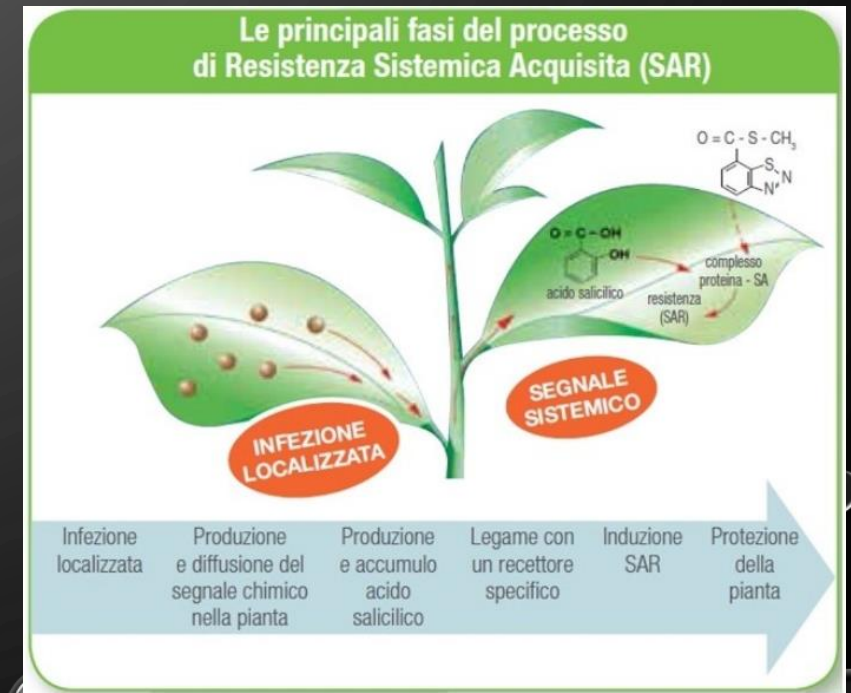
ATTIVARE LA DIFESA DELLE PIANTE CONTRO LE FITOPLASMOSI

- INDUCE RESISTENZA A DIVERSI PATOGENI (FUNGHI E BATTERI)
- MECCANISMO DI AZIONE DELL'ACIDO SALICILICO (SA)
- ELEVATA MOBILITÀ NELLA PIANTA
- EFFETTI PIÙ PERSISTENTI NELLE MONOCOTILEDONI CHE NELLE DICOTILEDONI



Principio attivo:
acibenzolar-S-methyl

RESISTENZA SISTEMICA ACQUISITA

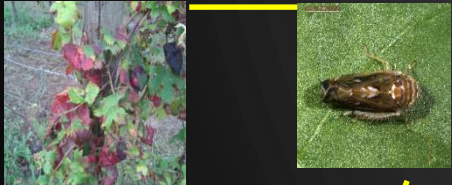


- Introduzione
- Marcatori genici per tracciare la distribuzione del patogeno
- Suscettibilità varietale
- Meccanismi e basi molecolari della resistenza

• Strategie di difesa (elicitori di resistenza)

- Conclusioni

Vigneto sperimentale con diverse Cultivar
 Filari **trattati BION** e filari di **controlli non trattati**
 Posizionate **trappole cromotropiche** per valutare presenza di
S. titanus
 5 trattamenti a scadenza quindicinale



BN

FD

Recovery

induction

Romanazzi et al,
2009, 2013

Protection

from infection

Miliordos et al, 2017



- Strategie di difesa (elicitori di resistenza) RNA interferente

- L'attività di BION su vite è misurabile con l'incremento di espressione genica di **pr-1**.
- In ogni caso l'elicitazione è temporanea e richiede **trattamenti ripetuti**.
- L'applicazione di trattamenti di Bion in vigneto lascia **residui** sulle uve.
- Il trattamento con Bion non altera il comportamento nutrizionale del vettore in condizioni controllate.
- I numerosi trattamenti necessari in campo su vite potrebbero causare una variazione dell'appetibilità della pianta nei confronti dell'insetto.
- **Deroga all'utilizzo di Bion 50 WG su vite** (Regione Piemonte), per un massimo di 6 interventi ad intervalli di 7-10 giorni e con 90 giorni di carenza (prima della vendemmia).



- Introduzione
- Marcatori genici per tracciare la distribuzione del patogeno
- Suscettibilità varietale
- Meccanismi e basi molecolari della resistenza
- Strategie di difesa (RNA interferente)
- Conclusioni

La tecnica dell'RNA interferente (RNAi) sfrutta un meccanismo altamente conservato che permette l'inibizione dell'espressione di un gene specifico.

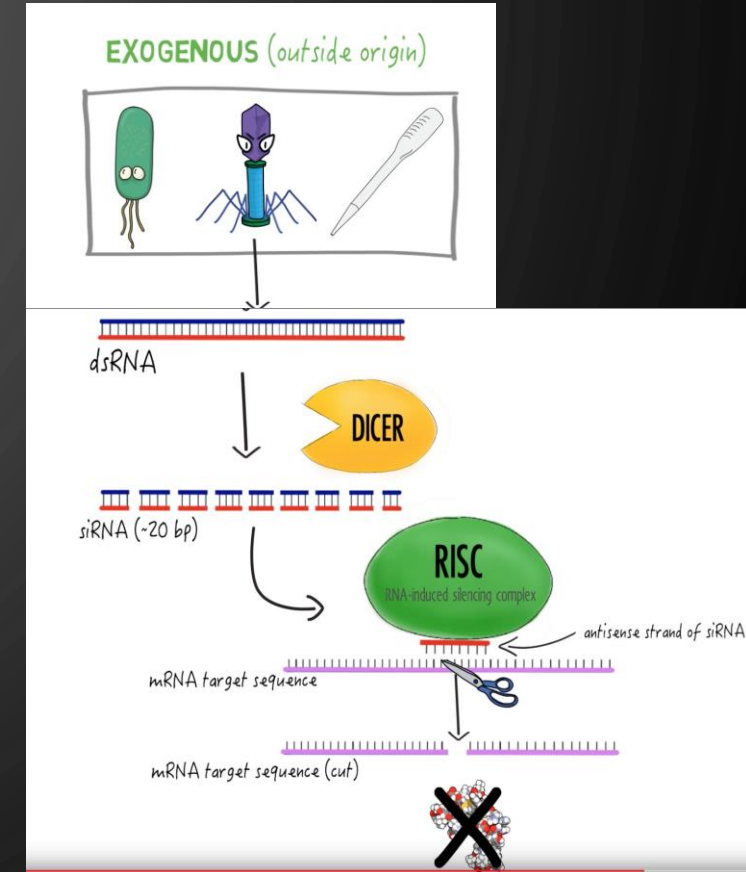
Descritto da Andrew Z. Fire e Craig C. Mello in *Caenorhabditis elegans* (Montgomery and Fire, 1998).

Il silenziamento genico è indotto dalla presenza di piccoli RNA a doppia elica.

Esistono diverse categorie di sRNA.

Hanno diversi meccanismi di origine.

- ➔ Silenziamento genico
- ➔ Premio Nobel in Physiology or Medicine nel 2006
- ➔ dsRNA
- ➔ miRNA, siRNA, piRNA
- ➔ Endogena, esogena



- Introduzione
- Marcatori genici per tracciare la distribuzione del patogeno
- Suscettibilità varietale
- Meccanismi e basi molecolari della resistenza
- Strategie di difesa (RNA interferente)
- Conclusioni

Meccanismo di azione

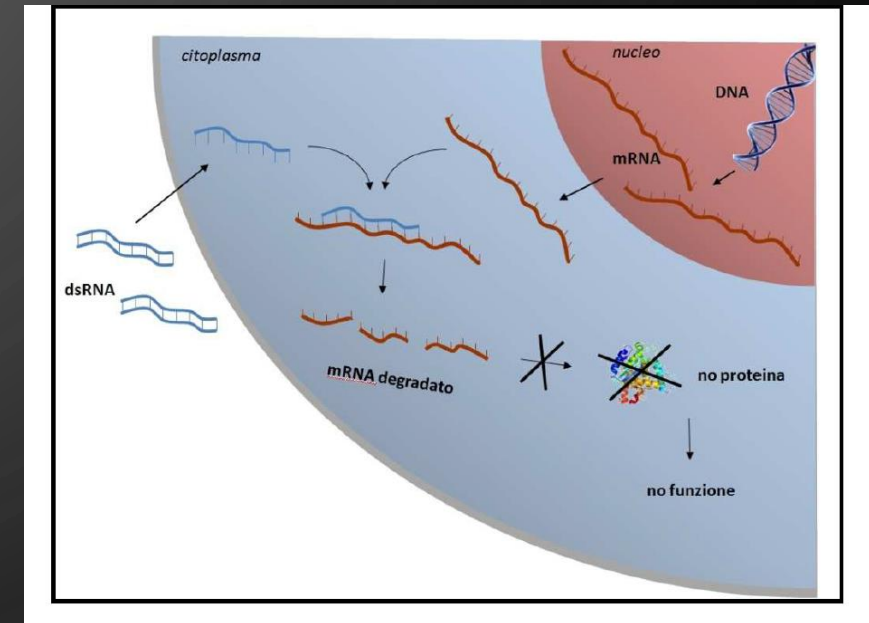
La presenza di **dsRNA** nella cellula permette la degradazione dell'**RNA messaggero complementare**.

Questa degradazione comporta la mancata sintesi della proteina corrispondente.

L'assenza della proteine determina un **fenotipo**.

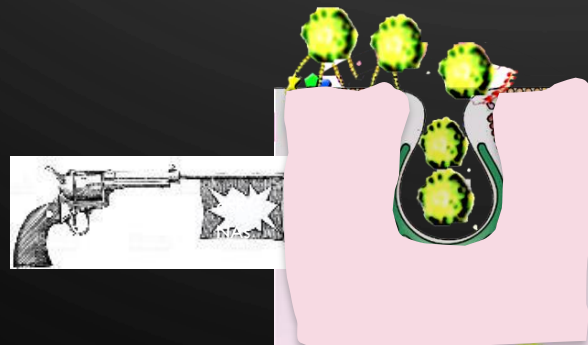
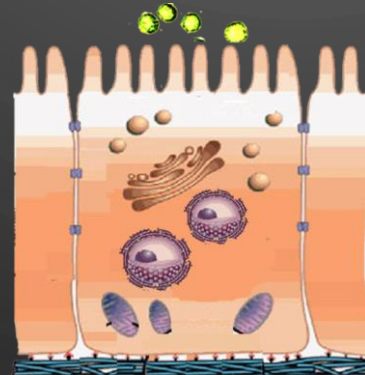
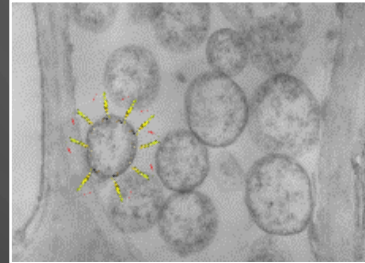
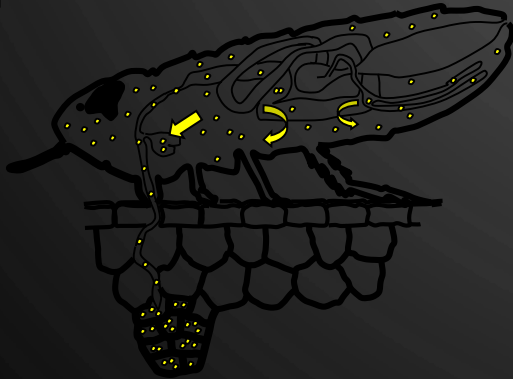
Nel caso dei vettori, il fenotipo può essere letale (**attività insetticida**)

Oppure si può mirare a **ridurre la capacità di trasmissione** del patogeno.



- Introduzione
- Marcatori genici per tracciare la distribuzione del patogeno
- Suscettibilità varietale
- Meccanismi e basi molecolari della resistenza
- Strategie di difesa (RNA interferente)
- Conclusioni

RNAi in vettori: silenziare geni di insetto coinvolti nella trasmissione di fitoplasmi



Le proteine di membrana del fitoplasma sono il luogo di contatto tra il patogeno ed il vettore e determinano le modalità di colonizzazione del corpo del vettore (VmpA) e la conseguente capacità di trasmissione (Amp, Imp).

Queste proteine agiscono con un meccanismo ligando/recettore, in cui quest'ultimo si identifica con una o più proteine dell'insetto (actina, ATP synthase beta), molte delle quali ancora sconosciute.

- Introduzione
- Marcatori genici per tracciare la distribuzione del patogeno
- Suscettibilità varietale
- Meccanismi e basi molecolari della resistenza
- Strategie di difesa (RNA interferente)
- Conclusioni

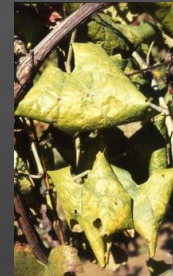
I trascrittomi dei vettori e dei patogeni sono indispensabili per sfruttare il meccanismo di RNAi.



Scaphoideus titanus
RNAseq completato nel contesto del
Progetto H2020 VIROPLANT



Euscelidius variegatus
RNAseq completato nel contesto del
Progetto FitoDigIt, Fondazione CRT



FD
RNAseq completato (Abbà et al., 2014)



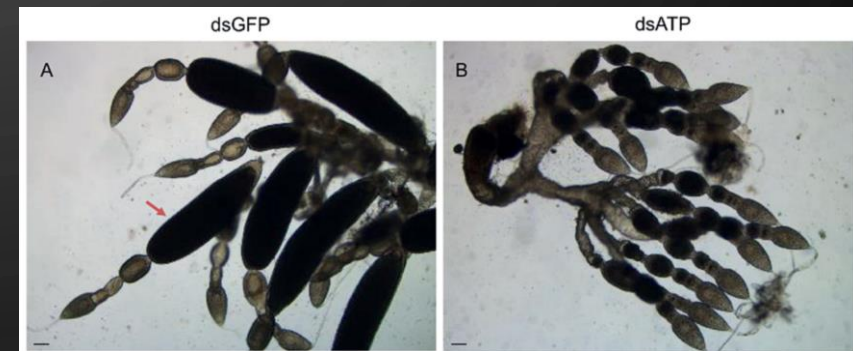
Conoscendo i trascrittomi di *S. titanus* ed *E. variegatus* è possibile silenziare un qualunque gene di interesse.

- Introduzione
- Marcatori genici per tracciare la distribuzione del patogeno
- Suscettibilità varietale
- Meccanismi e basi molecolari della resistenza
- Strategie di difesa (RNA interferente)
- Conclusioni

Effetti del silenziamento genico nei due vettori di FD

- Actina induce letalità in *E. variegatus* (Abbà et al., 2019)
- ATP synthase beta riduce la moltiplicazione di due diversi fitoplasmi in *E. variegatus*, ma non inficia l'efficienza di acquisizione (Galetto et al., 2021a)
- ATP sintasi beta induce sterilità femminile in *E. variegatus* (Galetto et al., 2021b) e *Scaphoideus titanus*, attraverso anomalie ovariche (Galetto et al., 2022)

Gene bersaglio	Alterata trasmissione	Letalità	Altro fenotipo
ATP synthase	+	+	Sterilità ovarica
actin	?	+	?

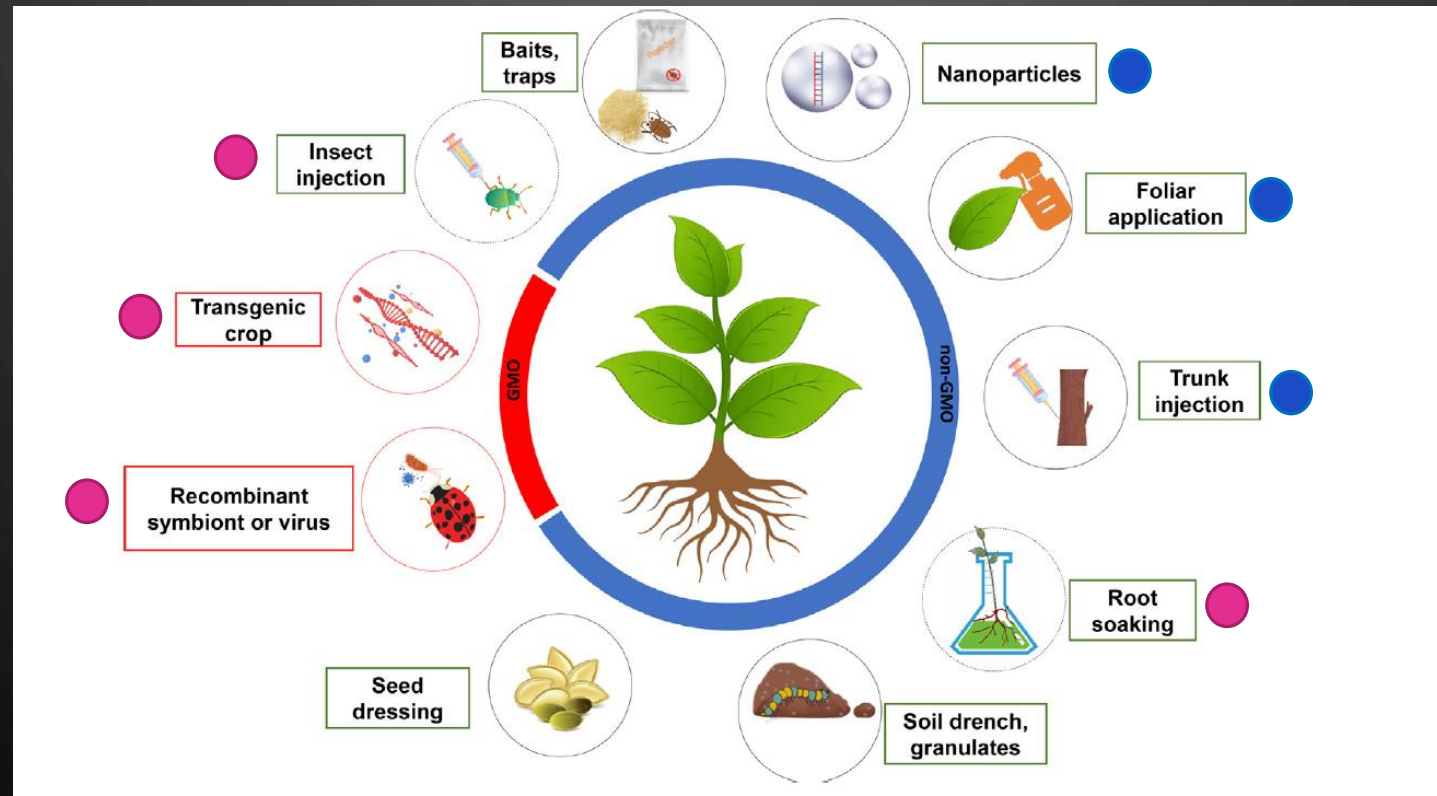


- Introduzione
- Marcatori genici per tracciare la distribuzione del patogeno
- Suscettibilità varietale
- Meccanismi e basi molecolari della resistenza

• Strategie di difesa (RNA interferente)

- Conclusioni

Un'efficiente strategia di applicazione dei dsRNA in vigneto è importante, anche per gli emittenti vettori di fitoplasmi



- Introduzione
- Marcatori genici per tracciare la distribuzione del patogeno
- Suscettibilità varietale
- Meccanismi e basi molecolari della resistenza
- Strategie di difesa (RNA interferente)

• Conclusioni

Conoscere la biodiversità (**marcatori molecolari**) del patogeno è importante per identificare gli attori del ciclo epidemiologico di FD su scale geografiche diverse e definire interventi di lotta per situazioni diverse.

Non è stata identificata alcuna resistenza genetica a FD in vite, e tutte le cvs analizzate hanno mostrato diversi gradi di **suscettibilità**, benchè sia importante separare la resistenza genetica al fitoplasma dalla diversa capacità della pianta di sostenere la nutrizione del vettore.

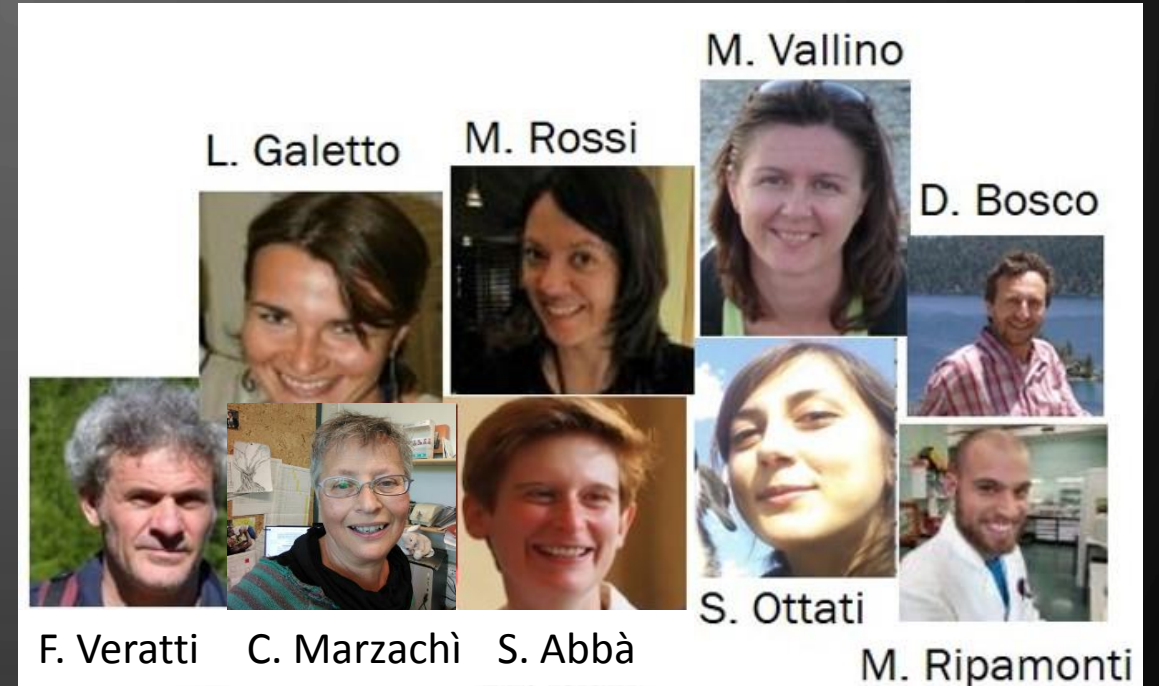
Un approccio di genetica inversa su piante modello, diverse dalla vite, ha identificato tratti genetici coinvolti nella suscettibilità a FD che potranno essere utilizzati in **programmi di miglioramento genetico tradizionale** o tramite nuove tecnologie di manipolazione genetica (CRISPR-Cas9 **genome editing**).

La ricerca sperimentale ha permesso di introdurre l'uso di **elicitori di resistenza** anche nella lotta contro FD mediante una deroga all'utilizzo di Bion 50 WG in vigneto.

La ricerca di base ha fornito indicazioni preliminari sul funzionamento dell'**RNA interferente** come possibile sostituzione di insetticidi contro il vettore di FD. Tuttavia l'applicazione reale resta subordinata al problema del delivery e all'approvazione in conformità alle normative europee.

Ringraziamenti

Grazie al gruppo di BM1 dell'IPSP-CNR!



Grazie a voi per l'attenzione!