



UNIVERSITA DEGLI STUDI DI PADOVA
Scuola di Agraria e Medicina veterinaria
Corso di laurea in scienze e tecnologie agrarie

**Flavescenza Dorata: aggiornamento su
tecniche di diagnosi e interazioni
pianta/fitoplasma**

Relatrice:

Prof. ssa Rita Musetti

Laureando:

Elia Max Viviani

Anno accademico 2021 - 2022

INDICE:

| | |
|---|-----------|
| Riassunto | 4 |
| Abstract | 5 |
| Introduzione | 6 |
| 1.Sintomatologia | 7 |
| 2.Eziologia | 10 |
| 3.Risposta immunitaria della vite | 12 |
| 4.Possibili metodi di gestione | 14 |
| 4.1 La contagiosità di FD dipende dalla concentrazione del fitoplasma | 14 |
| 4.2 Acibenzolar-S-Metile come strumento di prevenzione | 17 |
| 5.Tecniche diagnostiche più recenti | 20 |
| 5.1 Diagnosi dei giallumi della vite tramite intelligenza artificiale ... | 20 |
| 5.2 Diagnosi di giallumi tramite sistemi UAV (Unmanned Aerial Vehicle) | 24 |
| 6.Conclusioni | 31 |
| Bibliografia/Sitografia | 32 |

RIASSUNTO

La Flavescenza Dorata (FD) è una patologia della vite che rientra nella categoria delle fitoplasmosi. L'agente eziologico è infatti un fitoplasma, un procariote appartenente alla classe dei *Mollicutes* (caratterizzati dall'assenza di parete cellulare) che colonizza i tubi cribrosi del floema della vite. La trasmissione avviene tramite un insetto vettore appartenente alla famiglia dei cicadellidi, *Scaphoideus titanus* Ball che, quando infettivo ospita il fitoplasma nelle proprie ghiandole salivari.

Lo studio del fitoplasma associato a FD è reso particolarmente complicato dall'impossibilità di coltivare il microorganismo *in vitro*, in quanto esso è un biotrofo assoluto (necessita di un ospite vivo per sopravvivere). Per tale motivo si sa ancora relativamente poco sulla biologia dei fitoplasmi.

L'attività di ricerca svolta intorno a questa malattia punta soprattutto a elaborare nuovi metodi di prevenzione e di diagnosi tempestiva, e lo scopo di questa tesi è quello di illustrare alcune delle sperimentazioni svolte per lo sviluppo di tali metodi.

ABSTRACT

Flavescence Doree (FD) is a grapevine disease associated to phytoplasmas. The etiological agent is, in fact, a phytoplasma, a prokaryotic microorganism that belongs to the class of *Mollicutes* (characterized by the absence of cell wall), which colonizes the sieve tubes of grapevine phloem. The disease is transmitted by an insect vector belonging to the Cicadellidae family, *Scaphoideus titanus* Ball, which, when infectious, hosts the phytoplasma within its salivary glands.

Studies about the phytoplasma associated with FD are especially complicated because of the impossibility to cultivate phytoplasmas *in vitro*, since they are obligate biotrophic microorganisms (they require living host cells to survive). For such a reason relatively little is still known about phytoplasmas.

Research activity made about this disease mainly aims to elaborate new methods of prevention and timely diagnosis, and the goal of this thesis is to shed light on some experiments conducted to develop such as methods.

INTRODUZIONE

Le prime infezioni da FD in Europa furono registrate nel 1955, nella regione dell'Armagnac in Francia (Oliveira *et al.*, 2020). Sebbene la patologia sia caratteristica del continente europeo, il suo vettore, *Scaphoideus titanus*, è originario del nordamerica ed è pertanto considerato una specie invasiva da combattere.

Nel corso degli anni FD si è diffusa in tutta Europa, e ora è causa di ingenti danni economici nelle principali aree di produzione vinicola europee, e per tale motivo le misure attuate per contrastare la diffusione di F.D. sono spesso drastiche: in Francia, ad esempio, se in un vigneto più del 20% delle piante risulta infetto, vige l'obbligo di rimuovere l'intero appezzamento.

Uno dei fattori che maggiormente contribuiscono a rendere tanto dannosa la Flavescenza Dorata è la difficoltà con cui essa viene diagnosticata: dopo l'infezione, il fitoplasma attraversa un periodo di latenza che può arrivare a durare un anno, durante il quale esso è pressochè invisibile (Rossi *et al.*, 2019). I primi sintomi visibili spesso compaiono nell'estate dell'anno successivo a quello dell'infezione, verso fine luglio. A quel punto, non resta che capitozzare la pianta infetta nel tentativo di impedire ulteriori contagi (Albetis *et al.*, 2017). Teoricamente, la pianta potrebbe essere sorgente di inoculo anche quando non presenta i sintomi, a partire finanche da fine maggio, quando il vettore raggiunge lo stadio in cui è in grado di nutrirsi del succo floematico, ma i metodi validati per la diagnosi non hanno mai dato esito positivo su materiale di vite asintomatico.

1.SINTOMATOLOGIA

La diagnosi di FD è ancora largamente basata sul riconoscimento visivo dei sintomi, poichè le tecniche diagnostiche di laboratorio (ad esempio la PCR quantitativa), utili per individuare la patologia quando la pianta è asintomatica, hanno alte probabilità di portare a falsi negativi, a causa della distribuzione erratica del patogeno all'interno della pianta ospite (Cruz *et al.*, 2019). A complicare ulteriormente la diagnosi è il fatto che gli stessi sintomi sono riscontrati nell'ambito di un'altra patologia, il Bois Noir (o Legno Nero), anch'essa associata ad un fitoplasma, '*Candidatus Phytoplasma solani*', trasmesso dalla cicalina *Hyalesthes obsoletus* (Pierro *et al.*, 2019)

I sintomi includono accartocciamento delle foglie verso il basso, accompagnato dal loro arrossamento o ingiallimento (in base al colore dei grappoli prodotti); in un primo momento si assiste alla perdita di dominanza apicale da parte delle gemme, a cui segue un rallentamento o arresto, o alterazione nella crescita dei germogli, con lo sviluppo di germogli a zig-zag e raccorciamento degli internodi.

Nelle fasi iniziali inoltre si può notare la comparsa di piccole pustole nere sui germogli, dopodichè si assiste a una parziale o totale assenza di lignificazione. La mancanza di lignina rende gommosa la consistenza dei germogli e conferisce alla pianta un aspetto pendente. I grappoli restano rachitici e non maturano (Olivera *et al.*, 2020).

Quando la malattia giunge allo stato avanzato, la pianta perde la maggior parte delle foglie mentre i grappoli, ormai secchi, persistono sui tralci.



Figure 1, 2: sintomi di FD su foglie di cv rispettivamente a bacca bianca (Garganega) e rossa (Pinot Nero) (www.regione.veneto.it).



Fig. 3: Grappoli di Garganega colpiti da FD si presentano rachitici e secchi (www.regione.veneto.it).



Fig. 4: dettaglio di un tralcio infetto, ricoperto dalle caratteristiche pustole nere (www.regione.veneto.it).



Fig. 5: un esemplare adulto dell'insetto vettore, *S. titanus* (www.regione.veneto.it).

2.EZIOLOGIA

L'agente eziologico alla base di FD è un fitoplasma, per il quale è stato proposto il nome di '*Candidatus Phytoplasma vitis*' (IRPCM 2004). Il fitoplasma è un procariote privo di parete cellulare appartenente alla classe dei *Mollicutes*, che svolge parte del suo ciclo vitale nei tubi cribrosi del floema della pianta ospite (van Bel e Musetti, 2019) e parte nell'apparato boccale dell'insetto vettore, *Scaphoideus titanus*. A causa della loro impossibilità a essere coltivati e quindi studiati in tutte le fasi del loro ciclo, i fitoplasmi sono solitamente descritti entro il *genus* provvisorio '*Candidatus Phytoplasma*' e classificati sulla base della filogenesi del rRNA 16S. Il ceppo specifico a cui appartiene il fitoplasma associato a FD è il 16SrV, che a sua volta comprende due sottogruppi tassonomici: il 16SV-C e il 16SV-D (Rossi *et al.*, 2019).

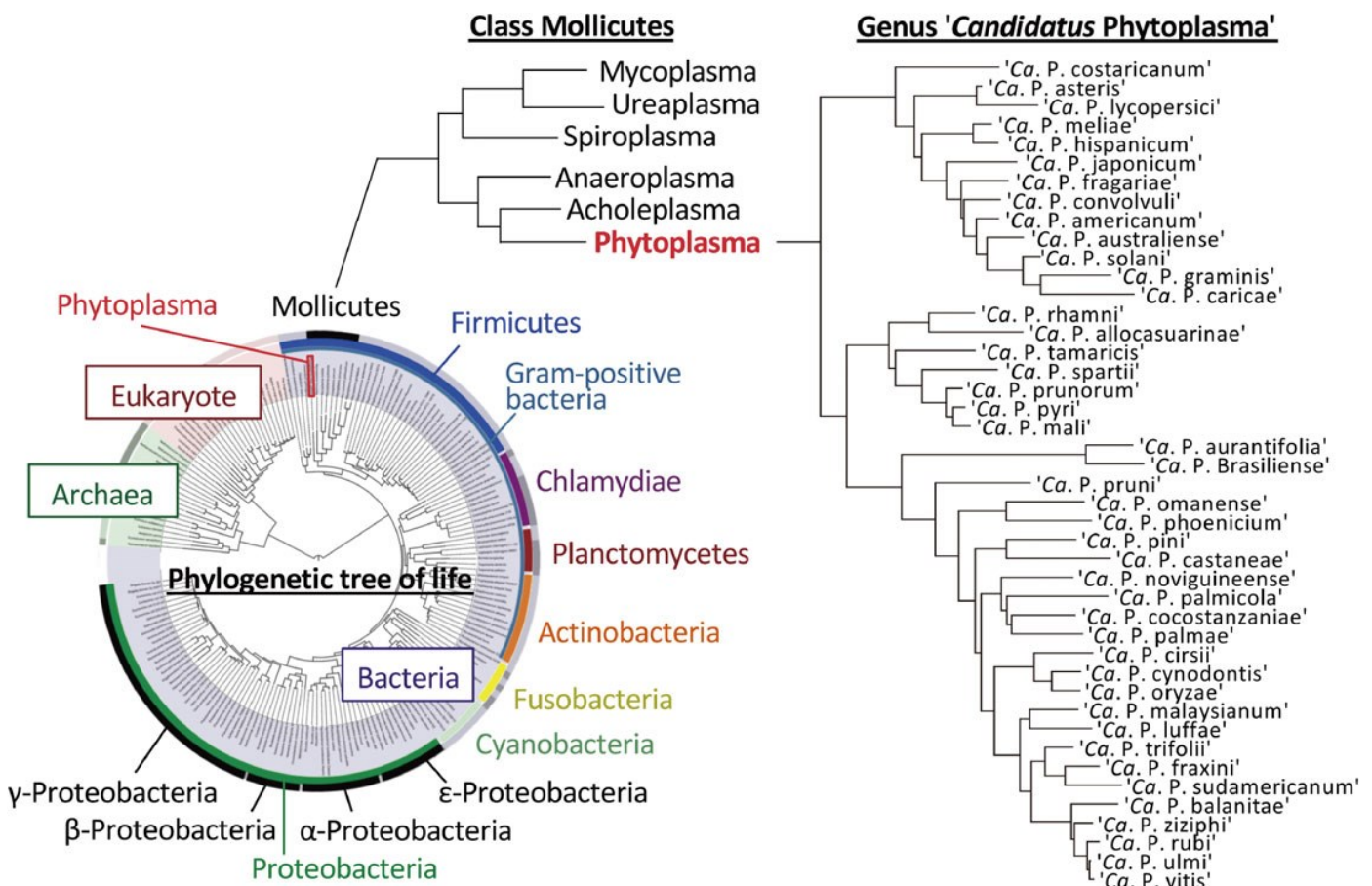


Fig. 6: La collocazione del *genus* '*Candidatus phytoplasma*' all'interno dell'albero della vita filogenetico (Shigetou Namba, 2019).

Confronti tra varietà suscettibili e varietà resistenti hanno rivelato che il fitoplasma sarebbe in grado, nelle varietà suscettibili, di bloccare l'attivazione di meccanismi di difesa basati su 'signaling' di etilene e acido jasmonico, che invece vengono attivati quando la pianta viene attaccata da esemplari sani dell'insetto vettore (Bertazzon *et al.*, 2019).

Attraverso una puntura di *Scaphoideus titanus*, il fitoplasma si introduce nel tessuto floematico della pianta provocando reazioni di difesa, come accumuli di callosio nelle placche cribrose, che portano all'ostruzione dei vasi floematici. E' stato ipotizzato che da organi fonte di fotosintati (*source*), le foglie si trasformino in *sink*, e ciò che ne risulta è un significativo rallentamento del trasporto di questi ultimi dalle foglie alle radici (Santi *et al.*, 2013; Bernardini *et al.*, 2022). Altre conseguenze dell'infezione includono ridotta fotosintesi e conduttanza stomatica, accumulo di perossido di idrogeno, metabolismo secondario ed equilibrio ormonale alterati (Prezelj *et al.*, 2016).

L'infezione causa inoltre un grande accumulo di carboidrati e fenoli nelle cellule del mesofillo e una simultanea diminuzione di clorofilla, eventi accompagnati da una riduzione dell'espressione dei geni e delle proteine coinvolti nelle reazioni luce e buio-dipendenti e di stabilizzazione del fotosistema II (Buoso *et al.*, 2019). Gli accumuli di saccarosio e amido nel mesofillo fogliare sono accompagnati dalla up-regolazione dei geni coinvolti nella loro sintesi (Teixeira *et al.*, 2020).

3.RISPOSTA IMMUNITARIA DELLA VITE

A seguito dell'attacco da parte di patogeni, la cellula vegetale è in grado di rilevarne la presenza tramite l'interazione di elicitori prodotti dal patogeno stesso (detti MAMP) o dalla pianta ospite a seguito dei danni causati dal patogeno (detti DAMP), con proteine recettrici (o semplicemente recettori), collocate transmembrana. In *Vitis vinifera* sono stati recentemente scoperti i recettori di riconoscimento di pattern affini con cui la pianta percepisce elicitori di natura estranea, quali proteine, polisaccaridi o glicolipidi anfifilici, oppure molecole provenienti dalla degradazione delle pareti cellulari vegetali da parte degli enzimi prodotti dal patogeno, in questo caso si tratta prevalentemente di polisaccaridi. Il riconoscimento degli elicitori e la conseguente risposta immunologica sono talvolta sufficienti a portare al blocco del processo infettivo con conseguente completa guarigione della pianta infetta (Heloir *et al.*, 2019).

Il tasso di guarigione (recovery) da FD, così come la suscettibilità al patogeno, variano sensibilmente da cultivar a cultivar: tra il 1995 e il 1998 si registrò la completa guarigione di circa due milioni di viti della cultivar Glera nella zona di produzione del Prosecco, nella provincia di Treviso, con conseguente ritorno alla normalità della produzione (Osler *et al.*, 2003).

Quando si ha a che fare con varietà così efficienti nel combattere FD, la capitozzatura degli esemplari malati potrebbe non essere la strategia più intelligente, e si può invece suggerire di non intervenire proprio e lasciare che la pianta combatta da se il patogeno: se la concentrazione del fitoplasma associato a FD è bassa, fattore che dipende anche dalla varietà, anche la contagiosità sarà bassa (Galetto *et al.*, 2014).

Esaminando gli esemplari guariti, si è notata una massiccia presenza di ROS (*Reactive Oxygen Species*) e in particolare di H₂O₂, all'interno del tessuto floematico. I ROS sono una conseguenza comune della risposta immunitaria delle piante, e sono componenti essenziali della cascata di segnali atti a scatenare reazioni di difesa come la risposta ipersensibile o la SAR (Systemic Acquired Resistance). La sovrapproduzione di ROS richiede l'intervento di sistemi antiossidanti che includono metaboliti quali ascorbato e glutazione ridotto, e una serie di enzimi scavenging. Se non vengono detossificati, i ROS si accumulano nella cellula, causando la perossidazione della membrana lipidica e la formazione di prodotti aldeidici come la malondialdeide e altre sostanze acido 2-tiobarbiturico-reattive (TBARS) (Musetti *et al.*, 2007).

Per tali ragioni le piante che hanno completato il percorso di recovery mostrano una riduzione nella produttività di circa il 20%, che è comunque una produttività molto maggiore di quella mostrata durante la malattia. Nel giro di qualche anno, poi, la pianta si riprende del tutto e può tornare ai livelli produttivi pre-malattia (Galletto *et al.*, 2014).

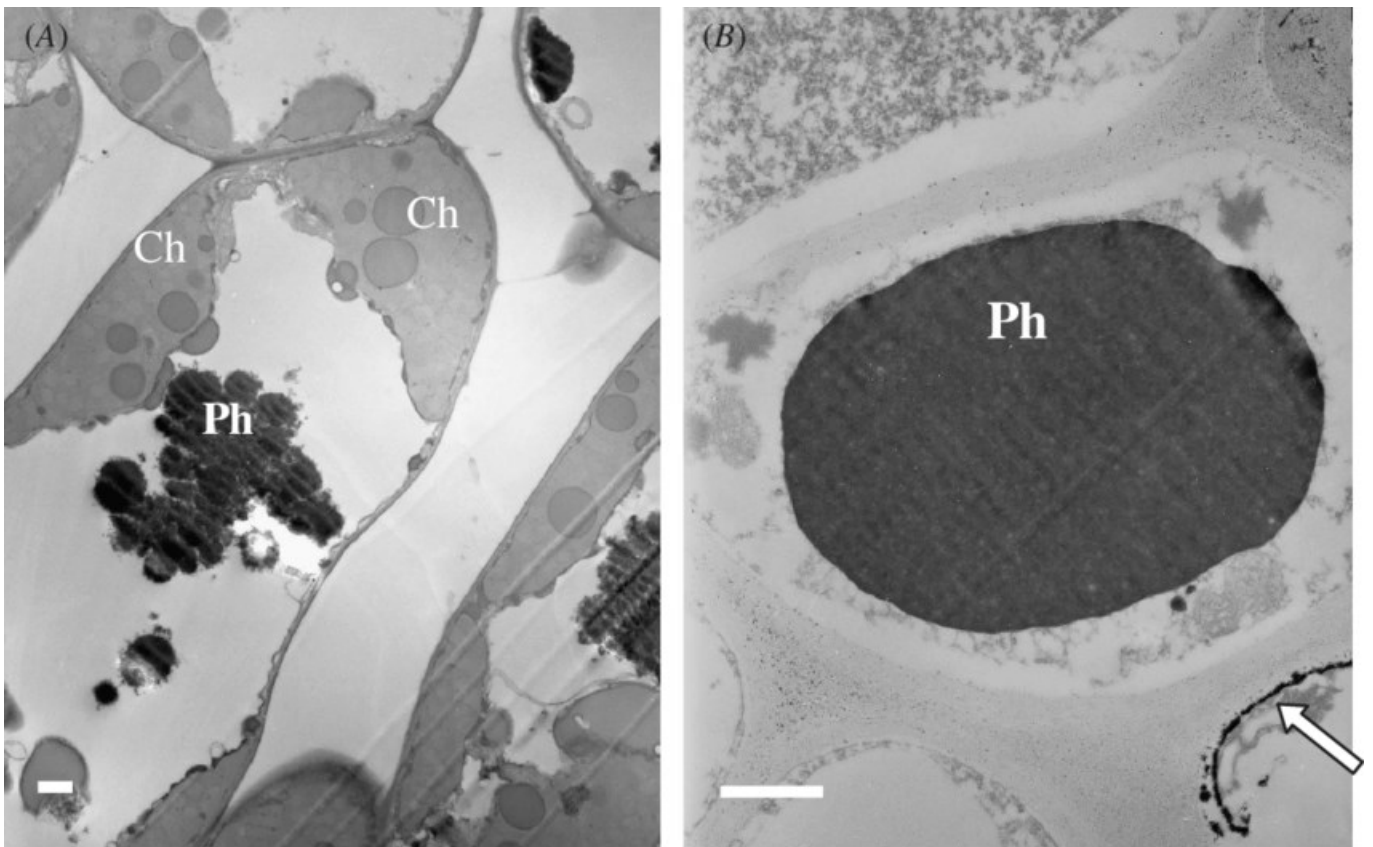


Fig. 7: micro-fotografie di tessuto fogliare di piante “recovered” da infezione da FD. Sulla sinistra sono raffigurati i tessuti del mesofillo, con cloroplasti (Ch) e materiale fenolico del vacuolo (Ph). Sulla destra una delle cellule compagne dei tubi cribrosi del floema con fenoli vacuolari. Nell’angolo in basso a destra, sono visibili precipitati di cloruro di cerio (freccia) utilizzato per evidenziare la presenza di H₂O₂ nel tubo cribroso (Rita Musetti *et al.*, 2007).

4.POSSIBILI METODI DI GESTIONE

La consapevolezza che fosse necessario un efficace metodo preventivo nella lotta a FD è emersa, in Italia, nel 2007, dopo che in Piemonte la diffusione della malattia era diventata tale che le zone maggiormente colpite sono state dichiarate 'aree di insediamento' della malattia. I trattamenti insetticidi e l'eradicazione delle piante infette non si erano rivelati strumenti sufficienti ad arrestare FD, era necessario comprendere meglio e sfruttare i meccanismi di risposta che in alcune piante erano stati sufficienti a portare alla guarigione. In primo luogo, è stato osservato come già la potatura dei germogli infetti portasse a ad un aumento delle possibilità di recovery, specialmente in determinate cultivar, quali Barbera e Glera. Altre cultivar considerate più resistenti, come Merlot, hanno mostrato anche una minore contagiosità, probabilmente dovuta alla diffusione del fitoplasma nel tessuto vascolare.

4.1 La contagiosità di FD dipende dalla concentrazione del fitoplasma

Luciana Galetto *et al.*, nel 2014 hanno esaminato più in profondità il fenomeno della contagiosità legata alle diverse cultivars. Lo scopo del loro lavoro, i cui risultati sono stati pubblicati sul *Journal of pest science* è stato quello di meglio comprendere in che modo la varietà di vite influenzi la facilità con cui l'insetto vettore acquisisca il patogeno, confrontando piante malate e guarite di due importanti cultivar piemontesi, Barbera e Nebbiolo.

Nel 2007 sono stati monitorati per la presenza di FD quattro vigneti situati in altrettante località del Piemonte. I ricercatori hanno prelevato delle foglie da piante sintomatiche per verificare la presenza di FD tramite test PCR, dopodichè hanno segnato le piante infette. Negli anni a seguire lo studio è proseguito in uno dei quattro vigneti: i test sono stati svolti sia su piante già segnalate (anche qualora avessero cessato di mostrare sintomi) che su quelle appena contagiate. Le piante guarite sono state sottoposte a tre test all'anno, ovvero tra fine maggio e gli inizi di giugno, a luglio e ad agosto. Il monitoraggio si è concluso nel 2011.

A inizio giugno 2008 sono state prelevate alcune neanidi dell'insetto vettore e sono state fatte nutrire su piante guarite e piante sintomatiche delle cv Barbera e Nebbiolo. L'esperimento è stato ripetuto a metà agosto, stavolta usando vettori adulti e piante diverse. Per una settimana, circa 50 neanidi di *Scaphoideus* sono state messe a

contatto con un singolo ramo di ciascuna pianta, infetta o guarita, usando delle gabbie per evitare che altre parti della pianta fossero attaccate, dopodichè il ramo è stato staccato e gli insetti sono stati rimossi e depositati su altre piante di vite, sempre divisi negli stessi gruppi, affinché completassero il periodo di latenza, in condizioni controllate, nelle tre settimane successive. Dopo il periodo di latenza, da ogni gruppo sono stati prelevati alcuni insetti, ora adulti, e sono stati messi a contatto con piante di fava per verificare la loro capacità di trasmissione del fitoplasma. Gli insetti erano precedentemente stati testati a uno a uno per la presenza del fitoplasma con PCR, e lo stesso è stato fatto con le piante di fava a un mese dall'inoculo. Ulteriori test sono stati effettuati per stabilire i ceppi di appartenenza dei fitoplasmi e il titolo con cui erano diffusi nelle piante sintomatiche, così da stabilire se ci fossero correlazioni tra efficienza di acquisizione del fitoplasma da parte dell'insetto vettore e concentrazione del patogeno nella pianta ospite.

Una seconda fase di esperimenti è stata effettuata in laboratorio, e ha coinvolto piante di fava già affette da FD e insetti vettori sani: 200 neanidi di *S. titanus* sono state messe a contatto per una settimana con le piante infette di *Vicia faba*, dopodichè sono state depositate su viti sane per completare la crescita. 30 giorni dopo l'inoculo gli insetti adulti sono stati testati per la presenza del fitoplasma, mentre 40 giorni dopo l'inoculo anche le piante di fava sono state sottoposte a questi test.

Al termine degli esperimenti, è emerso che tutti gli insetti nutriti su piante guarite di Barbera erano negativi alla presenza del fitoplasma, mentre solo uno (lo 0,8%) di quelli esposti a Nebbiolo era risultato positivo. Tra gli insetti che invece si erano nutriti su piante sintomatiche, 48 su 150 di quelli nutriti su Barbera e 23 su 200 di quelli nutriti su Nebbiolo erano diventati vettori. Di tutti gli insetti esposti a viti sintomatiche di Nebbiolo e Barbera, solo il 3% e il 7% rispettivamente hanno poi trasmesso il fitoplasma alle piante sane di fava.

Per quanto riguarda la concentrazione, test statistici ANOVA hanno dimostrato come varietà e periodo dell'anno siano due fattori influenti a riguardo: la cv Barbera ha mostrato concentrazioni più alte del Nebbiolo e in estate le concentrazioni erano maggiori che in primavera. Infine è stata dimostrata anche una forte correlazione tra concentrazione del patogeno e efficienza di acquisizione.

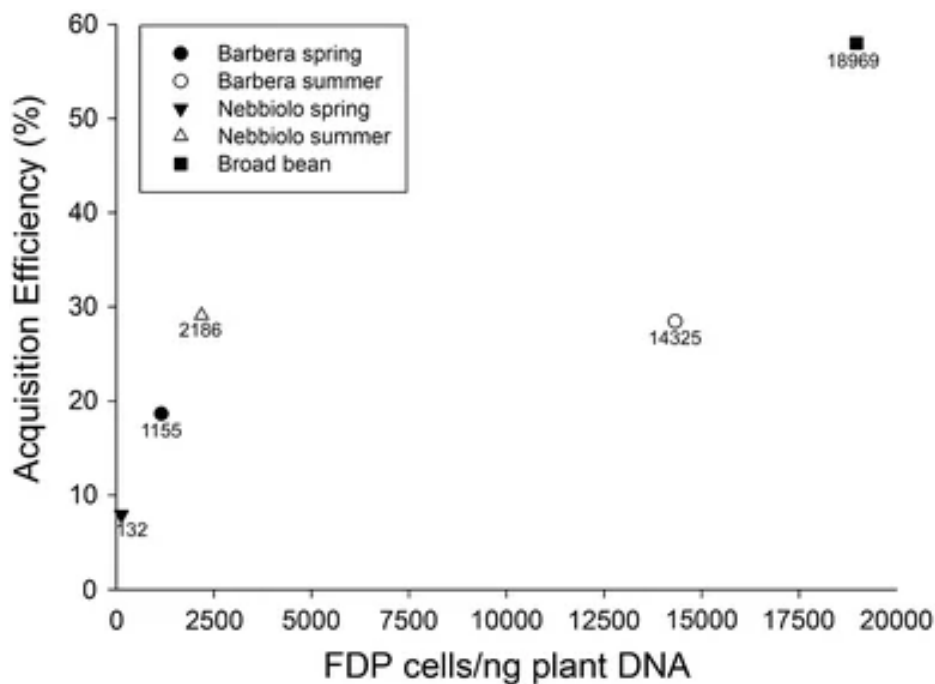


Fig. 8: all'aumentare della concentrazione di cellule di FDP nella pianta ospite (asse delle ascisse) aumenta l'efficienza di acquisizione da parte del vettore (asse delle ordinate) (Galletto *et al.*, 2014).

Il risultato più importante di questa ricerca è stato dimostrare che le piante guarite da FD non costituiscono più una fonte di inoculo del patogeno. Si è inoltre avuta ulteriore conferma di quanto varietà e periodo dell'anno influiscano sulla contagiosità di FD, oltre che sulla severità dei sintomi e le possibilità di guarigione. La maggior parte delle neanidi di *S. titanus* tendono a svilupparsi tra fine maggio e inizio giugno, quando la possibilità di contrarre il fitoplasma sono basse, mentre una volta raggiunta l'età adulta la concentrazione del fitoplasma della flavescenza nelle piante è molto più alta, ma al contempo è più basso il rischio di contagio da parte degli insetti che contraggono il fitoplasma in questo periodo, poichè il lungo tempo di latenza del fitoplasma (un mese circa) fa sì che gli adulti di *S. titanus* siano contagiosi solo per un breve periodo prima che concludano il proprio ciclo vitale, periodo che tuttavia coincide con la conclusione dei trattamenti per via della vendemmia. Il controllo della popolazione adulta deve quindi riguardare sia quegli esemplari che hanno già acquisito il patogeno da neanidi che quelli già adulti che potrebbero ancora diventare infettivi.

La nozione che la concentrazione del patogeno è maggiore in estate piuttosto che in tarda primavera può essere utile per meglio regolare la strategia di trattamenti contro l'insetto vettore.

4.2 Acibenzolar-S-Metile come strumento di prevenzione

L'uso della resistenza indotta come metodo di lotta contro attacchi di patogeni è uno strumento promettente e a basso impatto ambientale per la protezione della pianta. L'Acibenzolar-S-metile è un analogo funzionale dell'acido salicilico, un fitormone, e come quest'ultimo è in grado di attivare la resistenza sistemica nell'ambito di una lunga serie di interazioni pianta-patogeno. Le prime sperimentazioni con questa sostanza, anche nota come BTH, sono state svolte da Dimitrios E. Miliordos *et al.* nel 2016, e pur non avendo dato i risultati sperati, hanno dimostrando una limitata efficacia che suggerisce che una prosecuzione della ricerca in questa direzione potrebbe portare a risultati interessanti.

Trattamenti a base di induttori di resistenza erano già stati sperimentati per quanto riguarda il fitoplasma responsabile per il *Bois Noir*: i due elicitori che hanno mostrato i risultati migliori erano rispettivamente a base di benzothiadiazolo (BTH) e di due formulazioni a base di glutatione più oligosaccarine. Pure in questo caso, però, i trattamenti hanno mostrato efficacia limitata (Romanazzi *et al.*, 2013).

Il lavoro condotto da Miliordos *et al.*, (2016) aveva due scopi: trovare il modo di prevenire il contagio da parte del vettore *S. titanus* e indurre la guarigione in esemplari colpiti dalla malattia. Per il primo scopo, l'esperimento consisteva nell'esporre piante sane a cui era stato applicato il BTH, a vettori infetti, mentre per il secondo scopo sono state identificate delle piante infette e vi si è applicato il BTH per tre anni consecutivi.

Per il primo esperimento sono state usate due specie di cicalina: il ben noto *S. titanus*, il vettore naturale, e *Euscelidius variegatus*, cicalina usata comunemente in laboratorio perchè in grado di fare più cicli vitali all'anno. Il primo è stato usato per inoculare FD in piante di vite sane mentre il secondo aveva lo scopo di mantenere in condizioni di laboratorio il ceppo del fitoplasma di FD-C su piante di *V. faba*.

Per la prima fase di esperimenti, il ceppo di FD-C è stato isolato da piante di vite infette del Piemonte, dopodichè è stato trasmesso a una pianta di vecchia tramite *S. titanus* e da lì la trasmissione è avvenuta poi a tutte le altre piante, dopodichè queste sono state messe a contatto con neanidi di *E. variegatus* per una settimana. Le neanidi sono poi state trasferite su piante di sane di avena per tre settimane affinché raggiungessero lo stato adulto. Infine gli insetti ormai adulti sono stati nuovamente trasferiti su piante sane di fava. Le piante ora inoculate con il fitoplasma di FD sono state tenute per un mese in condizioni controllate a temperature tra 23 e 25 °C per osservare lo sviluppo

di sintomi. Le piante di vecchia sono state poi usate come fonte di inoculo per esemplari sani di *S. titanus*.

Nella seconda fase sono state usate piante di vite della cv Barbera di due anni, tenute in condizioni controllate in laboratorio. A inizio giugno è avvenuto l'inoculo per mezzo di esemplari infetti di *S. titanus*. Nell'esperimento sono state coinvolte 80 piante, di cui 40 trattate con una soluzione contenente 2.4 mM di BTH e 40 con semplice acqua. Le applicazioni sono state eseguite ogni 10 giorni fino a fine settembre, e due mesi dopo, a dicembre, tutte le piantine sono state potate e piantate in un vigneto sperimentale dove, l'anno seguente, sono state coltivate secondo le pratiche convenzionali. Da maggio a settembre, le 40 piante trattate in laboratorio con BTH hanno ricevuto nuovamente i trattamenti, con le stesse concentrazioni e intervalli di tempo di 10 giorni. Le piante sono poi state controllate per la presenza di sintomi e sono stati effettuati test PCR per riscontrare la presenza o assenza del fitoplasma. Le sperimentazioni sono state ripetute in questo modo anche nei due anni seguenti, fino al 2013.

Questo esperimento è stato poi ripetuto su piante di vite propagate *in vitro* e poi trasportate in vasi, stando sempre in ambiente controllato. In questo caso le piante coinvolte erano 20, di cui 10 trattate con il BTH e 10 con acqua. 5 foglie da ciascuna pianticella sono state sottoposte a PCR per valutare la presenza di FDP, sia 5 che 11 settimane dopo l'inoculo.

Lo studio sull'induzione di guarigione è stato effettuato in un vigneto di cv Barbera a Cocconato, in provincia di Asti. Tra giugno e luglio 2011 sono state identificate le piante infette da FD e dei test PCR sono stati svolti su foglie da lì prelevate per confermare la presenza del patogeno. Metà delle 72 piante infette, distribuite in modo casuale nel vigneto, sono state trattate con BTH ogni 10 giorni tra metà maggio e metà settembre per tre anni consecutivi (2011-2013). A settembre di ogni anno ogni pianta trattata veniva testata per la presenza del fitoplasma di FD, e nel settembre dell'ultimo anno ulteriori analisi sono state condotte per valutare la concentrazione del fitoplasma nelle piante trattate e in quelle non trattate.

La prima fase di sperimentazioni, che aveva lo scopo di valutare l'efficacia di BTH nel contrastare il contagio da parte dell'insetto vettore, ha dato i seguenti risultati: 8 piante su 113 trattate con BTH hanno contratto FD nel corso dei tre anni dell'esperimento, mentre delle 101 su cui era stata applicata solo acqua, 18 avevano sviluppato sintomi. Le analisi del chi-quadro hanno dimostrato un'effettiva efficacia

dei trattamenti negli anni 2012 e 2013, ma non nel 2011. Le analisi sugli insetti vettori hanno mostrato valori tra il 60% e il 70% di esemplari infetti nel corso dei tre anni.

La sperimentazione *in vitro* ha mostrato risultati meno incoraggianti: 8 piante su 10 di quelle trattate con BTH hanno sviluppato sintomi, contro le 6 su 10 delle piante controllo (il test del chi-quadro ha però dimostrato che queste differenze non erano rilevanti). In questo caso 17 su 20 esemplari di *S. titanus* avevano il fitoplasma.

Il terzo esperimento, riguardante l'induzione di guarigione, ha avuto ancora una volta risultati differenti da quelli sperati, con un tasso di guarigione del 58% tra le piante trattate e del 73,5% tra le piante controllo. Ancora una volta le analisi statistiche hanno dimostrato che le differenze tra le percentuali di guarigione non erano rilevanti. La quantificazione del fitoplasma nelle piante infette, fatta alla fine del terzo anno di sperimentazione, ha dimostrato anche in questo caso l'inefficacia dei trattamenti con Acibenzolar-S-Metile.

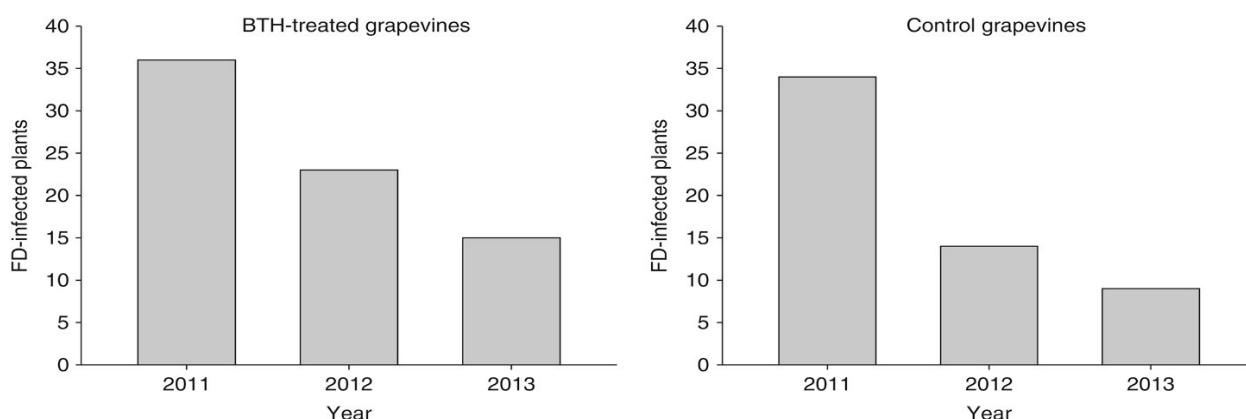


Fig. 9: la variazione del numero di piante infette nel corso dei tre anni dell'esperimento: a sinistra sono raffigurate le piante trattate con BTH, a destra le piante controllo (Miliordos *et al.*, 2016).

Le cause della differenza tra i risultati mostrati dalle viti nel campo rispetto a quelle coltivate *in vitro* non sono ben chiare ma potrebbero essere imputabili alla natura erbacea delle viti *in vitro*, poichè precedenti studi fatti su altre piante erbacee già avevano evidenziato una maggiore suscettibilità di quest'ultime all'attacco di fitoplasmi; altre motivazioni potrebbero essere legate all'assenza di portinnesti, o a differenti metodi di nutrizione da parte degli insetti vettori. Curiosamente, questi esperimenti hanno dato risultati molto diversi rispetto a quelli svolti sul Bois Noir da Romanazzi *et al.*, che hanno invece dimostrato con successo l'efficacia di BTH. Le motivazioni dietro tali differenze potrebbero essere molteplici: può darsi che la resistenza indotta da BTH sia attiva contro il fitoplasma associato a BN ma non contro quello associato a FD, oppure potrebbero aver influito le differenti condizioni

climatiche nelle due regioni in cui si sono svolti gli esperimenti (la Toscana nel caso dell'esperimento di Romanazzi *et al.*), o ancora le due differenti cv (Chardonnay nel caso di Romanazzi *et al.*) potrebbero aver reagito in modo diverso ai trattamenti. Ciò che in ultima analisi può essere concluso da queste sperimentazioni è che ancora si sa molto poco sulle interazioni pianta-patogeno nell'ambito delle fitoplasmosi della vite, e che molta ricerca deve ancora essere svolta intorno allo studio degli elicitori contro il fitoplasma di FD e a come questi scatenino una risposta immunitaria da parte dell'ospite. Solo una volta che questi meccanismi saranno del tutto chiariti sarà possibile riprendere con le sperimentazioni riguardanti possibili induttori di resistenza quali il BTH.

5.TECNICHE DIAGNOSTICHE PIÙ RECENTI

5.1 Diagnosi dei giallumi della vite tramite intelligenza artificiale

Con l'enorme sviluppo delle intelligenze artificiali osservato negli ultimi anni, sta prendendo sempre più piede l'uso di queste tecnologie anche in ambito viticolo, nello specifico nella diagnosi delle malattie. Riuscire a individuare tempestivamente la presenza di piante malate di giallumi è fondamentale per neutralizzare sul nascere un focolaio.

A tal proposito, merita attenzione il lavoro svolto da Albert Cruz *et al.*, pubblicato nel 2019 sulla rivista "Computers and Electronics in Agriculture". Lo scopo del lavoro dei ricercatori è stato quello di sviluppare uno strumento di diagnosi più pratico e soprattutto più preciso dell'occhio umano. Tale strumento si è rivelato essere un algoritmo di *Deep Learning*, che avrebbe sfruttato l'intelligenza artificiale per imparare a riconoscere i sintomi dei giallumi della vite attraverso foto di foglie di piante infette. I campioni usati per l'esperimento sono stati prelevati da vigneti situati in Toscana tra luglio e ottobre 2017. Per accertarsi che tali foglie fossero realmente infette, sono state prima sottoposte a test PCR per verificare la presenza del fitoplasma.

Solo dopo aver accertato l'infezione, le immagini delle foglie sono state "date in pasto" all'algoritmo per insegnargli a riconoscere i sintomi dei giallumi. Oltre alle foglie affette da giallumi, sono poi state inserite anche immagini di foglie sane o

affette da altre patologie, per la precisione Mal dell'Esca, Black Rot (o Marciume Nero), Peronospora e altre patologie non meglio specificate. Poichè l'algoritmo necessita di decine di migliaia di foto per diventare preciso, i ricercatori hanno attuato un lavoro di *data augmentation*, effettuato in due modi:

- 1- Procurandosi ulteriori immagini di foglie di vite da banche dati di pubblico dominio, ad esempio PlantVillage;
- 2- Applicando tecniche di image processing, che consistono nel ruotare in direzioni diverse, rovesciare o traslare di alcuni pixel una stessa foto in modo da fornire all'algoritmo numerose nuove immagini e insegnandogli inoltre a riconosce le foglie anche quando sono leggermente ruotate o decentrate (purchè il picciolo punti verso il basso e l'apice della foglie verso l'alto).

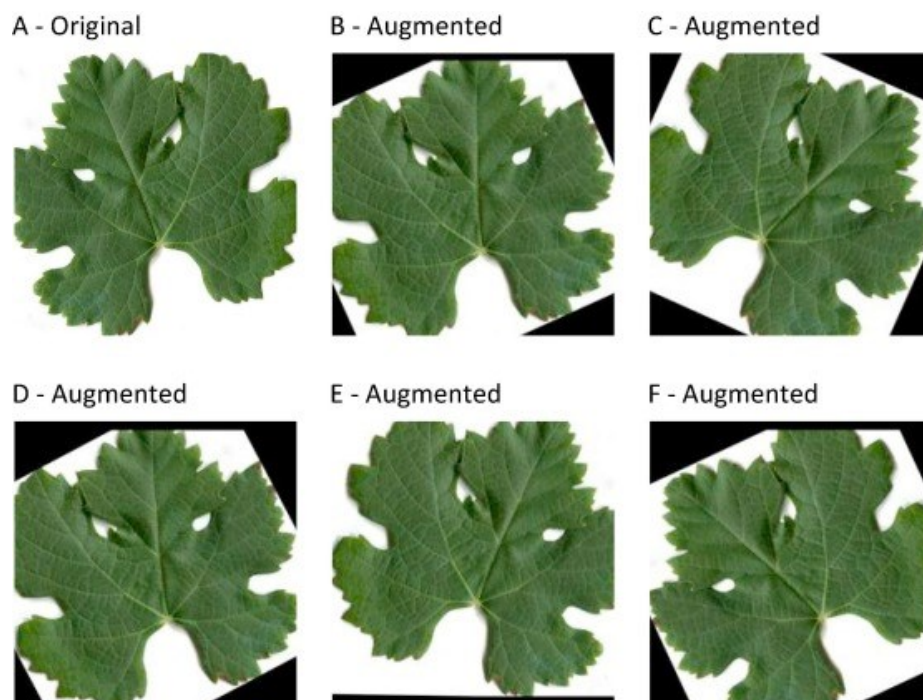


Fig. 10: 5 nuove immagini sono generate a partire dalla foto originale tramite il data augmentation (Cruz *et al.*, 2019).

I ricercatori si sono serviti di sei diversi algoritmi (o architetture) di deep learning; ovvero AlexNet, GoogLeNet, Inception v3, ResNet-50, ResNet-101 e SqueezeNet, dopodichè hanno fornito loro le immagini delle foglie suddivise nelle sei popolazioni corrispondenti alle patologie da cui erano affette, più le foglie sane usate come controllo. Da ciascuna popolazione sono state scelte 2680 immagini in modo casuale, per un totale di 16'800 immagini. Di ogni cartelle da 2680 immagini, il 70% sono state usate per allenare gli algoritmi mentre il 30% restante è stato usato per testarli e confrontarli tra loro. Dopo aver ripetuto questo esperimento cinque volte, i

ricercatori hanno concluso che ResNet-101 è l'architettura migliore, sebbene la minore complessità di ResNet-50, il secondo classificato, renda più conveniente e pratico quest'ultimo.

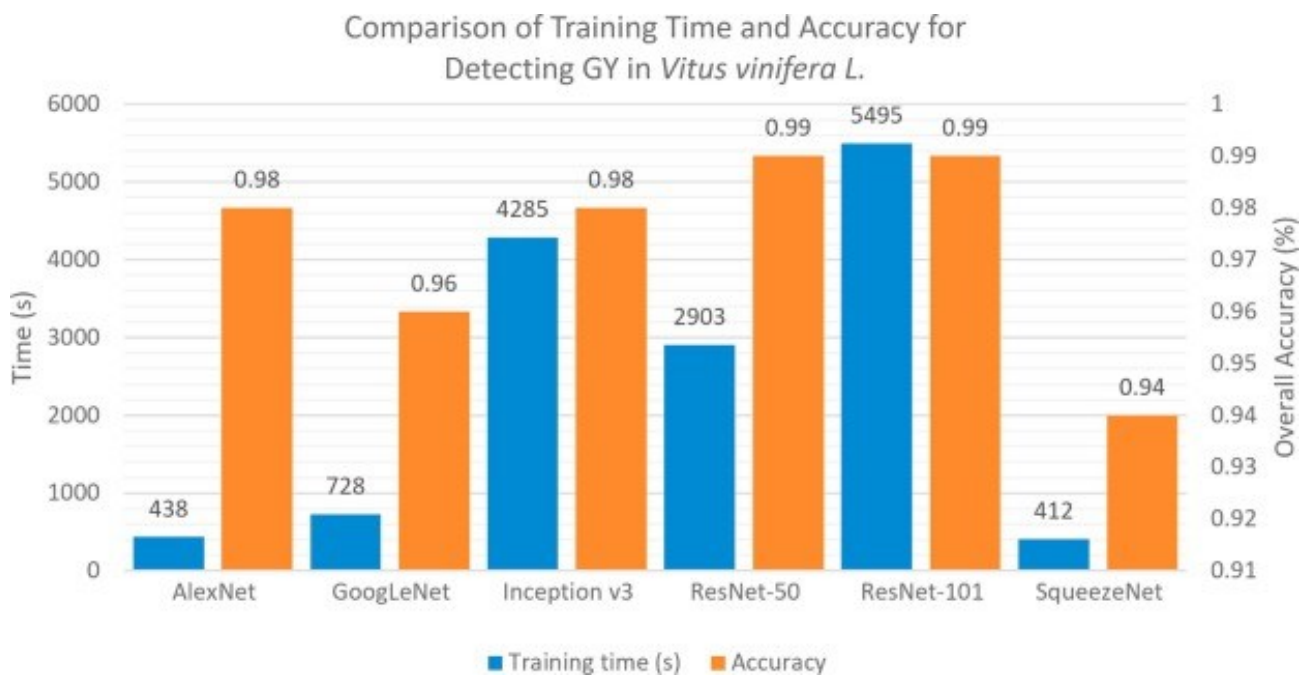


Fig. 11: grafico raffigurante il confronto fra i sei algoritmi usati, in termini di tempi di allenamento a accuratezza nell'individuare sintomi di Giallumi (Cruz *et al.*, 2019).

La seconda fase ha avuto lo scopo di confrontare una configurazione con il deep learning con una senza: il sistema sprovvisto di deep learning si è rivelato così carente che è stato necessario semplificare il quesito, rendendolo di tipo binario, ovvero presentando al sistema solo foto di foglie sane o di foglie malate di giallumi della vite, e rimuovendo inoltre tutte le immagini ottenute con le tecniche di data augmentation.

I ricercatori volevano stabilire se la performance più carente del sistema sprovvisto di deep learning lo rendesse comunque una valida alternativa all'altro sistema, che richiede lunghi tempi di training e GPU costose per essere messo a punto. L'esperimento ha dimostrato che nonostante costi e tempi maggiori, la tecnologia deep learning resta la migliore alternativa, con una percentuale di accuratezza del 92.02% contro il 26.79% registrata dalla configurazione priva di tecnologia deep learning.

Per il terzo esperimento i ricercatori hanno voluto comparare il sistema diagnostico a intelligenza artificiale con la capacità di screening dei sintomi di operatori umani. Per questo esperimento sono stati usati 12 volontari, di cui 5 esperti e 7 principianti sottoposti a un corso di un'ora sul riconoscimento dei giallumi. Il risultato di questo

terzo e ultimo esperimento è stato lampante: la diagnosi per mezzo di intelligenza artificiale era notevolmente più affidabile di quella basata sull'occhio umano.

CONSIDER THE FOLLOWING IMAGE:
DOES THE IMAGE HAVE GRAPEVINE YELLOWS?



Fig. 12: una delle immagini fornite ai volontari per valutarne le capacità di diagnosi (Cruz *et al.*, 2019).

HOW DID YOU DO?

| True pos. | False neg. | False pos. | True neg. |
|-----------|------------|------------|-----------|
| 21 | 23 | 1 | 71 |

START NEW TRIAL (RESET ABOVE)

Questi esperimenti hanno reso ancor più evidente la grande utilità dell'intelligenza artificiale in ambito diagnostico, e con lo sviluppo progressivo di questa tecnologia, non è difficile immaginare che col passare del tempo possa diventare sempre più accessibile e prevalente.

5.2 Diagnosi di giallumi tramite sistemi UAV (Unmanned Aerial Vehicle)

Le indagini svolte in vigneto per valutare la presenza e diffusione di determinate patologie sono solitamente fatte a piedi, o talvolta usando piccoli mezzi a motore, con il rischio di recare danni alle piante unito a quello, già menzionato nello scorso capitolo, di fare diagnosi sbagliate. La tecnologia del remote sensing (RS) è già considerata un sistema pratico, non invasivo, veloce e a basso costo per ottenere diagnosi accurate in molti altri contesti.

Il lavoro pubblicato da Johanna Albetis *et al.* sulla rivista online MDPI nel 2017 ha esplorato proprio questo interessante sistema diagnostico. L'utilizzo di droni per rilevare la presenza di piante infette nei vigneti è già stato sperimentato con successo nell'ambito di diverse altre patologie, come il mal dell'esca, la Fillossera, la *Plasmopara viticola* e il virus dell'accartocciamento fogliare. Questi droni sono in grado di fornire immagini ad altissima risoluzione che ben si adattano al monitoraggio dei vigneti.

Gli esperimenti condotti dai ricercatori avevano lo scopo di valutare l'efficacia e l'utilità delle immagini multispettrali raccolte dal drone, testando l'abilità che le tre variabili derivanti dai dati forniti (bande spettrali, indici di vegetazione e parametri biofisici) avevano nell'individuare correttamente i sintomi di flavescenza dorata in cultivar sia bianche che rosse.

Le sperimentazioni sono state effettuate nel sud-ovest della Francia, nella regione della Gaillac. Sono stati monitorati quattro vigneti, due di cultivar rosse e due di cultivar bianche, provenienti da due località. È stato osservato come le cultivar a bacca rossa (Gamay e Durard) fossero maggiormente attaccate da FD rispetto a quelle a bacca bianca (Sauvignon e Colombard).

La raccolta dei dati è avvenuta a Settembre 2015, poco prima della vendemmia e quando i sintomi di FD erano maggiormente evidenti, ed è stata effettuata sia sul campo, con l'obiettivo di localizzare le piante malate e di segnarne le coordinate GPS, sia per mezzo di voli UAV. Le piante malate sono state suddivise in quattro gruppi a seconda della severità della patologia, determinata dall'estensione in percentuale dei sintomi nella pianta (fig. 13). I dati raccolti da terra includevano anche l'estensione degli appezzamenti, l'angolo di orientamento dei filari, il numero di ceppi per ettaro e lunghezza e larghezza medie delle piante.

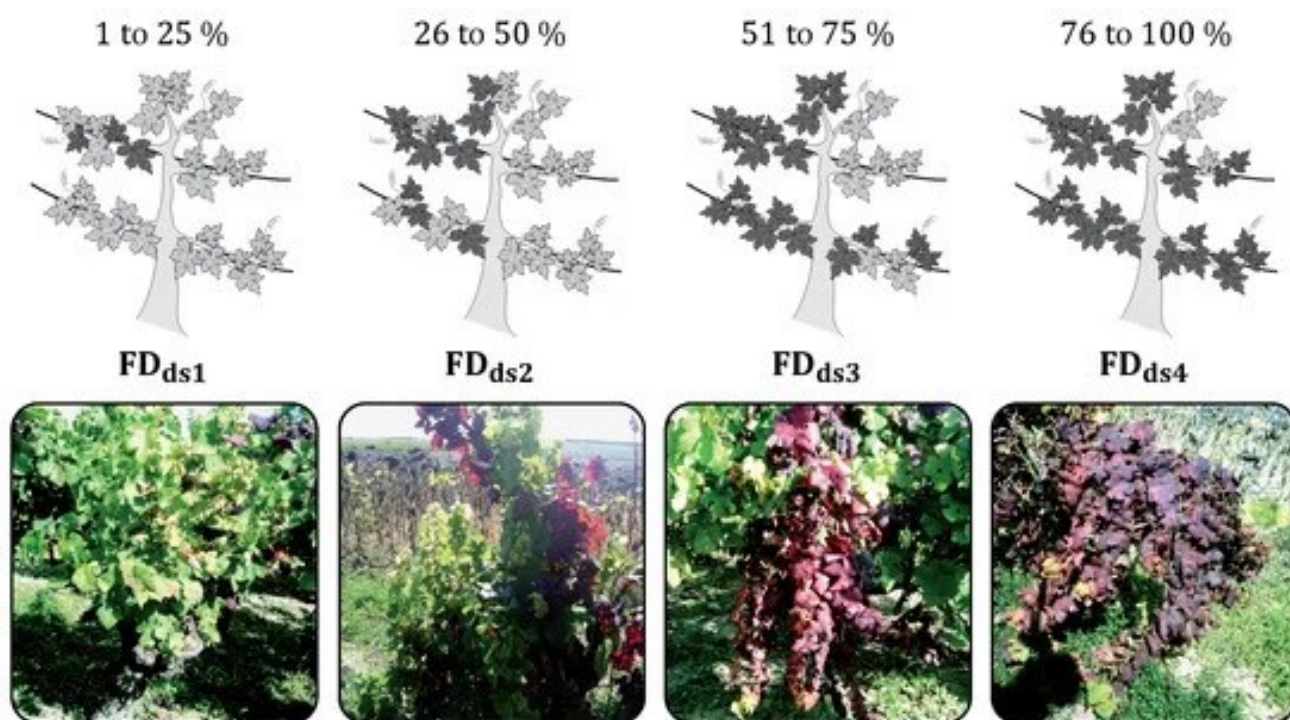


Fig. 13: le quattro categorie di severità della malattia in cui sono state catalogate le viti infette (Albetis *et al.*, 2017).

Per l'acquisizione delle immagini multispettrali, il drone era equipaggiato di un sensore composto a sua volta di cinque diversi sensori indipendenti in grado di catturare altrettante bande spettrali: blu, verde, rossa, *red edge*, e *near infrared*. Il drone è stato fatto volare a una quota di 120 m e ad una velocità di 6 m/s. Le varie immagini raccolte dal drone sono poi state assemblate come un mosaico per creare un'unica immagine che raffigurasse l'appezzamento per intero, dopodichè sono state aggiunte le posizioni delle viti malate, precedentemente raccolte sul campo, sotto forma di pallini rosa la cui dimensione rispecchiava la severità della malattia (fig. 14).

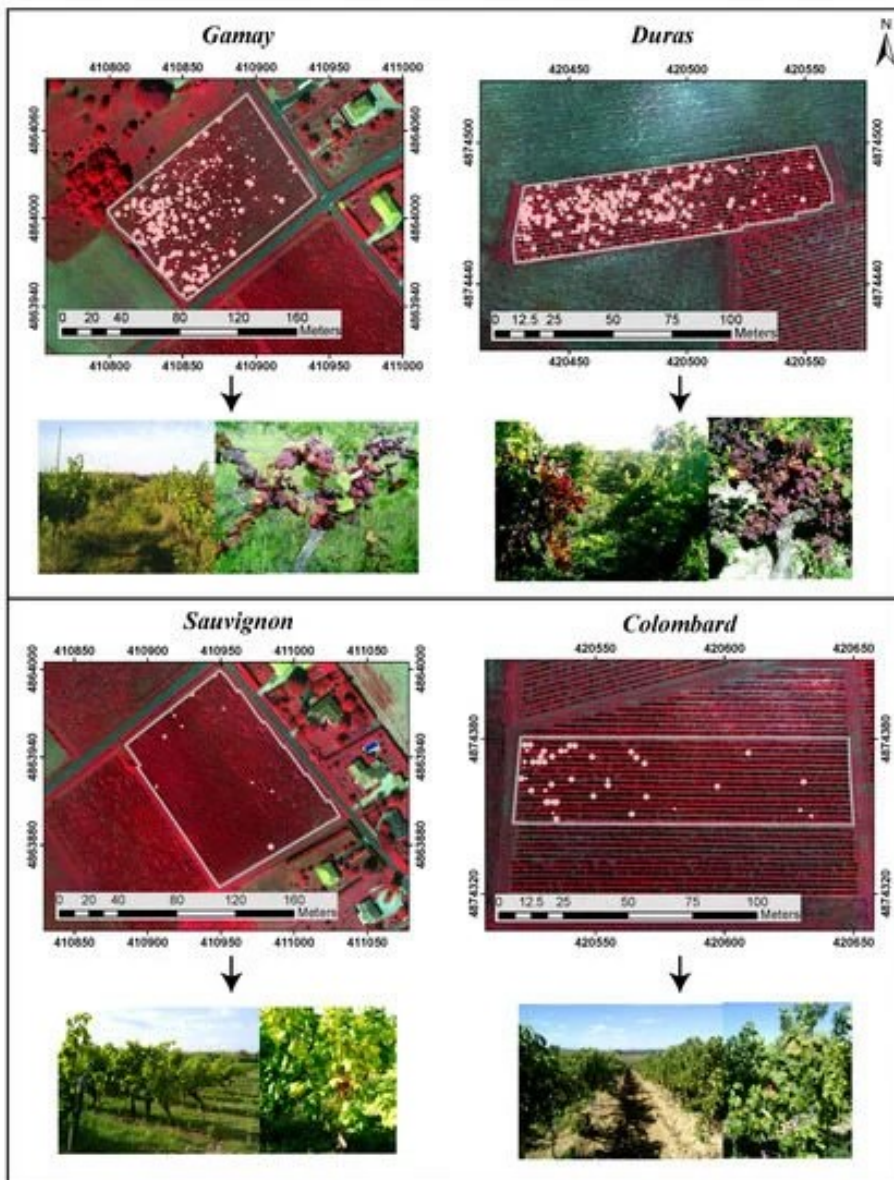


Fig. 14: le immagini raccolte dal drone nei quattro vigneti presi in esame. I pallini indicano le viti malate, e la loro grandezza dipende dalla severità della patologia (Albetis et al., 2017).

Undici indici di vegetazione e quattro parametri biofisici sono stati estrapolati dalle cinque bande spettrali ricavate dalle immagini fornite dal UAV, con lo scopo di distinguere tra piante asintomatiche e piante sintomatiche. Gli indici di vegetazione sono stati usati per monitorare e mappare le variazioni di biomassa e di produttività e per stimare i pigmenti fogliari. Molti di questi indici sono resistenti alle variazioni di intensità luminosa, il che rende più versatile l'uso di questa tecnologia.

Per generare i parametri biofisici è stato usato un software, Overland, sviluppato con lo scopo di raccogliere parametri vegetativi, come il LAI, da immagini satellitari, in modo da creare mappe utili ai coltivatori. In Francia, questa tecnologia è stata introdotta nel 2002, e da allora si è diffusa fino ad essere utilizzata su circa 80'000 appezzamenti coltivati nel 2016. Questi parametri sono utili per determinare il

contenuto fogliare, per cm^2 , di clorofilla, antociani e carotenoidi, oltre che la copertura di vegetazione verde.

Per rendere possibile il riconoscimento da parte del drone di piante con sintomi di FD sono state usate tre categorie di variabili estrapolate dalle immagini fornite dal UAV, ovvero:

1. Le cinque bande spettrali;
2. Gli undici indici di vegetazione;
3. I quattro parametri biofisici.

Una curva ROC (Receiver Operator Characteristics) è stata usata per determinare la capacità di ciascuna variabile di distinguere i pixel che mostravano FD da quelli che mostravano piante asintomatiche. Sono stati considerati quattro possibili risultati provenienti dalla classificazione dei pixel da parte della curva ROC: Veri positivi, falsi positivi, veri negativi e falsi negativi. Dopo ciò sono stati calcolati due indicatori per valutare la performance della curva classificativa: sensibilità e specificità. La sensibilità è pari al rapporto tra veri positivi e la somma di veri positivi e falsi negativi, mentre la specificità è il rapporto tra veri negativi e la somma di veri negativi e falsi positivi. Con questi indicatori è stata costruita una curva ROC in cui la sensibilità è una funzione di $1 - \text{specificità}$.

L'area che sottostà alla curva ROC ha un valore compreso tra 0.0 e 1.0, dove 1.0 corrisponde a una assenza di errori di classificazione (non ci sono né falsi positivi né falsi negativi), mentre un valore pari a 0.5 è dovuto a un classificatore casuale, in cui si ha un alto numero di risultati scorretti.

Utilizzando gli strumenti della curva ROC e dell'area ad essa sottesa, sono stati fatti esperimenti per valutare prima quali delle 20 variabili complessive provenienti dalle tre categorie di cui sopra fossero le più efficaci, ovvero quali restituissero i valori di area sottostante alla curva ROC più vicini a 1, e poi per valutare l'accuratezza delle previsioni nel determinare la severità delle infezioni da FD. I risultati di questi esperimenti sono stati fortemente influenzati dalla varietà presa in considerazione: nella cultivar di Sauvignon, ad esempio, la banda spettrale più efficace nell'individuare i sintomi era quella del near-infrared (NIR), mentre per le altre tre varietà ha riscosso più successo la banda del verde (sebbene per la Colombard, l'altra varietà bianca, il valore registrato per il verde era di appena 0.68). Questa variabilità si è notata anche per le altre due categorie di variabili, ovvero gli indici di vegetazione e i parametri biofisici.

Sia per le cultivar a bacca bianca che per quelle a bacca rossa gli indici di vegetazione hanno mostrato in media risultati migliori delle bande spettrali, con alcune variabili in grado di sfiorare, e talvolta raggiungere, il valore massimo 1, nelle cultivar a bacca rossa. L'indice di vegetazione più adatto, per tutte le cv, è stato il Green-Red Vegetation Index, o GRVI. Per quelle a bacca bianca la diagnosi di FD si è rivelata nel complesso più difficile, tanto che l'indice con la minore possibilità di errori (il parametro biofisico sul contenuto di carotenoidi per cm²) ha ottenuto appena un 0.80. Il minor successo con le diagnosi è stato ribadito dai parametri di sensibilità e specificità.

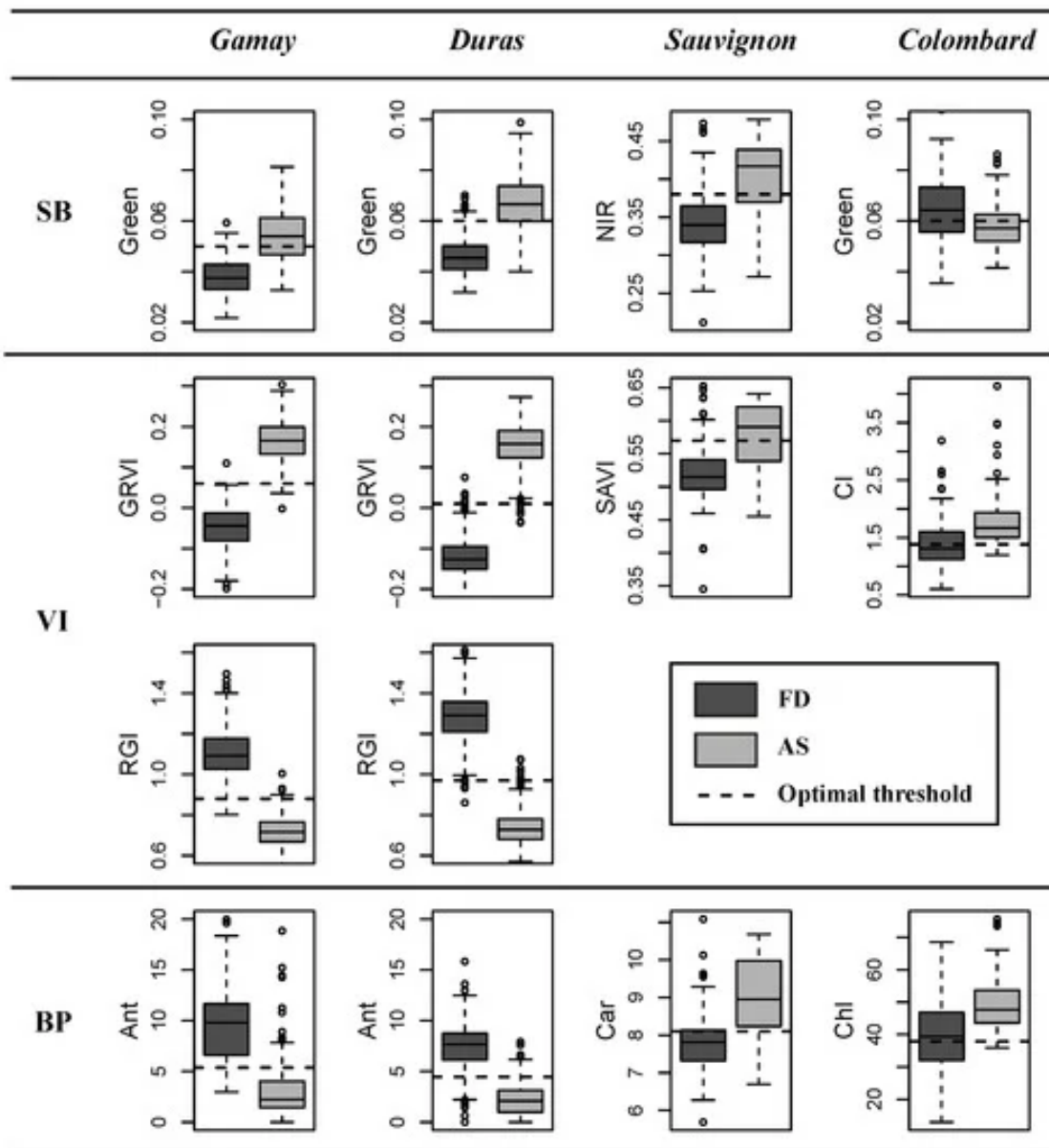


Fig. 15: schema raffigurante, per ogni insieme di variabili, quelle più adatte per ciascuna cultivar a riconoscere i sintomi di FD. Si nota chiaramente come, nelle cv a bacca bianca, siano in generale meno accentuate le differenze tra piante malate (box grigio scuro) e asintomatiche (box grigio chiaro), rispetto alle cv a bacca rossa (Albetis et al., 2017).

Una seconda analisi, di tipo multivariato, è stata poi effettuata sulla curva ROC, dove è stata esaminata la risposta binaria (FD o asintomatica) di modelli combinati. Questi modelli sono stati impostati come modelli lineari generalizzati (l'acronimo inglese è GLM) ed è stato utilizzato il test di verifica di informazioni Akaike (AIC) per valutare se la complessità di questi modelli ne giustificasse l'accuratezza: bassi valori di AIC indicano modelli più esplicativi e sono quindi auspicabili. I ricercatori hanno poi selezionato i GLM che avevano ottenuto i migliori punteggi AIC. Anche in questo caso è stata utilizzata l'analisi della curva ROC per determinare la soglia ottimale dei GLM e per stimare la performance di classificazione in termini di sensibilità, specificità e area sottesa alla curva ROC. Infine, a ogni vigneto è stato assegnato un insieme dei migliori classificatori, come era stato fatto con la precedente analisi univariata.

Il modello iniziale constava di tutte e 20 le variabili, dopo l'analisi si è passati a modelli semplificati per ciascuna delle quattro cultivar, con l'obiettivo di ottenere valori AIC più bassi possibile. Ancora una volta, questo lavoro si è dimostrato più difficile per le varietà bianche, che hanno richiesto modelli semplificati con un maggior numero di variabili e punteggi AIC più alti rispetto alle varietà rosse. Nel complesso comunque, i valori medi di AUC (area sottostante la curva), sensibilità e specificità erano tutti più vicini a 1 rispetto ai risultati delle analisi univariate, e proprio le cv bianche sono state quelle che hanno registrato i miglioramenti più evidenti. Anche in questo caso il GRVI è stato l'indice di vegetazione più efficace per tutte le cv, e pertanto è presente in tutti e quattro i modelli semplificati.

Dopo aver confrontato i risultati delle analisi univariate e di quelle multivariate, il GLM si è rivelato il modello diagnostico migliore per tre cv (Duras Sauvignon e Colombard) mentre per una, Gamay, ha dato risultati leggermente migliori l'approccio univariato, in particolare per gli indici vegetativi GRVI e RGI (Red-Green Index)

Nell'ultima parte dell'esperimento sono state confrontate le diagnosi effettuate dal drone con quelle fatte dagli operatori a terra, per valutare l'efficacia rispettivamente del modello GLM nelle cv Duras e Colombard e dell'indice GRVI nella cv Gamay. Per quanto riguarda l'appezzamento con Sauvignon, i dati a terra non erano sufficienti per fare questa valutazione. L'errore più comune si è rivelato la classificazione di pixel asintomatici come malati di FD, dovuto a ombreggiamento, presenza di altre malattie oppure di suolo nudo laddove il modello si aspettava di vedere una pianta. Un primo miglioramento si potrebbe notare aumentando la risoluzione delle immagini, dopodiché si potrebbero aggiungere una o più classi corrispondenti ad altre malattie, carenze o stress di vario tipo.

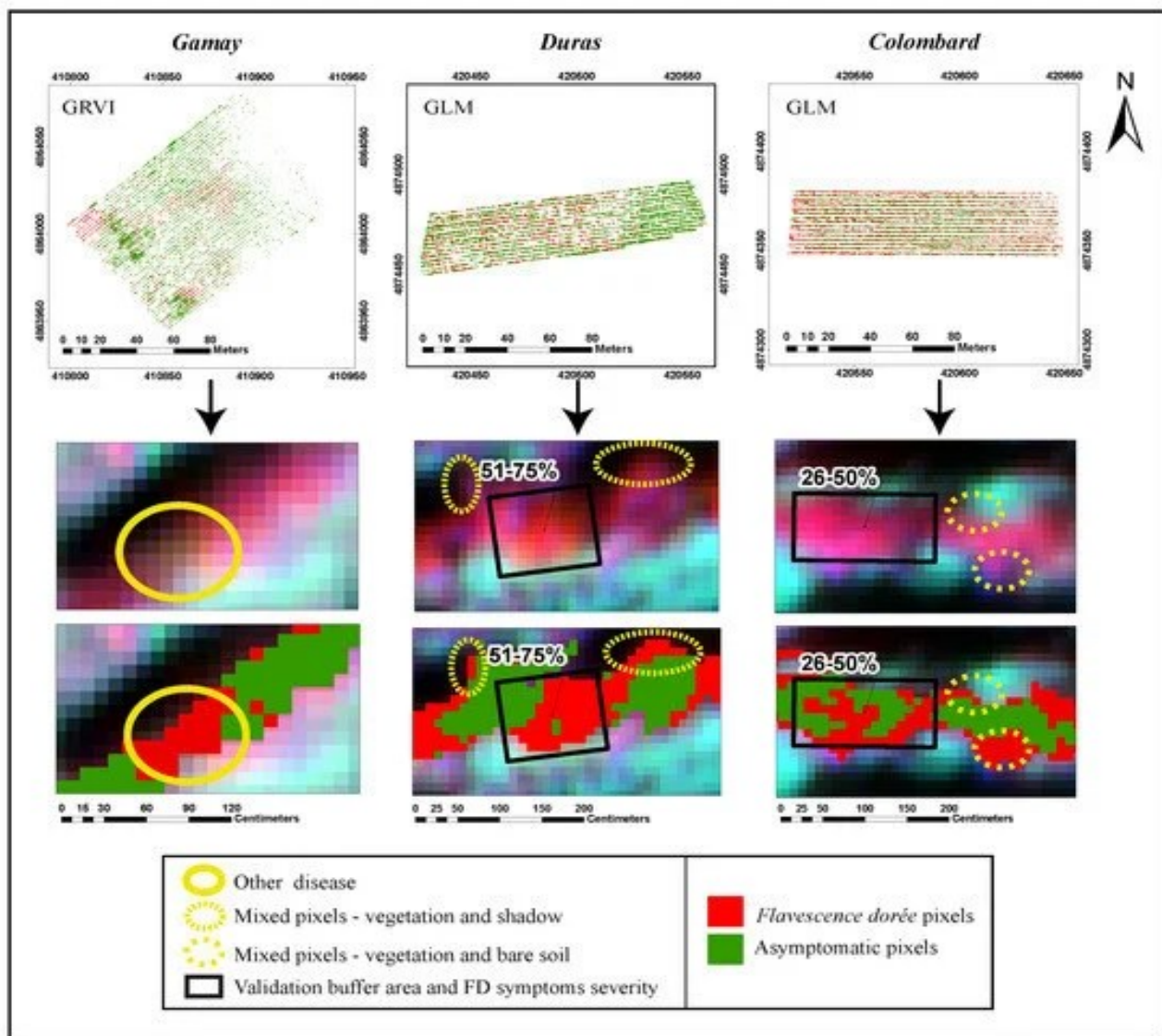


Fig. 16: classificazione delle viti asintomatiche (in verde) e malate (in rosso) da parte del sistema UAV, nei tre vigneti presi in esame per il confronto finale (tre immagini più in alto); gli errori di classificazione più comuni commessi dal sistema (confusione tra vegetazione e ombra oppure tra vegetazione e suolo) (Albetis *et al.*, 2017).

Nelle cv bianche nessuna delle variabili singole e nemmeno il GLM hanno dato risultati soddisfacenti, con una percentuale di errori tra il 10 e il 20%. Per quanto riguarda le cv rosse, due indici di vegetazione, RGI e GRVI e il parametro biofisico ant., tutti legati alla presenza di antociani nelle foglie, si sono mostrati molto efficaci nel distinguere correttamente i pixel malati da quelli asintomatici, con una percentuale di errore che non ha mai superato il 12%.

Considerando che queste erano le prime sperimentazioni in questo ambito, i risultati sono stati estremamente promettenti, e con le giuste correzioni nuove sperimentazioni potrebbero rendere finalmente accessibile ed efficace questo strumento che ha già mostrato di avere grandi potenzialità.

6.CONCLUSIONI

La Flavescenza Dorata pone una seria minaccia al mondo della viticoltura, e ad oggi si sa ancora troppo poco per porre un decisivo argine alla sua diffusione. Ciononostante negli anni la ricerca ha fatto dei decisivi passi avanti, soprattutto nell'ambito della diagnosi della patologia: i due lavori qui mostrati, realizzati da Albert Cruz *et al.* (2019) e Johanna Albetis *et al.* (2017) hanno dato risultati estremamente incoraggianti.

Assai più lungo è invece il percorso che ancora spetta ai ricercatori prima di avere una completa comprensione dei meccanismi che regolano l'interazione pianta-patogeno, fondamentale per poter elaborare una efficace strategia di prevenzione e lotta. È ormai stato chiarito, grazie a sperimentazioni quali quelle condotte da Luciana Galetto *et al.* nel 2014, quanto possa variare la risposta all'attacco del patogeno in base alla varietà: la cv Merlot ad esempio è molto resistente, così come il Nebbiolo, mentre Barbera e Glera sono più suscettibili, pur avendo anche maggiori probabilità di guarigione. Ma su quali meccanismi specifici siano alla base di tali differenti reazioni ancora si sa poco. Dimitrios E. Miliordos *et al.*, (2016) hanno dimostrato che un analogo funzionale dell'acido salicilico, il BTH, è in grado di indurre una lieve risposta di resistenza contro FD. Le nozioni alla base della scelta di tale sostanza, però, non derivano da studi specifici sulle interazioni tra *V. vinifera* e il fitoplasma di FD, ma da studi di interazioni tra altre piante con altri patogeni. Una conoscenza più approfondita in questo ambito è necessaria, se non fondamentale, per dare il via a sperimentazioni più fruttuose.

BIBLIOGRAFIA / SITOGRAFIA

- Albetis, J.; Duthoit, S.; Guttler, F.; Jacquin, A.; Goulard, M.; Poilvé, H.; Féret, J.; Dedieu, G. (2017). Detection of Flavescence dorée Grapevine Disease Using Unmanned Aerial Vehicle (UAV) Multispectral Imagery. *Remote Sensing*, 9(4), 308; <https://doi.org/10.3390/rs9040308>.
<https://www.mdpi.com/2072-4292/9/4/308>
- Bernardini, C.; Santi, S.; Mian, G.; Levy, A.; Buoso, S.; Suh, J. H.; Wang, Y.; Vincent, C.; van Bel, A. J. E.; Musetti, R. (2022). Increased Susceptibility to Chrysanthemum Yellows Phytoplasma Infection in Atcals7ko Plants Is Accompanied by Enhanced Expression of Carbohydrate Transporters. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH.
- Bertazzon, N.; Bagnaresi, P.; Forte, V.; Mazzucotelli, E.; Filippin, L.; Guerra, D.; Zechini, A.; Cattivelli, L.; Angelini, E. (2019). Grapevine comparative early transcriptomic profiling suggests that Flavescence dorée phytoplasma represses plant responses induced by vector feeding in susceptible varieties. *BMC Genomics*, 20. 10.1186/s12864-019-5908-6.
- Buoso, S.; Pagliari, L.; Musetti, R.; Martini, M.; Marroni, F.; Schmidt, W.; Santi, S. (2019). ‘Candidatus Phytoplasma Solani’ Interferes with the Distribution and Uptake of Iron in Tomato. *BMC Genomics*, vol. 20, no. 1, pp. 703–703, <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6062-x>.
- Cruz, A.; Ampatzidis, Y.; Pierro, R.; Materazzi, A.; Panattoni, A.; De Bellis, L.; Luvisi, A. (2019). Detection of grapevine yellows symptoms in *Vitis vinifera* L. with artificial intelligence, *Computers and Electronics in Agriculture*, Volume 157, Pages 63-76, ISSN 0168-1699, <https://doi.org/10.1016/j.compag.2018.12.028>.
(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168169918312353>)
- Galetto, L.; Miliordos, D.; Roggia, C. *et al.* (2014). Acquisition capability of the grapevine Flavescence dorée by the leafhopper vector *Scaphoideus titanus* Ball correlates with phytoplasma titre in the source plant. *J Pest Sci* 87, 671–679. <https://doi.org/10.1007/s10340-014-0593-3>

- Héloir, M-C.; Adrian, M.; Brulé, D.; Claverie, J.; Cordelier, S.; Daire, X.; Dorey, S.; Gauthier, A.; Lemaître-Guillier, C.; Negrel, J.; Trdá, L.; Trouvelot, S.; Vandelle, E.; Poinssot, B.; (2019). Recognition of Elicitors in Grapevine: From MAMP and DAMP Perception to Induced Resistance. *Front. Plant Sci.* 10:1117. doi: 10.3389/fpls.2019.01117
- Miliordos, D.E.; Galetto, L.; Ferrari, E.; Pegoraro, M.; Marzachi, C.; Bosco, D. (2017). Acibenzolar-S-methyl may prevent vector-mediated flavescence dorée phytoplasma transmission, but is ineffective in inducing recovery of infected grapevines. *Pest. Manag. Sci.*, 73: 534-540. <https://doi.org/10.1002/ps.4303>
- Musetti, R.; Marabottini, R.; Badiani, M.; Martini, M.; Sanita' di Toppi, L.; Borselli, S.; Borgo, M.; Osler, R. (2007). On the role of H₂O₂ in the recovery of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Prosecco) from Flavescence dorée disease. *Functional Plant Biology - FUNCT PLANT BIOL.* 34. 10.1071/FP06308.
- Oliveira, M. J. R. A.; Castro, S.; Paltrinieri, S.; Bertaccini, A.; Sottomayor, M.; Santos, C. S.; Vasconcelos, M. W.; Carvalho, S. M. P. (2020). “Flavescence dorée” impacts growth, productivity and ultrastructure of *Vitis vinifera* plants in Portuguese “Vinhos Verdes” region, *Scientia Horticulturae*, Volume 261, 108742, ISSN 0304-4238, <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108742>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423819306284>)
- Osler, R.; Ermacora, P.; Stamo, B.; Myrta, A.; et al. (2003). “First report of phytoplasma infections in fruit trees and grapevine in Albania.” *Journal of Plant Pathology*, vol. 85, no. 1, pp. 64–64.
- Pierro, R.; Semeraro, T.; Luvisi, A.; Garg, H.; Vergine, M.; De Bellis, L.; Gill, H. K. (2019). The Distribution of Phytoplasmas in South and East Asia: An Emerging Threat to Grapevine Cultivation. *Front. Plant Sci.* 10:1108. doi: 10.3389/fpls.2019.01108
- Prezelj, N.; Covington, E.; Roitsch, T.; Gruden, K.; Fagner, L.; Weckwerth, W.; Chersicola, M.; Vodopivec, M.; Dermastia, M. (2016). Metabolic Consequences of Infection of Grapevine (*Vitis vinifera* L.) Cv. ‘modra Frankinja’ with Flavescence Dorée Phytoplasma. *Frontiers in Plant Science*, vol. 7, no. 2016, pp. 711–711, <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00711>.

- Romanazzi, G.; Murolo, S.; Feliziani, E. (2013). Effects of an Innovative Strategy to Contain Grapevine Bois Noir: Field Treatment with Resistance Inducers 2013/08/01 doi: 10.1094/PHYTO-01-13-0031-R Phytopathology® Scientific Societies 0031-949X <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-13-0031-R>
- Rossi, M.; Pegoraro, M.; Ripamonti, M.; Abbà, S.; Beal, D.; Giraud, A.; Veratti, F.; Malembic-Maher, S.; Salar, P.; Bosco, D.; Marzachi, C. (2019). Genetic diversity of flavescence dorée phytoplasmas at the vineyard scale. Appl. Environ. Microbiol. 85:e03123-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.03123-18>
- Santi, S.; De Marco, F.; Polizzotto, R.; Grisan, S.; Musetti, R. (2013). “Recovery from Stolbur Disease in Grapevine Involves Changes in Sugar Transport and Metabolism.” *Frontiers in Plant Science*, vol. 4, 2013, pp. 171–171, <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00171>.
- Namba, S. (2019). Molecular and Biological Properties of Phytoplasmas. *Proceedings of the Japan Academy*, vol. 95, no. 7, 2019, pp. 401–18, <https://doi.org/10.2183/pjab.95.028>.
- Teixeira, A.; Martins, V.; Frusciante, S.; Cruz, T.; Noronha, H.; Diretto, G.; Geró's, H.; (2020). Flavescence Dorée Derived Leaf Yellowing in Grapevine (*Vitis vinifera* L.) is associated to a general repression of isoprenoid biosynthetic pathways. *Front. Plant Sci.* 11:896. doi: 10.3389/fpls.2020.00896
- van Bel, A. J. E.; Musetti, R. (2019). “Sieve Element Biology Provides Leads for Research on Phytoplasma Lifestyle in Plant Hosts.” *Journal of Experimental Botany*, vol. 70, no. 15, pp. 3737–55, <https://doi.org/10.1093/jxb/erz172>.
- <https://www.regione.veneto.it/web/fitosanitario/flavescenza-dorata>