REGIONE PIEMONTE

Fondo Europeo di Sviluppo Regionale
P.O.R. 2007/2013

Report Finale del Progetto/Studio di fattibilità[1]:

POR. FESR 07-13 - ASSE I.1.3 - AP2 AIUTI AI SOGGETTI AGGREGATI AI POLI DI INNOVAZIONE AP2

ELIFITO
(cup: J37I11000840007)

[1] Indicare numero, tipologia e acronimo del progetto/studio di fattibilità

INDICE

1. Dati salienti di progetto 3
2. Sintesi del progetto 4
3. Descrizione dei WP e dei risultati di progetto 5
4. Lista delle deliverable e delle milestone 13
Deliverables 13
Milestones 15
5. Ricadute e impatto atteso 16
6. Variazioni di progetto 17
7. Dati economici riepilogativi 17
7.1 Budget previsionale e conto consuntivo 17
7.2 Utilizzo delle risorse 20
8. Gantt 22
9. Conclusioni 23

1. Dati salienti di progetto

Numero progetto: J37I11000840007

Acronimo progetto: ELIFITO

Titolo progetto: "Elicitori di resistenza/tolleranza a fitoplasmi per un modello agronomico a basso impatto ambientale per il miglioramento della qualità e della sicurezza ambientale delle principali cultivar da vino piemontesi"

Tipologia: PROGETTI DI RICERCA INDUSTRIALE E/O SVILUPPO SPERIMENTALE (tipologia di iniziativa ammissibile 2.2 – Sezione II - del Disciplinare per l'accesso ai finanziamenti) - secondo Programma annuale – novembre 2010

Data inizio progetto: 01/10/2011

Data fine progetto: 17/07/2014

Nome dei partner:

1. Vignaioli Piemontesi
2. Mybasol
3. UNIPMN
4. UNITO
5. IVV_CNR

Si prega di fornire una panoramica degli obiettivi del progetto

(numero di pagine max 1)

In Piemonte il comparto vitivinicolo ha un ruolo di rilievo nell'economia agricola regionale e le produzioni di qualità e di eccellenza rappresentano un risultato notevole dello sforzo svolto per la costruzione di una vitivinicoltura di qualità. Uno studio ISMEA ha confermato che la specificità strutturale ed economica del Piemonte, consiste nel fatto che la produzione di vino di qualità si articola su due assi. Da un lato pochi vini molto diffusi e produttivi, sui quali si concentra gran parte della produzione regionale, dall'altro molte denominazioni il cui contributo in termini produttivi e strutturali è minimo, con una produzione che si può considerare di nicchia, ma la cui presenza va a completare l'offerta e a integrare il tessuto produttivo regionale. In Piemonte, infatti, i primi tre vini (Asti DOCG, Piemonte DOC, Barbera d'Asti DOC) concentrano oltre la metà della produzione effettiva, e se a questi si aggiungono i successivi cinque (Barbera del Monferrato DOC, Barbera d'Alba DOC, Langhe DOC, Barolo DOCG, Dolcetto d'Alba DOC), si arriva a oltre i tre quarti della produzione di vini di qualità. Al contrario l'altro aspetto della vitivinicoltura di qualità piemontese è dato dai molti vini di modesta dimensione, per molti dei quali non si raggiungono le 100 aziende. È opinione diffusa tra gli operatori del settore che la forte variabilità (le numerose denominazioni di origine) rappresenti senz'altro un elemento di forza del sistema vitivinicolo regionale.
La Flavescenza dorata, il principale giallume della vite, è stato identificato dalla Regione Piemonte come una

delle principali minacce per il settore vitivinicolo piemontese, alla stregua di altri importanti fattori legati alla contingenza del mercato, ad un perdurare di una crisi depressiva del sistema cooperativo e dei piccoli produttori locali ed all'alterazione del contesto territoriale e paesaggistico con conseguente perdita di immagine. Relativamente all'area definita "Ambiente e rapporti con il territorio", il *Tavolo di filiera* ha posto in evidenza come il rapporto del settore con il territorio sia assolutamente prioritario, anche alla luce dello sviluppo della cosiddetta "economia del gusto", di cui la filiera è un punto cardine. Tuttavia, si è anche segnalato come un forte impegno verso il territorio possa comportare anche un eventuale aggravio dei costi per gli operatori. Il *Tavolo*, quindi, ha individuato alcune linee principali di azione, tra cui il sostegno della produzione integrata, possibilmente anche attraverso una valorizzazione commerciale e della lotta alle minacce fitosanitarie, con particolare riferimento alla FD. In conseguenza di quanto esposto, la Regione ha svolto numerosi interventi normativi rivolti specificamente al settore vitivinicolo, istituendo l'anagrafe vitivinicola regionale (Legge Regionale 39/80), i Distretti dei Vini (Legge Regionale 20/99) e favorendo l'ammodernamento dell'agroindustria attraverso la valorizzazione delle produzioni agricole e zootecniche, e la promozione dello sviluppo del sistema delle imprese agricole e zootecniche mediante programmi finalizzati alla concentrazione dell'offerta e all'integrazione verticale dei componenti delle diverse filiere agroindustriali. La Regione Piemonte ha inoltre emanato *La Legge Regionale 95/95* "Interventi regionali per lo sviluppo del sistema agro-industriale piemontese" che persegue; tra gli altri, gli obiettivi di migliorare il reddito degli imprenditori agricoli, accrescere l'efficienza e la competitività del sistema agro-industriale, promuovere la trasformazione, la commercializzazione e il consumo di prodotti agricoli e agroindustriali piemontesi, in particolare, di quelli ottenuti con metodi che salvaguardino l'ambiente e la salute degli agricoltori e dei consumatori. Infine, è importante ricordare gli interventi finalizzati a contrastare la diffusione della FD tra i vigneti del Piemonte, visto il notevole impegno, non solo in termini di risorse finanziarie, profuso dall'Amministrazione regionale e dalle Province, dopo la promulgazione del Decreto Ministeriale n. 32442 del 31 maggio 2000, recante le norme per la lotta obbligatoria contro la fitoplasmosi della vite. In questo senso, la Regione, con il DGR n 81-581 del 24/07/2000 "Applicazione in Piemonte del DM del 31/05/2000 - Misure per la lotta obbligatoria contro la Flavescenza Dorata della vite", ha affidato al proprio Settore Fitosanitario il compito di definire e di aggiornare periodicamente le zone focolaio, di insediamento e indenni particolarmente a rischio, nonché di definire le misure da applicare sul territorio regionale consistenti in trattamenti insetticidi obbligatori contro il vettore della malattia (la cicalina della vite *Scaphoideus titanus*) e nell'estirpo delle piante infette. La presenza della fitoplasmosi è stata accertata nelle province di Alessandria, Asti, Biella, Cuneo, Novara, Torino e Vercelli. Le risorse finanziarie per l'estirpo e il reimpianto dei vigneti colpiti sono state garantite da numerose leggi. Recentemente, considerata l'entità delle superfici interessate dalla malattia, l'Amministrazione regionale ha ritenuto opportuno dare continuità ai programmi d'intervento finanziario realizzati nel periodo 2001-2007, disponendo la riapertura dei bandi, anche per il 2008, per la presentazione delle domande di aiuto. In questo contesto, il presente progetto si propone di studiare l'effetto di elicitori di resistenza/tolleranza alla FD della vite per migliorare la qualità e sicurezza dell'uva, contribuendo alla definizione di un modello agronomico a basso impatto ambientale applicabile anche da aziende che operino in un contesto di viticoltura biologica. Infatti, in queste realtà, i principi attivi insetticidi utilizzati non hanno mostrato un'elevata efficacia, pertanto il rischio di reinfezione delle viti è sempre rimasto molto elevato, anche in anni di bassa pressione d'infezione, pertanto uno strumento capace di migliorare la resistenza/tolleranza delle viti alla malattia può fornire un'utile integrazione al trattamento insetticida. A questo proposito, la Regione Piemonte ha inserito una misura (2.1.4 "Pagamenti agro-ambientali") che si propone di consolidare e valorizzare la ricchezza di diversificazione delle situazioni ambientali, paesaggistiche e territoriali che possono preludere alla multifunzionalità dell'attività agricola e che, nel settore vitivinicolo contempla le azioni rivolte ad incentivare le tecniche di produzione biologica.

2. Sintesi del progetto

Si prega di includere una descrizione sintetica degli obiettivi del progetto, una descrizione del lavoro svolto fin dall'inizio del progetto, una descrizione dei principali risultati ottenuti, i risultati attesi finali e il loro potenziale impatto e l'uso (compreso l'impatto socio-economico e le implicazioni sociali, se applicabile, del progetto).

Questo progetto si è focalizzato sullo studio di un modello agronomico a basso impatto ambientale sulle cv di vite Barbera e Arneis, con l'uso elicitori di resistenza/tolleranza ai fitoplasmi per migliorare qualità e sicurezza dell'uva, considerando anche il ruolo della guarigione naturale dagli stessi patogeni, evitando il ricorso all'estirpo/reimpianto.

Sono stati caratterizzati i principali microrganismi associati alle radici di viti infette e risanate in relazione alle due cv in diverse zone colturali. Sono stati valutati, in condizioni controllate di campo, gli effetti di specifici elicitori biotici sulle due cultivar (funghi micorrizici e rizobatteri) e di elicitoriabiotici commerciali su cultivar Barbera (benzotiadiazolo, BTH) sulla suscettibilità alla FD delle due cv. E' stata analizzata la qualità dell'uva ottenuta da viti risanate naturalmente o a seguito dell'applicazione di elicitori. Sono state effettuate anche prove di micro vinificazione.
I risultati sono stati ottenuti mediante l'applicazione di appropriati elicitori biotici e BTH a:
i) viti infette delle due cv (elicitori biotici) e Barbera (BTH), per seguire il decorso della malattia, includendo appropriati controlli non elicitati.
ii) viti sane delle due cv, successivamente esposte all'infezione mediante trasmissione controllata entro manichette di garza, con individui del cicadellide vettore *Scaphoideus titanus* infettati in laboratorio, per verificare l'efficienza di trasmissione della malattia a piante elicitate e di controllo. Le trasmissioni sono avvenute in screen-house, su viti in vaso. Successivamente le piante sono state trapiantate nel vigneto sperimentale, dove sono state sottoposte ai consueti trattamenti fitoiatrici.. I ceppi microbici impiegati sono stati preventivamente identificati a partire dal suolo adeso alla rizosfera di viti sane in vigneti ad elevata incidenza di malattia e testati su pianta modello Catharantus roseus (Vinca) infetta da FD
Lo stato di infezione delle viti è stato confermato ogni anno mediante analisi molecolare, mentre opportuni rilievi hanno valutato l'evoluzione della malattia durante la stagione vegetativa e prelievi di uva in prossimità della maturazione hanno permesso di valutare la qualità del prodotto ottenuto da piante risanate naturalmente o a seguito dell'applicazione di elicitori. La persistenza degli inoculi micorrizici è stata valutata nel tempo nelle diverse condizioni colturali.

Indicare eventuali variazioni nel piano previsto con specifica delle motivazioni e delle soluzioni applicate.

Indicare, se esistenti, il logo e il sito web del progetto.

(numero di pagine max 2.)

3. Descrizione dei WP e dei risultati di progetto

Si prega di fornire una breve panoramica sulle attività svolte

Per ogni pacchetto di lavoro fornire le seguenti informazioni:

- *una sintesi degli obiettivi e i dettagli per ogni attività;*
- *evidenziare i risultati significativi raggiunti;*
- *se applicabile, spiegare le motivazioni delle variazioni avvenute nel corso del progetto e il loro impatto su altre attività, nonché sulle risorse disponibili e la pianificazione;*
- *se applicabile, spiegare le motivazioni del mancato raggiungimento di obiettivi di progetto e/o non essere nei tempi previsti e dettagliare l'impatto su altre attività, nonché sulle risorse disponibili e la pianificazione;*
- *in caso di deviazioni significative dettagliare le azioni correttive intraprese e i risultati raggiunti.*

(numero di pagine max per WP 1/2)

Work Package n. 1 - Management

Obiettivi: Coordinamento dei partners e definizione di protocolli comuni

Attività:

T1.0 - Coordinamento partners e divulgazione; Leader: Vignaioli Piemontesi, Partner: UNIPMN

I partners si sono riuniti periodicamente per analizzare le problematiche inerenti il progetto e per discutere i risultati ottenuti. Il leader, Vignaioli Piemontesi, d'intesa con UNIPMN, ha coordinato e aggiornato tutti i partners sullo stato di avanzamento dei lavori e sulle criticità verificatesi. Alla fine di ogni stagione vegetativa si è tenuta una riunione per condividere i risultati e impostare il piano sperimentale per la stagione successiva. La comunicazione tra i partner è stata continua e costante e mantenuta prevalentemente mediante posta elettronica.

T1.1 - Disegno sperimentale e definizione protocolli, Leader: UNIPMN, Partner: UNITO, IVV_CNR, Vignaioli Piemontesi

A questa attività hanno partecipato tutti i partners che, durante la prima riunione hanno deciso un appropriato disegno sperimentale per l'applicazione di elicitori biotici e abiotici su viti di campo e su nuove barbatelle includendo diversi opportuni controlli positivi e negativi di infezione (FD) ed elicitazione (elicitato e non). Il disegno sperimentale è stato utilizzato da Vignaioli Piemontesi per organizzare e coordinare le diverse attività del progetto (T1.0). Apposite riunioni nei mesi invernali sono state dedicate alla definizione dei singoli protocolli sperimentali appropriati per l'applicazione di ciascun elicitore alle viti in analisi.

Risultati significativi raggiunti:

I risultati raggiunti sono stati oggetto di presentazioni a convegni scientifici nazionali (XIX Convegno della Società italiana di Patologia Vegetale, Udine, 23-25 Settembre, 2013), internazionali (COST Action 0807 - Integrated Management of Phytoplasma Epidemics in Different Crop systems - Working group 3 "Phytoplasma control in crop systems" meeting "Prospectives of endophytes as biocontrol agents in the management of phytoplasma diseases", San Michele all'Adige (TN) 14 Novembre 2012) e di pubblicazione su riviste scientifiche, come si evince dalla documentazione allegata.

I risultati del progetto saranno presentati nel corso dell'evento divulgativo (2015) organizzato annualmente dalla Provincia di Asti, Sezione Agricoltura, per garantire maggiore diffusione e visibilità tra gli operatori professionali della provincia più colpita.

Variazioni:

Mancato raggiungimento degli obiettivi:

Azioni correttive:

Work Package n. 2 - Applicazione elicitori e gestione vigneti

Obiettivi: Identificazione di ceppi microbici specifici per la vite, produzione di inoculi, applicazione di elicitori e trasmissione del fitoplasma

Attività:

Task 2.0 - Identificazione, selezione e studio di ceppi microbici rizosferici della vite; Leader: UNIPMN, Partner: Mybasol

Isolamento da viti (Barbera e Arneis) sane e infette da FD di microrganismi rizosferici e loro caratterizzazione mediante marcatori molecolari. Prima di ciascun prelievo è stato effettuato un sopralluogo nei vigneti oggetto del Progetto al fine di mappare lo stato sanitario delle singole piante, valutando non solo i sintomi indotti da fitoplasmi (CNR_IVV, WP3 T3.1). Lo stato sanitario delle piante è stato determinato con protocolli disponibili in letteratura e di routine nei laboratori dei partecipanti al Progetto e basati sull'amplificazione mediante PCR diretta e nested delle parziali sequenze di alcuni geni (16Sr DNA) dei fitoplasmi (CNR_IVV, WP3 T3.0). Questa attività diagnostica ha permesso di identificare le viti infette da FD, quelle sane e quelle con risanamento spontaneo (ed assenza del fitoplasma: recovered). Per la caratterizzazione di microrganismi rizosferici (batteri e funghi micorrizici arbuscolari), campioni di suolo, di suolo rizosferico e di radice sono stati prelevati da viti sane e viti con evidenti sintomi di FD. Come ulteriore controllo sono stati prelevati anche campioni di suolo non coltivato ("bulk soil"). Si è proceduto con l'estrazione diretta del DNA genomico dai campioni ed amplificazione PCR. Per l'analisi delle comunità batteriche associate al "bulk soil" e alle viti sane o malate, sono state utilizzate coppie di primers universali per Bacteria, dei quali uno modificato con una coda di circa 30-50 guanina e citosina. Ottenuto un quantitativo di DNA amplificato sufficiente, è stata effettuata la valutazione della biodiversità e l'analisi della struttura delle comunità microbiche mediante elettroforesi su gradiente denaturante (DGGE). Le bande più fluorescenti corrispondenti alle popolazioni dominanti e quelle mutuamente esclusive, corrispondenti alle specie tipicamente associate ad una determinata pianta sono state excise, amplificate, clonate e sequenziate.

Per quanto riguarda l'analisi delle comunità dei funghi AM sono state utilizzate coppie di "primers" complementari alla sequenza codificante la subunità maggiore (LSU o 28S) dell'rDNA e contenente le sequenze geniche altamente conservate D1 e D2. Il polimorfismo genico delle subunità ribosomali infatti, è ampiamente utilizzato per valutare la diversità dei funghi AM presenti nelle radici di piante. In generale, il protocollo di lavoro prevede due reazioni polimerasiche a catena consecutive (Nested PCR) utilizzando come stampo il DNA genomico estratto dai campioni e coppie di "primers" specifici per l'rDNA dei funghi AM, il clonaggio del prodotto amplificato e la trasformazione dei batteri *Escherichia coli*. Segue uno "screening" delle colonie batteriche trasformate mediante reazione polimerasica a catena, il sequenziamento di 48-50 frammenti di DNA amplificati ed ottenuti per ciascun campione e l'analisi bioinformatica dei dati.

Task 2.1 - Produzione e fornitura di inoculi rizosferici (batteri e funghi micorrizici arbuscolari); Leader: Mybasol, Partner: UNIPMN

Per la prima sperimentazione sono stati utilizzati batteri e inoculi fungini già disponibili che hanno dato buoni risultati in campo su specie diverse dalla vite. Successivamente, sono stati utilizzati i batteri selezionati ed i funghi micorrizici..

I batteri sono stati coltivati in bioreattori in condizioni già standardizzate utilizzando terreni di coltura e condizioni di pH, temperatura ed ossigenazione adeguati. Le cellule batteriche sono state separate dal terreno di coltura esausto mediante centrifugazione e lavati più volte in tamponi sterili. Al fine di ottenere un quantitativo di batteri sufficiente per l'inoculo del numero di piante considerato e ad una densità tale da garantire un'efficiente e duratura colonizzazione dell'apparato radicale, la densità cellulare finale è stata valutata mediante densità ottica e conteggio su piastra. In base a questi parametri è stata preparata la diluizione opportuna di cellule batteriche che il giorno stesso è stata distribuita lungo i filari.

I funghi micorrizici arbuscolari sono stati coltivati su piante ospiti (trifoglio, sorgo) le cui radici, dopo un accurato controllo del grado di colonizzazione, sono state triturate e mescolate al substrato di coltura delle viti descritto nel Task 2.2.

Task 2.2 – Applicazioni sperimentali di elicitori in vigneto; Leader: Vignaioli Piemontesi, Partner: UNITO, Mybasol

Per le viti in campo, la soluzione contenente gli inoculi batterici è stata distribuita lungo i filari manualmente e gli inoculi micorrizici sono stati collocati in prossimità delle radici con l'aiuto di carotatori.). Per le barbatelle in vaso l'inoculo micorrizico e la soluzione batterica sono state somministrate al momento della messa a dimora in vaso. In entrambi i casi (piante mature e barbatelle) è stato necessario effettuare dei "rinforzi" con la soluzione batterica dopo circa una settimana dal primo trattamento. Gli elicitori biotici sono stati applicati sia su piante sane successivamente esposte ad insetti infettivi, sia su piante infette, per seguire l'evoluzione della malattia.

Per quanto riguarda l'applicazione del benzotiadiazolo esso è stato distribuito mediante trattamenti fogliari con periodicità di 10 giorni e concentrazione 2,4 mM. (BTH è stato applicato da maggio a settembre ogni 10 giorni per 2 anni successivi su viti infette di campo cv Barbera al fine di verificare l'induzione del risanamento. Circa 70 viti con sintomi manifesti e diagnosticate positive a FD, (CNR_IVV, WP3 T3.0,) sono state suddivise in due lotti di 35 piante, uno trattato con BTH e uno di controllo. Inoltre BTH è stato applicato a barbatelle sane cv Barbera in vaso (da una settimana prima dell'inoculazione fino a fine settembre ogni 10 giorni esposte all'infezione mediante insetti infettivi isolati entro serrette di garza escludi-insetti. In totale, circa 120 barbatelle sono state trattate con BTH in tre successivi esperimenti e altrettante sono state utilizzate come controllo. Tutte le barbatelle sono state esposte a cicaline infettive nelle medesime condizioni sperimentali. Le barbatelle erano successivamente trapiantate in piena terra nel vigneto sperimentale di Vignaioli Piemontesi (a fine autunno, inizio inverno) per seguire l'evoluzione della malattia.

Mybasol e Unito hanno fornito gli elicitori da utilizzare a Vignaioli Piemontesi che si è occupata dell'applicazione. Le applicazioni degli elicitori biotici e abiotici sono state ripetute nei tre anni del progetto.

Task 2.3 - Gestione vigneti e raccolta campioni; Leader: Vignaioli Piemontesi, Partner: IVV_CNR

Un vigneto di cv Barbera ed Arneis, disponibile presso un socio di Vignaioli Piemontesi, gia' noto al partner del progetto per la presenza di viti infette da FD, è stato utilizzato per le sperimentazioni.

Alcuni filari sono stati mappati per la presenza di FD su base sintomatica e conferma mediante analisi molecolare (IVV_CNR). I filari sono stati coltivati con le procedure standard (sia i trattamenti insetticidi obbligatori contro il vettore che i necessari interventi fungicidi sono stati regolarmente applicati), le viti infette non sono state estirpate e sono state identificate con apposito cartellino. In ciascun filare sono state scelte le piante infette da trattare con i vari elicitori e quelle che rappresentavano i controlli non elicitati. Le piante sane in vaso esposte a trasmissione sperimentale controllata di FD mediante vettore sono state trapiantate in vigneto, suddivise in elicitate e di controllo, per seguire l'evoluzione della malattia (UNITO WP2 T2.4).

A partire da inizio agosto e fino ad ottobre, le singole viti incluse nelle varie tesi sperimentali sono state campionate (circa 20 foglie) e portate al laboratorio IVV_CNR per la diagnosi di FD (WP3 T3.0).

A partire da circa un mese prima della data stimata per la vendemmia, un congruo numero di acini sono stati campionati da Vignaioli Piemontesi dalle viti delle diverse tesi sperimentali e condizioni fitosanitarie (sane e risanate) per la determinazione della curva di maturazione. Poiche' FD induce tipicamente disseccamento dei grappoli, gli acini delle piante malate non sono stati campionati. I campionamenti per la diagnosi molecolare e la descrizione della curva di maturazione sono stati effettuati nell' anno 2013 in previsone della vendemmia.

Il servizio tecnico della Vignaioli Piemontesi, affiancato dal proprietario del vigneto si è occupato dell'intera gestione agronomica e fitoiatrica del vigneto e dell'impianto di nuove barbatelle utilizzate nella sperimentazione.

Task 2.4 - Allevamenti del vettore, mantenimento del fitoplasma e prove di trasmissione, Leader: UNITO.

Il vettore specifico di FD, il cicadellide Scaphoideus titanus, è stato mantenuto in cella climatizzata da

UNITO. La procedura è consistita nella raccolta di tralci contenenti uova da vigneti infestati (segnalati ogni anno dal servizio fitosanitario regionale), la loro frigoconservazione fino al momento di utilizzo, la schiusa in ambiente controllato (cella climatizzata e serretta di rete escludi-insetti) in presenza di barbatelle di viti sane e piantine di fava. Con questa procedura è stato possibile ottenere ninfe sane di *S. titanus* utilizzate nelle prove di trasmissione di FD da maggio a settembre.

Il fitoplasma FD è stato mantenuto in cella climatizzata da UNITO nella pianta ospite di laboratorio *Vicia faba* (fava) periodicamente inoculate dal vettore di laboratorio *Euscelidius variegatus*. L'allevamento della cicalina *E. variegatus* è stato condotto su graminacee per permetterne la riproduzione e, quando necessario, le ninfe sono state prelevate dall'allevamento e confinate in cella climatica su piante di fava infette da FD. Circa un mese dopo le ninfe erano trasferite su giovani piante sane di fava per l'inoculazione, conservate in cella climatica fino alla manifestazione dei sintomi. In questo modo si è garantita la continua disponibilità di piante sorgenti di FD.

Quando necessario, ninfe di *S. titanus* sono state isolate su fave infette da FD per un periodo di acquisizione di una settimana, trasferite su viti sane in vaso e/o piante di fava fino al completamento del periodo di latenza (circa 1 mese). Gli adulti infettivi sono stati isolati entro manichette di rete a tenuta su barbatelle giovani in vaso (elicitate e di controllo) per un periodo di trasmissione di 1 settimana. Lo stato di infezione dei vari lotti di cicaline utilizzate è stato analizzato mediante estrazione del DNA totale di un campione delle cicaline al termine della latenza e successiva diagnosi di FD in singoli individui mediante PCR. Le cicaline utilizzate nelle prove di trasmissione sono risultate infette da FD mediamente nella misura del 60% (circa 12 cicaline su 20 analizzate per ogni esperimento di acquisizione-trasmissione). Al termine delle prove di trasmissione le cicaline sono state eliminate mediante trattamento insetticida.

Poichè poche barbatelle esposte a *S. titanus* infettivi e trapiantate in vigneto sono risultate infette, è stato allestito un ulteriore esperimento utilizzando 20 viti cv Barbera in vaso ottenute per micropropagazione *in vitro*. Tali viti, ritenute molto suscettibili all'infezione di FD, sono state esposte al vettore infettivo entro manichette di rete previa elicitazione con BTH (10 piante) o in assenza di elicitazione come controllo (10 piante). Le applicazioni fogliari di BTH sono state ripetute ogni 10 giorni fino al termine dell'esperimento, 11 settimane dopo l'inoculazione di FD con *S. titanus*.

Inoltre sono state infettate con *S. titanus* infettivi 75 barbatelle in vaso (50 cv Barbera e 25 cv Arneis) preventivamente inoculate dal partner Mybasol con inoculi micorrizici o batterici. Per la cv Barbera sono state inoculate 10 piante mentre per la cv Arneis 5 piante per trattamento. Piante delle due cv non elicitate sono state utilizzate come controllo. Le barbatelle erano successivamente trapiantate in piena terra nel vigneto sperimentale di Vignaioli Piemontesi (a fine autunno, inizio inverno) per seguire l'evoluzione della malattia. (WP2, Task 2.2).

Risultati significativi raggiunti:

Il coordinamento tra i due partner (Vignaioli Piemontesi e IVV) ha permesso di mantenere una gestione ottimale del vigneto oggetto della sperimentazione, di svolgere i carotaggi necessari per i capionamenti di suolo al fine di identificare la composizione microbiologica di suolo e radici, nonché per effettuare gli inoculi di elicitori previsti dal progetto, e di effettuare tutti i monitoraggi di sintomi per singola pianta e i campionamenti per le diagnosi molecolari che si sono resi necessari per il corretto svolgimento del Progetto stesso.

Variazioni:

Mancato raggiungimento degli obiettivi:

Azioni correttive:

Work Package n. 3 - Valutazione risultati

Obiettivi: Identificare le piante infette e risanate a seguito dei vari trattamenti elicitori, monitoraggio dell'andamento sintomatico della malattia, valutazione della qualità dell'uva nelle viti delle diverse tesi sperimentali, valutazione della persistenza degli elicitori biotici in condizioni di campo

Attività:

Task 3.0 - Diagnosi molecolare FD; Leader: IVV_CNR

La diagnosi di FD è stata effettuata mediante un protocollo rapido tramite reverse transcription Real time PCR. A tale scopo, circa 1–1.5 g di materiale fogliare ottenuto da 20 foglie è stato sminuzzato in un apposito tampone mantenuto a freddo. Il succo grezzo di ciascun campione, ottenuto mediante spremitura con pressa meccanica, opportunamente diluito è stato denaturato mediante bollitura a ha rappresentato il templato per la successiva reazione diagnostica. La reazione è avvenuta in un tubo singolo, con la contemporanea presenza dell'enzima trascrittasi inversa (per copiare il templato a RNA in DNA), la Taq DNA polimerasi per l'amplificazione, i nucleotidi, primers appropriati e sonda TaqMan specifica per FD. L'esito dei risultati diagnostici è stato inserito in un database che è stato reso disponibile a Vignaioli Piemontesi per le successive azioni di coordinamento del progetto.

Sono state sottoposte a diagnosi i) le viti sintomatiche di campo per la raccolta della loro rizosfera al fine di ottenere elicitori biotici specifici della rizosfera della vite; ii) le viti sintomatiche di campo del vigneto sperimentale al fine della mappatura dei filari da includere nella sperimentazione; iii) tutte le viti elicitate o di controllo, inizialmente infette o esposte a vettore infettivo. Nell'ambito dei 3 anni della sperimentazione e per ciascuna cv, sono state sottoposte a diagnosi per FD circa 500 campioni, per un totale di 1000 campioni sulle due cv Arneis e Barbera.

Task 3.1 - Analisi dell'andamento infezione e risanamenti; Leader: IVV_CNR, Partner: UNITO

L'analisi dei sintomi è stata effettuata in tre momenti della stagione vegetativa: primavera, tarda estate, fine autunno (dopo la completa caduta delle foglie). In primavera sono state identificate le piante che presentavano sintomi precoci della malattia, mentre da luglio in poi sono state considerate come infette da FD le piante che presentavano almeno tre sintomi specifici della malattia. L'esito dell'osservazione dei sintomi per ciascuna pianta inclusa nella sperimentazione è stato registrato nel database del progetto.

Task 3.2 - Analisi curve di maturazione e microvinificazioni; Leader: UNIPMN, Partner: UNITO, IVV_CNR

Per l'analisi della curva di maturazione, nei trenta giorni antecedenti la vendemmia, con cadenza settimanale, sono stati effettuati campionamenti di uva per la determinazione dei seguenti parametri: gradazione zuccherina (°brix), pH, acidità totale ed Indice di Maturazione (IM). Sono state anche realizzate microvinificazioni da partite di uve delle due cv sottoposte a diversi trattamenti per effettuare valutazioni sensoriali.

Per le microvinificazioni, al momento opportuno state raccolte le quantità necessarie per ciascuna tesi sperimentale. La determinazione delle curve di maturazione e le microvinificazioni sono state effettuate da un consulente a cura di UNIPMN. I partner UNITO e IVV_CNR hanno partecipato all'interpretazione dei risultati con l'integrazione di quelli relativi allo stato sanitario e di elicitazione.

Task 3.3 - Analisi persistenza di campo elicitori biotici; Leader: UNIPMN

E' stato effettuato un controllo periodico del grado di micorrizazione delle radici, mediante prelievi randomizzati, ed utilizzando metodi microscopici. E' stata valutata anche la presenza di arbuscoli, strutture importanti per gli scambi ospite-simbionte: un elevato grado di arbuscolarizzazione è indice di elevata efficienza della simbiosi.

Risultati significativi raggiunti:

Ottenimento di elicitori biotici specifici della rizosfera della vite.

Per quanto riguarda la selezione di batteri coltivabili, sono stati isolati ceppi appartenenti al genere Bacillus, Pseudomonas e Streptomyces, utilizzando terreni di coltura differenti (rispettivamente Nutrient Agar addizionato con cloruro di manganese, King B agar e Tryptic Soy agar 1:10%) e basandosi sulle caratteristiche morfologiche delle colonie.

Dalle piastre corrispondenti alle diluizioni significative alcune colonie sono state scelte in modo casuale. Le colonie (38 da V. vinifera cv. Barbera asintomatiche, 32 da V. vinifera cv. Barbera sintomatiche, 43 da V. vinifera cv. Arneis asintomatiche e 46 da V. vinifera cv. Arneis sintomatiche), sono state isolate, descritte e sottoposte a colorazione di Gram. Per l'identificazione di ciascuna colonia è stato estratto il DNA con il kit Nucleo Spin Tissue (Macherey-Nagel M-Medical, Cornaredo, Milan); il rDNA 16S è stato amplificato utilizzando i primers fD1 (5'-ccgaattcgtcgacaacAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e RP2 (5'-cccgggatccaagcttACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') descritti da Weisburg et al. (1991). La reazione di PCR è stata condotta come segue: denaturazione iniziale a 94°C per 5 min; 34 cicli a 94°C per 1 min, 60°C per 1 min e 72°C per 1 min 30 s; 72°C per 10 min come tempo di estensione finale. I prodotti di PCR sono stati purificati con il kit Nucleo Spin Extract II (Macherey-Nagel,), ed inviati alla BMR Genomics (Padova, Italy) per il sequenziamento.

Mappatura di FD e scelta dei filari sperimentali. Per quanto concerne la cv Barbera, il vigneto in analisi all'inizio del progetto (fine 2011) presentava un'incidenza della malattia pari al 6.3%. Questo dato è aumentato progressivamente nel corso del progetto passando dal 5,6% (2012), al 22,8% (2013) fino al 24,8% (2014). La percentuale di piante che è andata soggetta a remissione dei sintomi è stata del 83,3%, 42,9% e 43,5% negli anni 2012, 2013 e 2014, rispettivamente. Quattro (33,3%) piante Barbera sulle 12 infette nel 2011 hanno mostrato un risanamento dalla malattia costante nel tempo e che si è protratto fino al 2014. Nel caso della cv Arneis, l'incidenza di FD variava negli anni da 1,5% (2011) a 4% (2012), 10.4% (2013) e 8,3% (2014). La percentuale di piante che è andata soggetta a remissione dei sintomi è stata di circa 64% tra il 2011 ed il 2012 e del 50% nei restanti anni. Il 41% circa delle piante infette da FD nel 2011 e risanate nel 2012 ha mostrato una stabilità del risanamento per tutta la durata del progetto. Sulla base di questi risultati, sono stati identificati quattro lotti sperimentali per ciascuna cultiva (2 da sottoporre a trattamento con elicitori e 2 di controllo). In particolare, ogni lotto di Barbera era composto da 45 piante (per un totale di 180 piante) e ogni lotto di Arneis era composto da 24 piante (96 piante in totale). La percentuale di piante infette nel 2013 era di 17,8% e 7,8 % per i lotti Barbera elicitati e di controllo (P=0,048) e di 10,4% per i lotti Arneis sia elicitati che di controllo.

Applicazione di elicitori biotici alla vite in campo. In seguito all'applicazione della miscela di elicitori alle piante Barbera ed Arneis dei due lotti trattati nel 2013, la percentuale di nuove piante infette da FD nel 2014 è stata di circa 6,5% e 9% per le cv Barbera e Arneis, rispettivamente. Nello stesso anno, nei filari di controllo (non elicitati), la percentuale di nuove piante infette da FD è stata di circa 8.7% per entrambe le cv. L'applicazione del trattamento di elicitazione alle radici delle viti di entrambe le cv non ha quindi avuto un effetto significativo nei confronti dell'infezione (Barbera: P=0,704; Arneis: P=0,823) . Tuttavia questi risultati si riferiscono al primo anno successivo all'applicazione dell'elicitore, ed una sperimentazione di maggior durata è auspicabile.

Per quanto riguarda la capacità di BTH di indurre risanamento nelle viti di campo cv Barbera infette da FD, dopo due anni di applicazioni non è stato possibile evidenziare alcun effetto di induzione, poiché il 51% (19 piante su 37) delle piante sono risultate risanate (senza sintomi e con diagnosi in PCR negativa per FD) tra quelle elicitate con BTH e il 77% (27 piante su 35) erano invece risanate tra le piante di controllo. Il confronto statistico rivela una differenza significativa (Chi-square=4,128, P=0,042), indicando che le piante non elicitate sono risanate con efficienza significativamente superiore. Il risultato, oltre ad evidenziare l'assenza di attività di BTH nell'indurre risanamento, evidenzia come la cv Barbera mostri una spiccata tendenza a risanare da FD.

Per quanto riguarda la capacità di BTH di proteggere dall'infezione le barbatelle di cv Barbera, le indicazioni sono più promettenti poiché solo 8 viti su 111 sono risultate infette tra quelle trattate mentre 16 su 96 sono risultate infette tra le viti di controllo. Il confronto statistico rivela una differenza quasi significativa tra le due tesi (Chi-square=3,619,P=0,057). E' perciò possibile che l'elicitazione di resistenza indotta da BTH protegga le viti dall'infezione ma ostacoli il loro risanamento. I meccanismi di risanamento sono quasi del tutto

sconosciuti e non si può escludere che le vie metaboliche attivate da BTH interferiscano con i processi di risanamento. Per quanto riguarda la capacità di BTH di proteggere dall'infezione le viti cv Barbera da micropropagazione, non sono state ottenute differenze significative poiché 8 piante su 10 sono risultate infette tra quelle trattate e 6 su 10 tra quelle elicitate con BTH (Fisher exact test P=0,628). L'esperimento ha confermato che le viti erbacee micropropagate sono assai più sensibili a FD delle barbatelle legnose.

Per quanto riguarda le barbatelle pre-inoculate con i simbionti batterici e/o micorrizici i risultati non mostrano differenze di suscettibilità alla trasmissione di FD tra le viti di cv Barbera e Arneis elicitate con due diversi ceppi batterici e due funghi micorrizici e le viti di controllo. E' però da notare che l'efficienza di trasmissione è risultata assai bassa in tutte le tesi (dallo 0 al 20%, ossia 2 viti su 10 al massimo) e pertanto i risultati non sono sufficientemente affidabili.

Per quanto riguarda la capacità delle piante infette da FD di risanare spontaneamente dalla malattia, 36,5% delle piante Barbera ed 60% di quelle Arneis sottoposte ad elicitazione hanno mostrato una remissione dei sintomi della malattia nel 2014, ma il dato non è risultato significativamente diverso da quello delle piante non elicitate dei lotti di controllo (Barbera, P=1,00; Arneis, P= 0.592). Tuttavia questi risultati si riferiscono al primo anno successivo all'applicazione dell'elicitore, ed una sperimentazione di maggior durata è auspicabile in futuro.

Variazioni:

Mancato raggiungimento degli obiettivi:

Azioni correttive:

4. Lista delle deliverable e delle milestone

Deliverables

Si chiede di elencare tutti i deliverable di progetto.

Note per la compilazione:

Tipologia: documento DOC, Prototipo P, Impianto I, Dimostratore DIM.
Livello di disseminazione: Confidenziale C, Pubblica P, interna al progetto IP.
Localizzazione: indicare luogo presso cui la deliverable è disponibile (uffici, sito pilota,sede operativa,...).

TABELLA 1. DELIVERABLES

D. n.	Nome Deliverable	WP n.	Partner responsabile	Tipologia	Livello dissemi nazione	Data rilascio	Ragg iunta Si/No	Localizzazione[2]	Commenti
1.1.1	Protocolli sperimental i per il trattamento con BTH	1	UNITO	DOC	IP	-	SI	UNITO	
1.1.2	Protocolli sperimental i per il trattamento con rizobatteri	1	UNIPMN	DOC	IP	-	SI	UNIPMN	
1.1.3	Protocolli sperimental i per il trattamento con funghi micorrizici	1	UNIPMN	DOC	IP	-	SI	UNIPMN	
2.1.1	Ceppi batterici per vite	2	MYBASOL	P	C/P	2010	Si	MYBASOL	Alcuni ceppi confidenziali altri sono stati oggetto di pubblicazione scientifica
2.2.1	Ceppi fungini per vite	2	MYBASOL	P	C	-	si	MYBASOL	

[2] Localizzazione: si intende di indicare dove è possibile recuperare per visione il Deliverable

2.3.1	Protocolli per l'applicazione di inoculi batterici su piante di vite adulte	2	MYBASOL	DOC	IP	-	Si	MYBASOL	
2.3.2	Protocolli per l'applicazione di inoculi fungini su piante di vite adulte	2	MYBASOL	DOC	IP	_	sI	MYBASOL	
2.4.1	Inoculi batterici	2	MYBASOL	P	IP	-	SI	MYBASOL	
2.5.1	Inoculi fungini	2	MYBASOL	P	IP	-	SI	MYBASOL	
2.6.1	Insetti infettivi	2	UNITO	P	IP	-	SI	UNITO	
3.1.1	Elenco delle piante infette	3	IVV_CNR	DOC	IP	-	SI	IVV_CNR	
3.2.1	Registro sintomi FD	3	IVV_CNR	DOC	IP	-	SI	IVV_CNR	
3.2.1	Curve di maturazione	3	UNIPMN	DOC	IP	-	SI	UNIPMN	
3.4.1	Vino	3	UNIPMN	P	IP/ P	PREVISTA 2015	SI	UNIPMN	Degustazione prevista in occasione di un futuro incontro divulgativo.

Milestones

Si chiede di elencare tutte le milestone di progetto.

TABELLA 2. MILESTONES						
M. n.	**Nome Milestone**	**WP n.**	**Partner responsabile**	**Data rilascio**	**Raggiunta Si/No**	**Commenti**
1.1.	Definizione di protocolli sperimentali	1	UNIPMN	1° Semestre 2012	SI	
2.1.	Selezione di batteri rizosferici	2	MYBASOL	1° Semestre 2012	SI	
2.2.	Selezione funghi micorrizici	2	MYBASOL	1° Semestre 2012	SI	
2.3.	Definizione delle modalità di applicazione degli elicitori biotici	2	MYBASOL	1° Semestre 2013	Si	
2.4.	Produzione inoculi batterici e fungini	2	MYBASOL	2° Semestre 2012	Si	Identificazione15 elicitori Biotici
2.5.	Verifica della persistenza degli elicitori biotici nelle radici	2	MYBASOL	2° Semestre 2013	Si	
2.6.	Ottenimento di *Scaphoideus titanus* infetto in condizioni controllate	2	UNITO	Effettuato nell'Aprile 2012 e ripetuto negli anni successivi	Si	
3.1.	Controllo della presenza di FD nelle viti	3	IVV_CNR	1° Semestre 2012	Si	Integrato per tutta la durata del progetto
3.2.	Controllo dell'andamento dell'infezione	3	IVV_CNR	1° Semestre 2012	Si	Integrato per tutta la durata del progetto
3.3.	Controllo dei parametri di maturazione	3	UNIPMN	2° Semestre 2013	Si	
3.4.	Microvinificazioni	3	UNIPMN	2° Semestre 2013	Si	

5. Ricadute e impatto attesi

Si prega di includere una descrizione dettagliata delle ricadute di progetto e il loro potenziale impatto sul mercato.
In particolare, si richiede di indicare per ciascun partner, ove possibile, i risultati e le ricadute che a seguito della realizzazione del progetto si ritiene possano essere misurabili e realizzabili. L'attenzione deve essere rivolta alla descrizione delle seguenti ricadute:tecnologiche, occupazionali, crescita di knowhow ed economiche.
Considerando poi l'intero raggruppamento descrivete come avete pianificato lo sfruttamento industriale.
(numero di pagine max 3.)

Per quanto riguarda gli effetti di elicitori biotici nei confronti della capacità di risanamento e di protezione dall'infezione, il presente progetto ha chiaramente indicato che le applicazioni di detti elicitori sono fattibili in campo e su scala medio-grande, e che le specie inoculate sopravvivono e si mantengono in attività (UNIPMN, MYBASOL, Vignaioli Piemontesi). La ricerca ha fornito indicazioni estremamente utili per l'integrazione dei microrganismi della rizosfera nella gestione a basso impatto ambientale del vigneto (Vignaioli Piemontesi). Tuttavia, il progetto non ha permesso di chiarire l'efficacia dell'applicazione di ceppi selezionati di elicitori di resistenza biotici nei confronti della FD della vite in campo. Infatti, per l'ottenimento di risultati definitivi è comunque necessario ripetere le osservazioni e le applicazioni per un periodo di tempo più lungo.
Il presente Progetto ha ricadute applicative. Infatti ha permesso di ottenere informazioni sull'attività di BTH nella protezione delle viti dall'infezione di FD e ha chiarito che lo stesso elicitore non è attivo nel promuovere il risanamento delle piante infette (UNITO, IVV-CNR, Vignaioli Piemontesi).
Questi risultati sono di estremo interesse soprattutto, ma non esclusivamente, per il settore della viticoltura biologica, poiché sia gli elicitori di resistenza sia lo sfruttamento di fenomeni naturali di risanamento rientrano in queste pratiche, oggi poco competitive nei confronti della lotta alle fitoplasmosi.
Inoltre, dato l'evento grandinigeno che ha colpito il vigneto nell'annata prevista per le microvinificazioni (2013), le caratteristiche dell'apparato vegetativo e, conseguentemente, dell'uva non ha permesso di comparare in maniera affidabile la qualità dell'uva prodotta dalle viti sottoposte a trattamento elicitore o di controllo (UNIPMN, MYBASOL, Vignaioli Piemontesi, UNITO, IVV-CNR).
Il progetto ha quindi fornito indicazioni per un modello agronomico a basso impatto ambientale del vigneto (Vignaioli Piemontesi). Inoltre, il risultato ottenuto in relazione all'abilità del trattamento mediante BTH nel prevenire l'infezione da FD in assenza di un effetto significativo sull'induzione del risanamento fornisce la prima indicazione sperimentale su una specie arborea di interesse economico dell'esistenza di meccanismi diversi coinvolti nei due fenomeni e getta le basi per ulteriori analisi destinate a chiarire dettii meccanismi molecolari (IVV-CNR, UNITO) per poterli eventualmente sfruttare in senso applicativo (Vignaioli Piemontesi).
Questo aspetto sottolinea l'importanza che il progetto ha ricoperto nel rafforzare le relazione tra i partners e nell'indicare prossime linee di collaborazione future. I risultati ottenuti saranno poi utilizzati come base per le consulenze che Vignaioli Piemontesi potrà fornire ai suoi soci in relazione all'utilizzo di formulati di elicitori biotici/abiotici di resistenza, fornendo loro anche un metodo per affrontare eventuali sperimentazioni di ulteriori prodotti in azienda. Il risultati del presente progetto si inseriscono ed ampliano in maniera estremamente approfondita il quadro di una sperimentazione ancora in corso e guidata dalla provincia di Asti sull'efficacia di numerosi prodotti elicitanti nei confronti della FD.
La presenza tra i partner del progetto di una grande organizzazione di produttori di vino (Vignaioli Piemontesi) è inoltre garanzia di diffusione capillare dei risultati del progetto sulle aziende che operano nel territorio regionale.
I microorganismi selezionati, dopo ulteriori controlli, potranno essere inseriti in prodotti specifici per ampliare l'offerta di biofertilizzanti già esistenti sul mercato.

9. Conclusioni

Si chiede di fornire le informazioni di base sugli ulteriori sviluppi previsti in ottica di sfruttamento industriale; nei limiti del possibile spiegare se e come i rapporti tra i Partner si intensificheranno.

L'attività svolta in questo progetto ha permesso di raggiungere un livello di conoscenza del sistema suolo-pianta e degli effetti sulla qualità del prodotto vino non ancora ottenuto prima.
UNIPMN potrà quindi proporsi come centro di supporto alle aziende nella valutazione della qualità dei prodotti, notizie sulla qualità del suolo e metodi per il ripristino ed il recupero della biodiversità microbica, migliorando la sua interazione e integrazione con il territorio, un'area dalla spiccata vocazione vitivinicola.
MYBASOL, con UNIPMN, potranno essere riferimento per la selezione di microorganismi da utilizzarsi come biofertilizzanti con azione di contenimento della flavescenza dorata per le aziende del settore, integrandosi, allo scopo, anche con IVV per il controllo molecolare della fitoplasmosi.

Il progetto ha ottenuto buoni risultati nonostante il tempo a disposizione fosse breve. La collaborazione tra i partner è stata proficua e con un buon livello di integrazione. . I risultati del progetto, come descritto in precedenza, hanno infatti evidenziato la necessità di ulteriori collaborazioni tra i partner per un'analisi dettagliata dei meccanismi di base coinvolti nella protezione da FD da parte di BTH. Si auspica pertanto che questo rapporto instaurato venga mantenuto e consenta di proseguire il lavoro iniziato e confermare i risultati ottenuti e chiarire eventuali punti dubbi.

Il capofila del progetto

Il Presidente
VIGNAIOLI PIEMONTESI
Giulio PORZIO